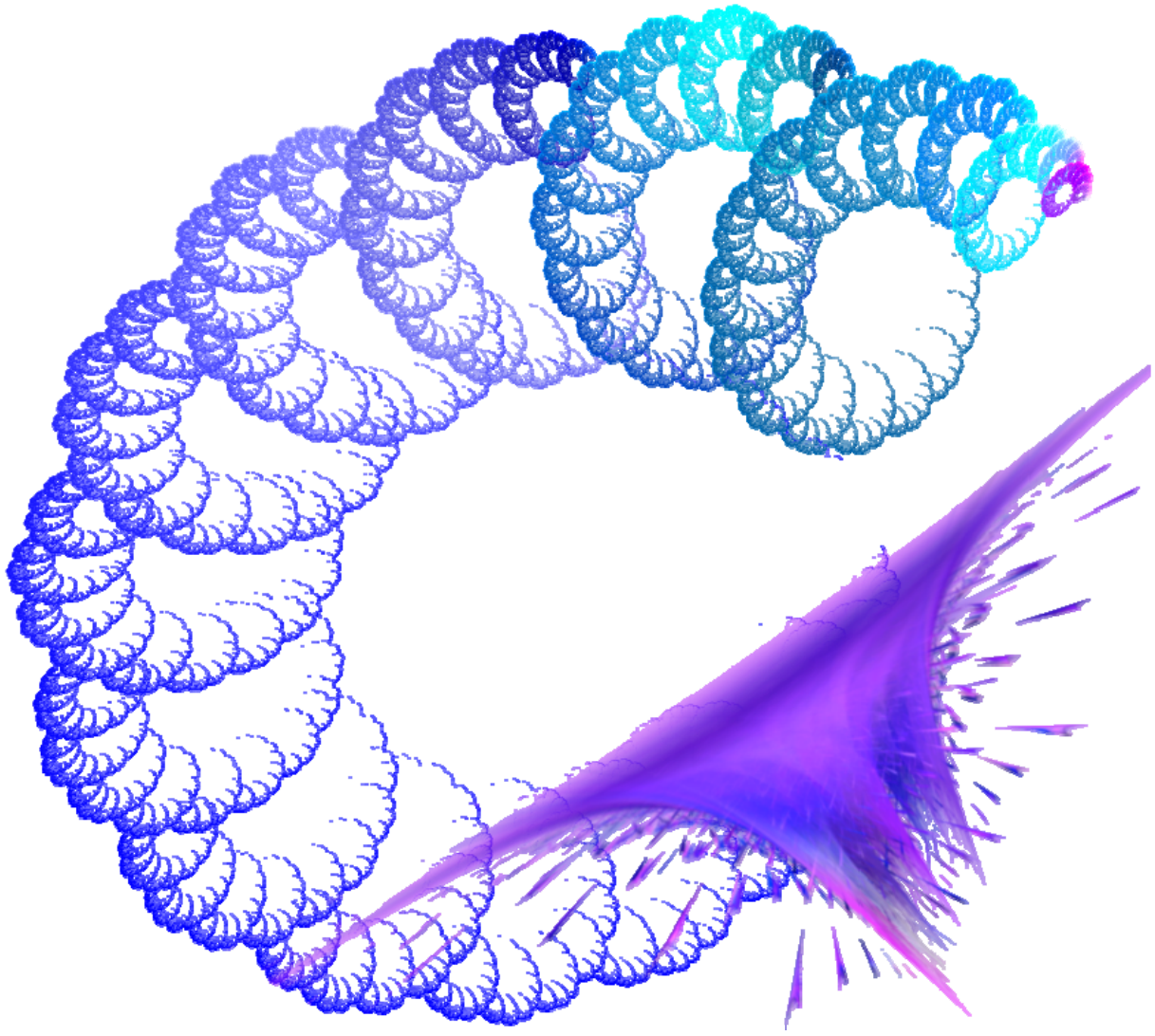
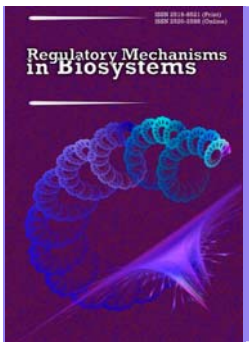
ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)

Regulatory Mechanisms in Biosystems



Volume 8(2)



Regulatory Mechanisms in Biosystems

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

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

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief:

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

Deputy Editors:

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

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

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

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

Executive Editor:

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

Editorial Board:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Prof., D. Sc., *A. V. Matsyura*, Department of Ecology and Zoology, Bogdan Khmelnitsky Melitopol State Pedagogical University, Ukraine;

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

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

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

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

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

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

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

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

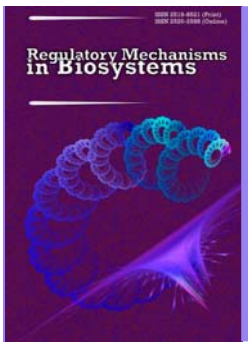
Prof. *T. M. Yeroshkina*, M. D., Department of Clinical and Laboratory Diagnostics, Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Ukraine.

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

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

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

Свідоцтво про державну реєстрацію – КВ № 22623-12523 ПР від 24.03.2017 р. Підписано до друку 25.05.2017 р. Тираж 100 прим.



Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(2), 105–110
doi: 10.15421/021718

Levels of C-terminal propeptide of type I procollagen and oxyproline in patients with systemic lupus erythematosus: The relationship between the course of the disease and the structural and functional state of bone tissue

S. V. Shevchuk, L. P. Denyschych, L. I. Marynych

National Pirogov Memorial Medical University, Vinnytsya, Ukraine

Article info

Received 18.02.2017
Received in revised form 14.03.2017
Accepted 17.03.2017

National Pirogov Memorial Medical University, Khmelnytske Shosse, 104, Vinnytsya, 21100, Ukraine
Tel. +38-067-397-80-46
E-mail: shev_sv2@mail.ru

Shevchuk, S. V., Denyschych, L. P., & Marynych, L. I. (2017). Levels of C-terminal propeptide of type I procollagen and oxyproline in patients with systemic lupus erythematosus: The relationship between the course of the disease and structural and the functional state of bone tissue. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(2), 105–110. doi:10.15421/021718

The high prevalence of osteoporosis in patients with systemic lupus erythematosus (SLE) makes it necessary to study the abnormalities in bone metabolism, its relationship with reduced bone mineral density (BMD) and the impact of the disease on it. The aim of this study was to determine serum levels of C-terminal propeptide of type I procollagen (PICP) and oxyproline in patients with SLE, their comparison with the structural and functional state of the patients' bone tissue and the course of the disease. We examined 58 female SLE patients. The mean age of the patients was 45.1 years. The control group included 29 healthy individuals,corresponding in age and sex with the researched group. For every patient, data were recorded on age, body mass index (BMI), menstrual history, smoking, chronic SLE damage (SLICC/ACR DI) and disease activity score (SLEDAI), cumulative glucocorticoid dose, serum concentrations of interleukin-6 (IL-6) and C-reactive protein (CRP), bone formation marker (C-terminal propeptide of type I procollagen) and bone resorption marker (oxyproline). In all patients BMD was measured by DXA (Dual-energy X-ray absorptiometry) at two sites. To determine vertebral compression fractures, female SLE patients were examined with an x-ray of the thoracic and lumbar spine. We established that bone turnover markers showed a significant difference between the SLE patients and the control group, with lower levels of PICP and higher levels of oxyproline in the SLE patients. Alterations of bone metabolism were associated with the severity of the disease, active inflammation (high levels of CRP and IL-6), the age of the patients, and the high cumulative glucocorticoid dose but no correlation was found with disease duration, BMI and smoking. Patients with osteopenia, osteoporosis and fractures were significantly more frequently found among patients with reduced bone formation and increased bone resorption rate. Thus, our findings showed that female SLE patients have alterations of bone metabolism in the form of increasing serum oxyproline and reducing serum C-terminal propeptide of type I procollagen, the correction of which would slow the progression of adverse structural and functional changes in the bone tissue.

Keywords: osteoporosis; bone turnover; bone mineral density

Рівні С-кінцевого пропептиду проколагену I типу та оксипроліну у сироватці крові хворих на системний червоний вовчак: зв'язок із структурно-функціональним станом кісткової тканини та перебігом захворювання

С. В. Шевчук, Л. П. Денищич, Л. І. Маринич

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

Вивчено рівні С-кінцевого пропептиду проколагену I типу (PICP) та оксипроліну у сироватці крові хворих на системний червоний вовчак (СЧВ), їх співставлення із структурно-функціональним станом кісткової тканини та перебігом захворювання. Обстежено 58 жінок, хворих на СЧВ, і 29 практично здорових осіб відповідного віку та статі. Враховано традиційні та СЧВ-зумовлені чинники ризику розвитку остеопорозу, визначено вміст інтерлейкіну-6 (ІЛ-6) та С-реактивного білка (СРБ), маркерів синтезу (С-кінцевого пропептиду проколагену I типу) та резорбції (оксипроліну) кісткової тканини, вивчено мінеральну щільність кісткової тканини (МЩКТ), враховано наявність переломів. У хворих на СЧВ має місце пригнічення біосинтетичних і посилення резорбтивних процесів кісткової тканини. Метаболічний дисбаланс асоціюється з тяжкістю перебігу захворювання, активністю запального процесу, віком хворих та високою сумарною дозою глюкокортикоїдів (ГК) і суттєво не залежить від тривалості захворювання, індексу маси тіла (ІМТ) та паління. У групі хворих з ознаками

пригнічення біосинтетичних і посиленням деструктивних процесів у кістковій тканині достовірно частіше зустрічались особи з остеопенією та остеопорозом, а також із переломами. У жінок із СЧВ відбувається формування несприятливого метаболічного патерну у вигляді зростання рівнів оксипроліну та зниження рівнів С-кінцевого пропептиду проколагену I типу, корекція якого дозволить уповільнити прогресування несприятливих структурно-функціональних змін кісткової тканини.

Ключові слова: остеопороз; метаболізм кісткової тканини; мінеральна щільність кісткової тканини

Вступ

Нині достеменно встановлено, що більшість хворих на СЧВ мають ознаки ураження кістково-м'язової системи, серед яких чинне місце займає остеопороз (Bultink & Lams, 2016; Rees et al., 2016). Частота остеопорозу у хворих із СЧВ вища, порівняно з популяційним рівнем (Ajeganova et al., 2015; Rees et al., 2016; Wang et al., 2016). Тяжкість остеопорозу у хворих на СЧВ асоціюється з цілою низкою факторів. До них належать жіноча стать, тривалість та активність захворювання, ступінь ушкодження органів, глюкокортикоїдна терапія тощо (Bultink, 2012; Carli et al., 2016; Cramarossa et al., 2016).

Появі денситометричних змін у скелеті передує порушення метаболічного стану кісткової тканини. Зокрема, у 29–35% хворих на СЧВ із переломами хребців реєструється незмінена МЩКТ (Li et al., 2009; Mendoza-Pinto et al., 2009). Отож залишається відкритим питання: зниження міцності кісткової тканини у хворих на СЧВ – результат її зростаючої резорбції чи пригніченого формування або їх поєднання? Вважається, що зниження МЩКТ у хворих на СЧВ – наслідок прискореного остеокластогенезу, індукованого прозапальними цитокінами (ФНП-альфа, ІЛ-1, ІЛ-6 і ІЛ-17) (Korczowska et al., 2003; Amarasekara et al., 2015). За даними Redlich et al. (2000), у хворих на СЧВ переважає сповільнений біосинтез кісткової тканини. В інших (Becker et al., 2001; Sun et al., 2015) дослідженнях взагалі не знайдено взаємозв'язку між уже морфологічно зміненою кісткою та метаболічним станом кісткової тканини у хворих на СЧВ. Залишається також мало вивченим зв'язок перебігу захворювання у формуванні метаболічних порушень кісткової тканини у хворих на СЧВ. Мета дослідження – оцінити рівні С-кінцевого пропептиду проколагену I типу та оксипроліну у сироватці крові хворих на СЧВ та їх співставлення із структурно-функціональним станом кісткової тканини та перебігом захворювання.

Матеріал і методи досліджень

В основну групу включено 58 жінок, хворих на СЧВ. Середній вік хворих основної групи дорівнював 45,4 ± 1,0 років. Контрольну групу склали 29 практично здорових осіб відповідного віку та статі. Діагноз СЧВ установлювали з урахуванням критеріїв ACR (Hochberg, 1997) та формулювали за рекомендаціями Асоціації ревматологів України (2002). Для оцінювання активності захворювання використовували шкалу SLEDAI (Bombardier et al., 1992). За шкалою SLICC/ACR DI визначали важкість ушкодження органів (Gladman et al., 1996). У всіх обстежених оцінено традиційні (вік, паління, період репродуктивного віку, індекс маси тіла) та СЧВ-зумовлені (тривалість захворювання, прийом глюкокортикоїдів, цитостатиків, гідроксихлорохіну) чинники ризику остеопорозу. Також враховано застосування препаратів кальцію та вітаміну D, антиостеопоротичної терапії. Для кожної хворої визначено сумарну дозу глюкокортикоїдів.

Під час лабораторного обстеження активність запального процесу визначено за швидкістю осідання еритроцитів (ШОЕ), СРБ та ІЛ-6. Вміст інтерлейкіну-6 (ІЛ-6) у плазмі крові визначали імуноферментним методом із використанням стандартного набору фірми Calbiotech (Німеччина). Визначення вмісту С-реактивного білка в сироватці крові проводили імуноферментним методом, використовуючи стандартний набір фірми Diagnostic Automation Inc. (США). Оцінювання маркерів формування кісткової тканини проводили за визначенням рівнів С-кінцевого пропептиду проколагену I типу імуноферментним методом із використанням комерційних наборів MicroVuetm CICP EIA Kit (Quidel, США). Рівень оксипроліну у сироватці крові визначали за допомогою фотоелектроколориметра.

Для виявлення низькоенергетичних переломів хребців застосовували рентгенографію грудного та поперекового відділів хребта в бічній проекції.

МЩКТ на рівні L_1-L_4 поперекового відділу хребта та проксимального відділу стегна визначали за допомогою двоенергетичної рентгенівської абсорбціометрії на апараті Hologic Discovery Wi (S/N 87227). Остеопорозом вважали зниження МЩКТ за Т-критерієм –2,5 SD та нижче. Остеопенія відповідала t-критерію від –1 до –2,5 SD.

Визначено середню арифметичну (M), стандартну похибку середньої величини (SE), відносні величини (абс., %), рівень статистичної значущості (P). Критерій Стьюдента (t) застосовано для оцінювання достовірності відмінностей середніх величин, критерій χ^2 Пірсона – для відносних величин. Із метою визначення взаємозв'язку між показниками використано коефіцієнти рангової кореляції Спірмена (r).

Результати та їх обговорення

Вміст С-кінцевого пропептиду проколагену I типу та оксипроліну в сироватці крові осіб контрольної та основної групи істотно відрізнялись. За результатами персентильного аналізу (табл. 1) встановлено, що у 95% осіб контрольної групи рівень PICP перебував у діапазоні 75,0–146,8 нг/мл (P_5–P_{95}), коли у хворих на СЧВ 95% CI становив 48,0–157,0 нг/мл. Рівень оксипроліну в основній групі складав 12,1–24,9 нг/мл, а в осіб контрольної групи – 11,4–16,8 нг/мл. Оскільки в літературі ми не знайшли критеріїв оцінювання сироваткових рівнів PICP та оксипроліну, для подальшого аналізу обрано показники, які наближаються до P_{75} та P_{95} групи контролю. Оптимальним вважали рівень PICP, вищий 92,0 нг/мл (>P_{25}), гранично низьким – 75,0–92,0 нг/мл (P_{25}–P_5), низьким – нижче 75,0 нг/мл (<P_5). Рівень оксипроліну в сироватці крові вважали оптимальним за показників нижче 16,2 нг/мл (< P_{75}), гранично високим – 16,2–16,8 нг/мл (P_{75}–P_{95}), високим – вище 16,8 нг/мл (>P_{95}).

Середній вміст PICP у сироватці крові хворих на СЧВ дорівнював 92,9 ± 5,0 нг/мл, тоді як у практично здорових осіб – 107,8 ± 4,3 нг/мл, і був вищим на 13,8% (табл. 2). Частка осіб із низьким рівнем PICP становила 39,0% проти 6,9% групи контролю. Середній рівень оксипроліну в основній групі дорівнював 17,0 ± 0,6 нг/мл, в контрольній – 14,8 ± 0,3 нг/мл, або був на 14,8% нижчим. Частка осіб із високим рівнем оксипроліну у групі хворих на СЧВ суттєво не відрізнялась від такої в контрольній групі. Порушення процесів ремоделювання кісткової тканини асоціювалось зі зниженням МЩКТ у хворих на СЧВ, накопиченням осіб з остеопенією та остеопорозом. Середній вміст PICP у хворих з ознаками остеопорозу був на 43,7% нижчим, ніж за нормального стану кістки, та дорівнював 56,1 ± 2,5 нг/мл проти 99,7 ± 7,6 нг/мл. Подібні, проте обернені взаємозв'язки відмічено і за рівнем оксипроліну. У хворих на СЧВ із переломами в анамнезі метаболізм кісткової тканини змінювався у бік пригнічення біосинтетичних процесів. Вміст PICP на 31,2% нижчий в осіб із переломами, ніж без них, відповідно зростає частка пацієнтів з низьким рівнем PICP.

Отримані дані свідчать, що показники метаболічного стану кістки у жінок із СЧВ виявляють певну залежність від традиційних факторів ризику (табл. 3). Зі збільшенням віку хворих виявлялась чітка тенденція до сповільнення процесів формування кісткової тканини. У хворих старшого віку вміст PICP на 23,0% нижчий,

ніж у хворих найменшої вікової групи. Збільшення віку також асоційоване з посиленням деструктивних процесів кісткової тканини, про що свідчить вищий (на 18,9%) вміст оксипроліну у сироватці крові у хворих (старше 55 років) порівняно з пацієнтами до 35 років.

Не знайдено чіткого взаємозв'язку між метаболічними зрушеннями кісткової тканини у хворих на СЧВ із тривалістю захворювання, палінням, а також ІМТ. Результати (табл. 4) дозволяють стверджувати, що збільшення індексу ушкодження внутрішніх органів та сумарного показника активності захворювання за SLEDAI негативно відображається на метаболічному стані кісткової тканини. Підвищення індексу ушкодження вище 3 балів викликало тенденцію до зниження вмісту PICP і підвищення вмісту оксипроліну. Достовірні зміни метаболічного стану кістки виявлено за умов високої активності захворювання за SLEDAI. Рівні PICP у групі (SLEDAI понад 18 балів) були нижчими на 25%, а оксипроліну – вищими на 12,6%, ніж в осіб із SLEDAI менше 18 балів.

Таблиця 1

Персентильний аналіз вмісту С-кінцевого пропептиду проколагену I типу та оксипроліну в сироватці крові практично здорових осіб і хворих із СЧВ

Група	Медіана	С-кінцевий пропептид проколагену I типу, нг/мл					
		P_5	P_{10}	P_{25}	P_{75}	P_{90}	P_{95}
Контроль, n = 29	106	75	75	92	125	142,6	146,8
Хворі із СЧВ, n = 58	78	48	51	60	125	142,7	157,0
Оксипролін, нг/мл							
Контроль, n = 29	15,2	11,4	12,4	14,3	16,2	16,7	16,8
Хворі із СЧВ, n = 58	15,4	12,1	12,7	13,7	21,8	23,5	24,9

Таблиця 2

Вміст С-кінцевого пропептиду проколагену I типу та оксипроліну в сироватці крові та їх зв'язок зі станом кісткової тканини

Групи хворих	Маркери метаболізму кісткової тканини			
	С-кінцевий пропептид проколагену I типу, нг/мл		оксипролін, нг/мл	
	M ± SE	частка осіб із низьким вмістом (<60 нг/мл)	M ± SE	частка осіб із високим вмістом (>16,0 нг/мл)
1 Контроль, n = 29	107,8 ± 4,28	2 (6,9%)	14,8 ± 0,31	8 (27,5%)
2 Хворі на СЧВ, n = 58	92,9 ± 5,01*	16 (39,0%)*	17,0 ± 0,57*	24 (41,4%)
у тому числі залежно від мінеральної щільності кісткової тканини				
3 Хворі на СЧВ з нормальним станом кістки, n = 32	99,7 ± 7,61	6 (18,7%)	16,4 ± 0,77	9 (28,1%)
4 Хворі на СЧВ з остеопенією, n = 19	92,4 ± 7,75	4 (21,0%)	16,6 ± 0,93	9 (47,4%)
5 Хворі на СЧВ з остеопорозом, n = 7	56,1 ± 2,49#	6 (85,7%)	21,0 ± 1,16#	6 (85,7%)
у тому числі залежно від наявності переломів				
6 Хворі на СЧВ без переломів, n = 54	95,0 ± 5,21	11 (20,4%)	16,8 ± 0,58	21 (38,9%)
7 Хворі на СЧВ з переломами, n = 4	65,3 ± 13,55γ	2 (50,0%)	20,0 ± 2,41	3 (75,0%)

Примітки: * – вірогідні відмінності щодо осіб контрольної групи; # – вірогідні відмінності щодо пацієнтів із нормальним станом кісткової тканини; γ – відмінності стосовно хворих без переломів.

Таблиця 3

Зв'язок рівнів С-кінцевого пропептиду проколагену I типу та оксипроліну в сироватці крові з віком, тривалістю захворювання, ІМТ і палінням

Групи хворих	Маркери метаболізму кісткової тканини			
	С-кінцевий пропептид проколагену I типу, нг/мл		оксипролін, нг/мл	
	M ± SE	частка осіб із низьким вмістом (<60 нг/мл)	M ± SE	частка осіб із високим вмістом (>16,0 нг/мл)
залежно від віку				
1 До 35 років, n = 9	110,9 ± 14,6	1 (11,1%)	14,86 ± 0,53	1 (11,1%)
2 36–55 років, n = 40	89,8 ± 5,9	13 (7,5%)	17,36 ± 0,74*	18 (45,0%)
3 Понад 55 років, n = 9	89,2 ± 12,1	2 (22,2%)	17,65 ± 1,40	5 (55,5%)
залежно від тривалості захворювання				
4 До 5 років, n = 17	88,2 ± 9,6	7 (41,1%)	17,6 ± 1,12	9 (52,9%)
5 5–10 років, n = 8	87,0 ± 15,3	2 (25,0%)	17,4 ± 1,41	4 (50,0%)
6 Понад 10 років, n = 33	96,9 ± 6,4	7 (21,2%)	16,8 ± 0,76	11 (33,3%)
залежно від паління				
7 Не палять, n = 54	93,2 ± 5,2	14 (25,9%)	17,1 ± 0,60	22 (40,7%)
8 Палять, n = 4	89,5 ± 23,4	2 (50,0%)	16,6 ± 2,03	2 (50,0%)
залежно від ІМТ				
9 ІМТ до 25 кг/м^2, n = 50	95,5 ± 5,3	12 (24,0%)	16,95 ± 0,63	19 (38,0%)
10 ІМТ понад 25 кг/м^2, n = 8	77,5 ± 14,2	4 (50,0%)	17,59 ± 1,37	5 (62,5%)

Примітка: * – вірогідні відмінності щодо пацієнтів найменшої вікової групи.

Підвищення вмісту медіаторів запалення у сироватці крові, зокрема, інтерлейкіну-6 та СРБ асоціювалось із посиленням ознак кісткової деструкції та зниженням біосинтетичних процесів (табл. 5). Слід зазначити, що зміни маркерів метаболізму кісткової тканини за помірного зростання у сироватці крові ІЛ-6 та СРБ були несуттєвими, у той час як за високих рівнів показників активності вони значно посилювались. У хворих із високим рівнем ІЛ-6 (вище 20,0 нг/л) вміст PICP був нижчим (на 38,1% та 39,6%, відповідно), ніж у хворих із гранично високим (12,5–20,0 нг/л) та оптимальним (<12,5 нг/л) рівнями ІЛ-6. Достовірно зросла частка осіб із низьким рівнем PICP з 6,7% у групі з оптимальним рівнем ІЛ-6 до 55,6% у групі з високим рівнем ІЛ-6. Підвищення вмісту ІЛ-6 також асоціювалось із посиленням деструктивних процесів у кістковій тканині, про що свідчить вищий (на 12–39%) рівень оксипроліну в осіб із високими рівнями цитокіну. Подібні асоціації виявлені також за рівнем СРБ. Результатами кореляційного аналізу додатково підтверджено наявність тісного взає-

мозв'язку між концентрацією ІЛ-6 (r = – 0,24, 0,54) та СРБ (r = –0,49, 0,51), відповідно, з рівнем PICP та оксипроліну. Збільшення ГК навантаження також негативно відображалось на біосинтетичних і резорбтивних процесах кістки (табл. 6). На це вказує той факт, що у хворих із низькою та помірною сумарною дозою ГК зміни PICP та оксипроліну були менш суттєвими, ніж в осіб із високою сумарною дозою ГК (понад 70 г). Частка пацієнтів із низьким рівнем PICP і високим оксипроліну серед хворих із високою сумарною дозою ГК дорівнювала 41,1% та 88,2%, відповідно, і була практично удвічі вищою, ніж в осіб із помірною чи низькою сумарною дозою ГК. Кореляційний аналіз також підтвердив наявність тісних асоціативних взаємозв'язків між сумарною дозою глюкокортикоїдів, з одного боку, та рівнем PICP та оксипроліну – з іншого.

Таблиця 4

Зв'язок рівнів С-кінцевого пропептиду проколагену I типу та оксипроліну в сироватці крові з індексом ушкодження та сумарним показником активності запального процесу SLEDAI

Групи хворих	Маркери метаболізму кісткової тканини			
	С-кінцевий пропептид проколагену I типу, нг/мл		оксипролін, нг/мл	
	M ± SE	частка осіб із низьким вмістом (<60 нг/мл)	M ± SE	частка осіб із високим вмістом (>16,0 нг/мл)
залежно від індексу ушкодження, бали				
1 Індекс ушкодження, ≤ 2 бали, n = 35	95,4 ± 6,1	8 (22,8%)	16,3 ± 0,64	12 (34,2%)
2 Індекс ушкодження, ≥ 3 бали, n = 23	89,3 ± 8,7	8 (34,7%)	18,2 ± 1,03	12 (52,2%)
залежно від активності запального процесу за SLEDAI, бали				
3 SLEDAI, ≤ 18 балів, n = 45	97,4 ± 6,0	11 (24,4%)	16,6 ± 0,63	16 (35,6%)
4 SLEDAI, > 18 балів, n = 13	77,5 ± 7,0*	5 (38,5%)	18,7 ± 1,26	8 (61,5%)

Примітка: * – вірогідні відмінності між групами.

Таблиця 5

Зв'язок рівнів С-кінцевого пропептиду проколагену I типу та оксипроліну в сироватці крові з індексом ушкодження та сумарним показником активності запального процесу SLEDAI

Групи хворих	Маркери метаболізму кісткової тканини			
	С-кінцевий пропептид проколагену I типу, нг/мл		оксипролін, нг/мл	
	M ± SE	частка осіб із низьким вмістом (<60 нг/мл)	M ± SE	частка осіб із високим вмістом (>16,0 нг/мл)
залежно від рівнів ІЛ-6				
1 Оптимальний (ІЛ-6 <12,5 нг/л), n = 15	106,6 ± 8,8	1 (6,7%)	14,6 ± 0,60	2 (13,3%)
2 Гранично високий (ІЛ-6 12,5–20,0 нг/л), n = 25	103,8 ± 7,7	5 (20,0%)	16,4 ± 0,84*	9 (36,0%)
3 Високий (ІЛ-6 >20,0 нг/л), n = 18	64,3 ± 5,9*	10 (55,6%)	20,3 ± 1,01*	13 (72,2%)
4 Коефіцієнт кореляції		–0,24		0,54*
залежно від рівнів СРБ				
5 Оптимальний рівень СРБ (<7,2 нг/л), n = 8	120,9 ± 6,7	0 (0,0%)	13,9 ± 0,55	1 (12,5%)
6 Гранично високий рівень СРБ (7,2–11,8 нг/л), n = 25	99,1 ± 8,0*	6 (24,0%)	16,3 ± 0,68*	9 (36,0%)
7 Високий рівень СРБ (>11,8 нг/л), n = 15	61,3 ± 3,8*	10 (66,7%)	20,7 ± 1,04*	14 (93,3%)
8 Коефіцієнт кореляції		–0,49*		0,51*

Примітка: * – достовірні відмінності між групами.

Таблиця 6

Зв'язок рівнів С-кінцевого пропептиду проколагену I типу та оксипроліну в сироватці крові із сумарною дозою глюкокортикоїдів

Групи хворих	Маркери метаболізму кісткової тканини			
	С-кінцевий пропептид проколагену I типу, нг/мл		оксипролін, нг/мл	
	M ± SE	частка осіб із низьким вмістом < 60 нг/мл)	M ± SE	частка осіб із високим вмістом (> 16,0 нг/мл)
1 Сумарна доза ГК (<20 г), n = 18	93,3 ± 9,5	4 (22,2%)	17,0 ± 1,00	8 (44,4%)
2 Сумарна доза ГК (20–70 г), n = 23	114,4 ± 7,0	5 (21,7%)	14,5 ± 0,54	1 (4,3%)
3 Сумарна доза ГК (>70 г), n = 17	63,7 ± 4,5*	7 (41,1%)	20,5 ± 0,99*	15 (88,2%)
4 Коефіцієнт кореляції		–0,32*		0,34*

Примітка: * – достовірні відмінності між групами.

Оцінювання вмісту маркерів метаболізму кісткової тканини – вмісту С-кінцевого пропептиду проколагену I типу та оксипроліну в сироватці крові хворих на СЧВ показала, що у 39,0% осіб реєструється її пригнічене формування, а у 41,4% – посилена деструкція. У групі контролю частка осіб із низьким вмістом PICP та високим оксипроліну дорівнювала 6,9% та 27,5%, відповідно. Дані літератури також свідчать про подібні зміни метаболічного стану хворих на СЧВ (Teichmann et al., 1999; Guo et al., 2016). Проте існують і такі, які не відмічають відмінностей між метаболічним станом кісткової тканини хворих на СЧВ і практично здорових осіб (Handono et al., 2014).

Посилення деструктивних та зниження біосинтетичних процесів у кістці тісно асоціювалось зі змінами МЩКТ, отриманими методом двоенергетичної рентгенівської абсорбціометрії, а також наявністю переломів. Зокрема, у хворих з остеопорозом середній вміст PICP дорівнював 56,1 ± 2,49 нг/мл, і був на 43,7% нижчим від такого за нормального стану кістки. Процес рарефікації кістки супроводжувався також вірогідним зростанням концентрації оксипроліну у сироватці крові, рівень якого в осіб з остеопорозом виявився на 28,0% вищим, ніж в осіб із нормальним станом кістки. Крім того, у хворих із переломами чітко реєструвалося пригнічення біосинтетичних процесів кісткової тканини, на що вказувало вірогідне (на 46,0%) зниження середніх рівнів PICP в осіб із переломами порівняно з групою без переломів. Літературні дані також чітко вказують на те, що швидкість обміну кісткової тканини достовірно корелює з її втратою (Stepan, 2000). Незалежно від репродуктивного віку жінки МЩКТ тісно асоціюється з маркерами резорбції кісткової тканини, ніж маркерами біосинтезу (Garnero et al., 1999; Chapurlat et al., 2000; Iki et al., 2006). Водночас, підвищення резорбційної активності прогнозує появу остеопоротичних переломів незалежно від віку, МЩКТ та попередніх

переломів (Garnero et al., 2000; Ross et al., 2000; Bruyère et al., 2003; Melton et al., 2003).

Збільшення віку хворих на СЧВ також негативно відображається на метаболічному стані кісткової тканини. Зокрема, у хворих старшого віку вміст PICP був практично на чверть нижчим, ніж у хворих найменшої вікової групи, також пропорційно збільшенню віку вірогідно зростала концентрація оксипроліну у сироватці крові.

Більш чітка тенденція до зростання резорбтивних процесів у кістковій тканині з віком в осіб жіночої статі відмічена і в інших дослідженнях (Bogaczewicz et al., 2015). Водночас, ми не помітили чіткого взаємозв'язку між метаболічними зрушеннями в кістковій тканині з тривалістю захворювання, ІМТ та палінням. Один із несприятливих патогенетичних чинників порушень метаболічного стану кістки – системний запальний процес. Процес старіння кісткової тканини у хворих на СЧВ асоціюються з тяжкістю органних уражень і активністю запального процесу. В осіб з високою активністю СЧВ за шкалою SLEDAI (понад 18 балів) рівень С-кінцевого пропептиду проколагену І типу достовірно нижчий, ніж в осіб із відносно низькою активністю СЧВ (SLEDAI < 18 балів). Основна частка жінок з аберантними рівнями С-кінцевого пропептиду проколагену І типу та оксипроліну накопичується саме у групах хворих із високим SLEDAI. Отримані нами дані узгоджуються з результатами окремих досліджень, у яких продемонстровано зв'язок між рівнем прозапальних медіаторів і порушеннями метаболічного стану кісткової тканини (Borba et al., 2009; Baker-LePain et al., 2011). Водночас Hansen et al. (1998) не виявили взаємозв'язків між маркерами обміну кісткової тканини та тяжкістю перебігу СЧВ.

Хоча патогенетичні механізми взаємодії імунної та кісткової систем організму людини досі залишаються недостатньо вивченими, вважається, що деструкція кісткової тканини у хворих на системний червоний вовчак – результат прискореного остеокластогенезу, активованого прозапальними цитокінами (Amarasekara et al., 2015). Підвищений вміст ФНП-альфа, ІЛ-1, -6 та ІЛ-17 у хворих на СЧВ спричинює порушення співвідношення RANKL/OPG у бік збільшення синтезу першого, що лежить в основі інтенсивного дозрівання остеокластів (Amarasekara et al., 2015).

Наведені нами дані демонструють, що вміст СРБ та ІЛ-6 у сироватці крові виявляє сильний прямий кореляційний зв'язок із рівнем оксипроліну та обернений зв'язок із рівнем С-кінцевого пропептиду проколагену І типу. Наші дані узгоджуються з результатам досліджень Korczowska et al. (2003) та Borba et al. (2009), в яких продемонстровано зв'язок між рівнем прозапальних медіаторів і посиленням ознак кісткової деструкції у хворих на СЧВ. Цікавим виявилось повідомлення Baker-LePain et al. (2011), в якому вказується, що висока активність захворювання інтенсивніше стимулює процеси резорбції кісткової тканини, ніж кістковоутворення.

Ще один із несприятливих чинників для стану кісткової тканини у хворих на СЧВ – глюкокортикоїдна терапія. ГК порушують дозрівання та активність остеобластів, скорочують тривалість життя кісткових клітин, пригнічують дію місцевих факторів росту (Canalis et al., 2007). Одразу після початку лікування ГК відмічається персистуюче пригнічення процесів формування кісткової тканини та швидке, проте транзиторне посилення резорбтивних процесів (Dovio et al., 2004). Ми показали, що зростання сумарної дози ГК у жінок із СЧВ супроводжувалось достовірним збільшенням концентрації оксипроліну та зниженням PICP у сироватці крові. Додаткові докази патогенетичного зв'язку між використанням ГК і патологічним ремоделюванням кісткової тканини були отримані завдяки кореляційному аналізу. З'ясувалось, що між сумарною дозою ГК та рівнем PICP у сироватці крові встановлюються обернені кореляційні зв'язки, а між дозою ГК і оксипроліном – прямі вірогідні (r = –0,32, r = 0,34, відповідно).

Отримані нами дані свідчать, що у жінок із СЧВ відбувається формування несприятливого метаболічного патерну: зростання рівнів оксипроліну та зниження рівнів PICP у сироватці крові. Висока активність запального процесу та тривале використання ГК, як і збільшення віку, – фактори формування порушень метаболічного стану кісткової тканини у пацієнток із СЧВ. Цілком імовірно, що корекція активності захворювання та асоційованих із ним метаболічних порушень дозволить уповільнити прогресування несприятливих структурно-функціональних змін кісткової тканини у жінок із СЧВ.

Висновки

У 39,0% жінок із СЧВ має місце зниження рівня маркера біосинтезу кісткової тканини – С-кінцевого пропептиду проколагену І типу та у 41,4% підвищення маркера кісткової резорбції – оксипроліну.

Метаболічний дисбаланс кісткової тканини доволі тісно асоціюється з тяжкістю перебігу захворювання, активністю запального процесу, особливо високими рівнями СРБ та ІЛ-6, віком хворих та високою сумарною дозою глюкокортикоїдів і суттєво не залежить від тривалості захворювання, ІМТ та паління.

У групі хворих з ознаками пригнічення біосинтетичних і посиленням деструктивних процесів у кістковій тканині достовірно частіше зустрічаються особи з остеопенічним синдромом і остеопорозом, а також із переломами.

References

Ajeganova, S., Gustafsson, T., Jogestrand, T., Frostegard, J., & Hafström, I. (2015). Bone mineral density and carotid atherosclerosis in systemic lupus erythematosus: A controlled cross-sectional study. Arthritis Research and Therapy, 17, 84.

Amarasekara, D. S., Yu, J., & Rho, J. (2015). Bone loss triggered by the cytokine network in inflammatory autoimmune diseases. Journal of Immunology Research, 2015, 832127.

Baker-LePain, J. C., Nakamura, M. C., Shepherd, J., & von Scheven, E. (2011). Assessment of bone remodelling in childhood-onset systemic lupus erythematosus. Rheumatology (Oxford), 50(3), 611–619.

Becker, A., Fischer, R., Scherbaum, W. A., & Schneider, M. (2001). Osteoporosis screening in systemic lupus erythematosus: Impact of disease duration and organ damage. Lupus, 10(11), 809–814.

Bogaczewicz, J., Karczmarewicz, E., Pludowski, P., Zabek, J., Kowalski, J., Lukaszkiewicz, J., & Wozniacka, A. (2015). Feasibility of measurement of bone turnover markers in female patients with systemic lupus erythematosus. Revista Brasiliera de Reumatologia, 55(2), 133–139.

Bombardier, C., Gladman, D. D., Urowitz, M. B., Caron, D., & Chang, C. H. (1992). Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE. Arthritis and Rheumatology, 35(6), 630–640.

Borba, V. Z., Vieira, J. G., Kasamatsu, T., Radominski, S. C., Sato, E. I., & Lazaretti-Castro, M. (2009). Vitamin D deficiency in patients with active systemic lupus erythematosus. Osteoporosis International, 20(3), 427–433.

Bruyere, O., Collette, J., Delmas, P., Rouillon, A., Roux, C., Seidel, L., Richy, F., & Reginster, J. Y. (2003). Interest of biochemical markers of bone turnover for long-term prediction of new vertebral fracture in postmenopausal women. Maturitas, 44(4), 259–265.

Bultink, I. E. (2012). Osteoporosis and fractures in systemic lupus erythematosus. Arthritis Care and Research (Hoboken), 64(1), 2–8.

Bultink, I. E., & Lems, W. F. (2016). Lupus and fractures. Current Opinion in Rheumatology, 28(4), 426–432.

Canalis, E., Mazziotti, G., Giustina, A., & Bilezikian, J. P. (2007). Glucocorticoid-induced osteoporosis: Pathophysiology and therapy. Osteoporosis International, 18(10), 1319–1328.

Carli, L., Tani, C., Spera, V., Vagelli, R., Vagnani, S., Mazzantini, M., Di Munno, O., & Mosca, M. (2016). Risk factors for osteoporosis and fragility fractures in patients with systemic lupus erythematosus. Lupus Science and Medicine, 3(1), e000098.

Chapurlat, R. D., Garnero, P., Sornay-Rendu, E., Arlot, M. E., Claustrat, B., & Delmas, P. D. (2000). Longitudinal study of bone loss in pre- and perimenopausal women: Evidence for bone loss in perimenopausal women. Osteoporosis International, 11(6), 493–498.

Cramarossa, G., Urowitz, M. B., Su, J., Gladman, D., & Touma, Z. (2016). Prevalence and associated factors of low bone mass in adults with systemic lupus erythematosus. Lupus, 2016.

Dovio, A., Perazzolo, L., Osella, G., Ventura, M., Termine, A., Milano, E., Bertolotto, A., & Angeli, A. (2004). Immediate fall of bone formation and transient increase of bone resorption in the course of high-dose, short-term glucocorticoid therapy in young patients with multiple sclerosis. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 89(10), 4923–4938.

Garnero, P., Sornay-Rendu, E., Claustrat, B., & Delmas, P. D. (2000). Biochemical markers of bone turnover, endogenous hormones and the risk of fractures in postmenopausal women: The OFELY study. Journal of Bone and Mineral Research, 15(8), 1526–1536.

Garnero, P., Sornay-Rendu, E., Duboeuf, F., & Delmas, P. D. (1999). Markers of bone turnover predict postmenopausal forearm bone loss over 4 years: The OFELY study. Journal of Bone and Mineral Research, 14(9), 1614–1621.

Gladman, D., Ginzler, E. Goldsmith, C., Fortin, P., Liang, M., Urowitz, M., Bacon, P., Bombardieri, S., Hanly, J., Hay, E., Isenberg, D., Jones, J., Kalunian, K., Maddison, P., Nived, O., Petri, M., Richter, M., Sanchez-Guerrero, J., Snaith, M., Sturfelt, G., Symmons, D., & Zoma, A. (1996). The development and initial validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology damage index for systemic lupus erythematosus. Arthritis and Rheumatology, 39(3), 363–369.

Guo, Q., Fan, P., Luo, J., Wu, S., Sun, H., He, L., & Zhou, B. (2016). Assessment of bone mineral density and bone metabolism in young male adults recently diagnosed with systemic lupus erythematosus in China. Lupus, 26(3).

Handono, K., Sari, T. L., & Adam, A. A. (2014). Homocysteine, folic acid, vitamin B6, vitamin B12, and biochemical parameters of bone metabolism in female patients with systemic lupus erythematosus. Journal of Clinical and Cellular Immunology, 5(3), 217.

Hansen, M., Halberg, P., Kollerup, G., Pedersen-Zbinden, B., Hørslev-Petersen, K., Hyldstrup, L., & Lorenzen, I. (1998). Bone metabolism in patients with systemic lupus erythematosus. Effect of disease activity and glucocorticoid treatment. Scandinavian Journal of Rheumatology, 27(3), 197–206.

Hochberg, M. C. (1997). Updating the american college of rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. Arthritis and Rheumatology, 40(9), 1725–1734.

Iki, M., Morita, A., Ikeda, Y., Sato, Y., Akiba, T., Matsumoto, T., Nishino, H., Kagamimori, S., Kagawa, Y., Yoneshima, H., & JPOS Study Group (2006). Biochemical markers of bone turnover predict bone loss in perimenopausal women but not in postmenopausal women – the Japanese Population – based Osteoporosis (JPOS) Cohort Study. Osteoporosis International, 17(7), 1086–1095.

Korczowska, I., Olewicz-Gawlik, A., Hrycaj, P., & Lacki, J. (2003). The effect of long-term glucocorticoids on bone metabolism in systemic lupus erythematosus patients: The prevalence of its anti-inflammatory action upon bone resorption. Yale Journal of Biology and Medicine, 76(2), 45–54.

Li, E. K., Tam, L. S., Griffith, J. F., Zhu, T. Y., Li, T. K., Li, M., Wong, K. C., Chan, M., Lam, C. W., Chu, F. S., Wong, K. K., Leung, P. C., & Kwok, A. (2009). High prevalence of asymptomatic vertebral fractures in Chinese women with systemic lupus erythematosus. Journal of Rheumatology, 36(8), 1646–1652.

Melton, L. J. 3rd., Crowson, C. S., O'Fallon, W. M., Wahner, H. W., & Riggs, B. L. (2003). Relative contribution of bone density, bone turnover, and clinical risk factors to long-term fracture prediction. Journal of Bone and Mineral Research, 18(2), 312–318.

Mendoza-Pinto, C., García-Carrasco, M., Sandoval-Cruz, H., Muñoz-Guarneros, M., Escárcega, R. O., Jiménez-Hernández, M., Munguía-Realpozo, P., Sandoval-Cruz, M., Delezé-Hinojosa, M., López-Colombo, A., & Cervera, R. (2009). Risk factors of vertebral fractures in women with systemic lupus erythematosus. Clinical Rheumatology, 28(5), 579–585.

Redlich, K., Ziegler, S., Kiener, H. P., Spitzauer, S., Stohlawetz, P., Bernecker, P., Kainberger, F., Grampp, S., Kudlacek, S., Woloszczuk, W., Smolen, J. S., & Pietschmann, P. (2000). Bone mineral density and biochemical parameters of bone metabolism in female patients with systemic lupus erythematosus. Annals of the Rheumatic Diseases, 59(4), 308–310.

Rees, F., Doherty, M., Grainge, M., Lanyon, P., Davenport, G., & Zhang, W. (2016). Burden of comorbidity in systemic lupus erythematosus in the UK. Arthritis Care and Research (Hoboken), 68(6), 819–827.

Ross, P. D., Kress, B. C., Parson, R. E., Wasnich, R. D., Armour, K. A., & Mizrahi, I. A. (2000). Serum bone alkaline phosphatase and calcaneus bone density predict fractures: A prospective study. Osteoporosis Interbational, 11(1), 76–82.

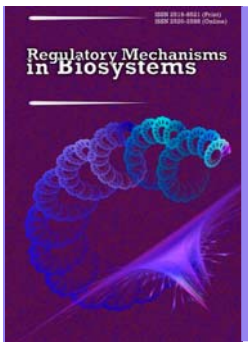
Stepan, J. J. (2000). Prediction of bone loss in premenopausal women. Osteoporosis International, 11(3), 545–554.

Sun, Y. N., Feng, X. Y., He, L., Zeng, L. X., Hao, Z. M., Lv, X. H., & Pu, D. (2015). Prevalence and possible risk factors of low bone mineral density in untreated female patients with systemic lupus erythematosus. Biomed Research International, 2015, 510–514.

Tang, Y., Xie, H., Chen, J., Geng, L., Chen, H., Li, X., Hou, Y., Lu, L., Shi, S., Zeng, X., & Sun, L. (2013). Activated NF-κB in bone marrow mesenchymal stem cells from systemic lupus erythematosus patients inhibits osteogenic differentiation through downregulating Smad signaling. Stem Cells and Development, 22(4), 668–678.

Teichmann, J., Lange, U, Stracke, H., Federlin, K., & Bretzel, R. G. (1999). Bone metabolism and bone mineral density of systemic lupus erythematosus at the time of diagnosis. Rheumatology International, 18(4), 137–140.

Wang, X., Yan, S., Liu, C., Xu, Y., Wan, L., Wang, Y., Gao, W., Meng, S., Liu, Y., Liu, R., & Xu, D. (2016). Fracture risk and bone mineral density levels in patients with systemic lupus erythematosus: A systematic review and meta-analysis. Osteoporosis International, 27(4), 1413–1423.



Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(2), 111–117
doi: 10.15421/021719

Condition of erythrocyte membranes in people with mental and behavioural disorders caused by alcohol consumption

O. V. Baskevich

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

Article info

Received 21.02.2017
Received in revised form 30.03.2017
Accepted 03.04.2017

Precarpatian National University named after V. Stefanik, Shevchenko Str., 57, Ivano-Frankivsk, 76025, Ukraine
Tel.: +38-097-87-41-446
E-mail: basgala@gmail.com

Baskevich, O. V. (2017). Condition of erythrocyte membranes in people with mental and behavioural disorders caused by alcohol consumption. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(2), 111–117. doi:10.15421/021719

We studied the morphological features of the restructuring and osmotic stability of erythrocytes of 30 people with mental disorders and disorders of behavioral reactions caused by 5-7 years consumption of alcohol, the objects of the research being in a state of abstinence during the period of the investigation,. The study of quantitative composition of red blood cells and hemoglobin, as well as their ratio in people with mental and behavioural disorders developed as a result of alcohol consumption showed a decrease in the number of red blood cells and hemoglobin of 42.2% and 25.1%, respectively, indicating the presence in those people of anemic hypoxia. This is closely correlated with a decrease of osmotic resistance of red blood cells to different concentrations of sodium chloride solutions, whereby the state of erythrocyte membranes deteriorates and their resistance to hemolysis decreases. Parallel to this, is a reduction in the size of red blood cells coupled with a variety of changes in their microrelief. Conformational changes of erythrocytes are closely correlated with changes in the activity of enzymes responsible for the biotransformation of xenobiotics, primarily products of lipid peroxidation. It is shown that activity of the erythrocyte antioxidant defense system is sharply reduced as a result of increase in partially oxidized products of metabolism. It was found that the state of red blood cells is a sensitive indicator of the normal course of physiological changes, biochemical and biophysical processes in the bodies of people with mental disorders and behavior reactions developed due to consumption of alcohol.At the same time, the measurement of the osmotic resistance of red blood cells and changes in the shape of red blood cells connected with this phenomenon is an important research method for studying mechanisms of pathological processes and the action of certain drugs or biologically active substances, expands the possibilities of establishing the depth of destruction of body tissues, and also provides excellent opportunities for researchers to identify the effectiveness of treatment and prevention for people with mental disorders and behavior reactions caused by consumption of alcohol. This article discusses prospects of studies of the level of glutathione peroxidase activity in the erythrocytes among people with mental and behavioural disorders as a marker of highly specific homeostasis in the human body in response to long-term alcohol consumption, and considers using this index as a criterion for selecting patients for different groups of physical rehabilitation and recreation according to the level of rehabilitation potential.

Keywords: erythrocyte; mental and behavioral disorders; alcohol; structure; osmotic resistance; antioxidant protection

Стан мембран еритроцитів у людей із розладами психіки та поведінки внаслідок вживання алкоголю

О. В. Баскевич

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

У 30 людей із розладами психіки та поведінкових реакцій унаслідок вживання алкоголю, що перебувають у стані абстиненції зі стажем вживання алкоголю 5–7 років, вивчали особливості морфологічної перебудови та осмотичної стійкості еритроцитів. Дослідження кількісного складу еритроцитів і гемоглобіну, а також їх співвідношення в людей із розладами психіки та поведінки через вживання алкоголю виявило зниження кількості еритроцитів і гемоглобіну на 42,2% і 25,1% відповідно, що свідчить про наявність у них анемічної гіпоксії. Це тісно корелює зі зниженням осмотичної стійкості еритроцитів до різної концентрації розчинів натрію хлориду, внаслідок чого погіршується стан еритроцитарних мембран і знижується їх стійкість до гемолізу. Одночасно із цим відбувається зменшення розмірів еритроцитів у поєднанні з різними змінами їх мікрорельєфу. Конформаційні зміни еритроцитів тісно корелюють зі змінами активності ферментів і відповідають за біотрансформацію ксенобіотиків, перш за все продуктів перекисного окиснення ліпідів. При цьому показано, що активність системи антиоксидантного захисту еритроцитів різко знижується на тлі збільшення недоокиснених продуктів метаболізму. Стан еритроцитів – чутливий індикатор змін нормального перебігу фізіологічних, біохімічних та біофізичних процесів в організмі людей із розладами психіки та поведінки через вживання алкоголю. При цьому встановлення осмотичної стійкості еритроцитів і поєднані з цим явищем зміни форми еритроцитів – важливий метод дослідження для вивчення механізму патологічних процесів і дії деяких ліків або

біологічно активних сполук, що розширює можливості встановлення глибини ураження тканин організму, а також дає можливість широкому колу дослідників виявляти ефективність лікувально-профілактичних заходів для людей із розладами психіки та поведінки через вживання алкоголю. Обговорюється перспективність досліджень у людей із розладами психіки та поведінки рівня активності глутатіон-пероксидази в еритроцитах як високоспецифічного маркера порушення гомеостазу в організмі людини у відповідь на тривале вживання алкоголю та використання цього показника як критерію відбору за рівнем реабілітаційного потенціалу таких пацієнтів в окремі групи фізичної реабілітації та рекреації.

Ключові слова: еритроцит; розлади психіки; розлади поведінки; алкоголь

Вступ

Нині в усьому світі гостро стоїть проблема лікування, профілактики та поліпшення якості життя людей із розладами психіки та поведінки внаслідок вживання алкоголю. Вживанню алкоголю та наркотиків сприяє низка факторів, серед яких найістотніший – нестабільна соціальна обстановка, економічна криза, зміни особистісних цінностей, критичні періоди вікового розвитку тощо (Billieux, 2014; Chernaia et al., 2016). Дані різних дослідників вказують, що загальна кількість людей, які зловживають алкоголем, становить 2,8–5,0% населення Землі (Leggio, 2011; Chick, 2014). При цьому основна «група ризику» виникнення розладів психіки та поведінки внаслідок вживання алкоголю складається на 89,7% із людей до 30 років (Ko, 2014; Kurniasanti, 2014).

Постійне надходження в організм алкоголю чи інших наркотичних речовин запускає різні патологічні стрес-реакції, які активізують процеси метаболізму та спричинюють розвиток психічної та фізичної залежності (Nielsen et al., 2012; Koob, 2014). За тривалого стресу виникають стійкі порушення обміну речовин в організмі, які згодом можуть викликати різні захворювання. Як наслідок, спостерігається зниження рівня захисних сил організму, знижується також рівень соціальної активності людини, її працездатність і адекватність поведінки (Rehm & Poznyak, 2015; Moskalewicz et al., 2016).

Результати досліджень окремих авторів (Najafipour & Beik, 2016) свідчать про те, що алкоголь і наркотичні речовини створюють умови для інтенсифікації процесів вільнорадикального окиснення, які, у свою чергу, зумовлюють розвиток оксидативного стресу. Більшість продуктів вільнорадикального окиснення провокує окисну деструкцію клітинних мембран (Welle-Strand, 2014).

Утворення продуктів вільнорадикального окиснення – ключовий етап патогенезу багатьох захворювань, і алкогольної залежності зокрема. Алкоголь впливає на основні стадії внутрішньоклітинного метаболізму глюкози, процеси енергетичного, ліпідно-білкового обміну та стосується переважно аеробного окиснення вуглеводів та жирних кислот (González-Alonso, 2012; Foroughi et al., 2016). Внаслідок цього розвивається ліпофільно-лізуючий ефект алкоголю та наркотиків, мішень якого – клітинна мембрана еритроцитів. При цьому змінюються рідинно-кристалічна структура і такі основні властивості клітинних мембран як в'язкість, стійкість при жорстко-еластичних деформаціях. Це супроводжується пригніченням усіх функцій і не тільки передчасним відмиранням еритроцитів, а й старінням організму в цілому (Oslin, 2011).

Якісні та кількісні показники крові, метаболічні зрушення в її компонентах несуть інформацію про індивідуальну реактивність, а їх комплексна оцінка здатна дати адекватне уявлення про рівень адаптаційних можливостей цілого організму (Hajela, 2014). Системна патологія, що розвивається за тривалого вживання алкоголю, зокрема, під час пошкодження еритроцитів (одного з найчутливіших до дії цієї речовини типу клітин), робить актуальним пошук нових способів виявлення змін на рівні цілого організму у вигляді мембранопатій і можливостей системної коригувальної дії, зокрема, в системі фізичної реабілітації людей з розладами психіки та поведінки через вживання алкоголю (Raheb et al., 2016).

Оскільки вживання алкоголю дуже поширене серед людей різного віку, в численних публікаціях показано, що в людей із розладами психіки та поведінки внаслідок вживання алкоголю часто спостерігаються всі ознаки нейродегенеративного захворювання, яке прогресує досить швидко та клінічно виявляється не тільки у порушенні соматичного здоров'я, а й у поступовій втраті пам'яті та розумових здібностей, тобто зниженні рівня психофізичного стану. Патогенез хвороби залишається не визначеним, а діагностика заснована, в основному на суб'єктивних ознаках, при існуванні багатьох способів лікування їх результати досить проблематичні та невизначені з огляду на сприятливість і прогностичність віддалених результатів. Діагностика в людей розладів психіки та поведінки через вживання алкоголю базується на виявленні токсичних компонентів, серед яких на першому місці визнані продукти перекисного окиснення ліпідів. Відповідно до гіпотези оксидативного стресу, їх накопичення у тканинах ініціює каскад реакцій, який спричинює складну патологію та клінічні прояви хвороби (Khalsa, 2014). Нерозчинні комплекси фібрилярних білків та їх розчинні олігомери стимулюють продукцію активних кисневмісних метаболітів, указуючи на зв'язок між їх накопиченням, окисним стресом і загибеллю різних клітин організму (Koivu, 2014).

Багаторічні дослідження показали, що у людей із розладами психіки та поведінки внаслідок вживання алкоголю аномалії в окисних процесах спостерігаються як у мозку (Eve et al., 2016), так і в інших тканинах і клітинах (Bergamini et al., 2004). При цьому вражаються не лише центральна нервова система, а й периферичні тканини, зокрема еритроцити (González-Alonso, 2012).

У патогенезі зазначених розладів психіки та поведінки першорядну роль відіграють вік пацієнта та окисний стресс у різних клітинах. Еритроцити розглядаються як пасивні «клітини – інформатори», що відображають біохімічні процеси, які відбуваються в організмі (Foroughi et al., 2016). Проте конформаційні зміни еритроцитів у таких людей майже не вивчені, недостатньо відомостей про окиснювальний стрес у цих клітинах, а наявні дані надзвичайно суперечливі. Залишаються мало відомими дані про концентрацію перекису водню та органічних гідропероксидів в еритроцитах, їх зміни залежно від дози та тривалості вживання алкоголю, а також взаємозв'язок із віком і при різних видах наркоманії та алкоголізмі. Існують поодинокі праці (Wigmore, 2009), які стосуються результатів вимірювання внутрішньоклітинних концентрацій відновленого глутатіону та окисненого глутатіону або глутатіондисульфіду в людей із розладами психіки та поведінки внаслідок вживання алкоголю.

Мета цього дослідження – оцінити біохімічні показники системи антиоксидантного захисту та осмотичну стійкість еритроцитів у взаємозв'язку з особливостями їх морфологічної перебудови у людей з розладами психіки та поведінки через вживання алкоголю.

Матеріал і методи досліджень

Дослідження проводили на базі наркологічного відділення обласного психо-неврологічного диспансеру (м. Івано-Франківськ). До складу експериментальної групи входили 30 людей з розладами психіки та поведінки внаслідок вживання алкоголю, які виявили власну (чи найближчих родичів) згоду у письмовій формі. Діагноз розладів психіки та поведінки базувався на критеріях Стандартів медичних технологій, розроблених на виконання доручення Президента України від 04.03.1998 р. № 1-14/147 з метою уніфікації вимог до обсягів і якості медичної допомоги в лікувально-профілактичних закладах України, затверджені наказом Міністерства охорони здоров'я України № 226 від 17.07.1998 р.

Як контроль брали кров 10 практично здорових людей, які проходили медичне обстеження для отримання різних дозвільних документів (водійські права, дозвіл на володіння зброєю тощо). Здорові добровольці контрольної групи відібрані за відсутності в аннамнезі хронічних захворювань, неврологічних або психіатричних порушень, чи терапії, пов'язаної з такого роду захворюваннями.

Загальним аналізом крові визначали осмотичну стійкість еритроцитів (Renwick & Asker, 2008) та їх гісто-ультраструктурну будову. Морфологічні дослідження проводили у фазово-контрастному мікроскопі та на скануальному електронному мікроскопі JEOL-25M-T220A (Японія) за загальноприйнятими методиками з визначенням мікроелементного складу еритроцитів. Біохімічні дослідження проводили згідно з рекомендаціями Wigmore (2009).

Отримані дані піддавали комп'ютерній варіаційно-статистичній обробці методом малої вибірки за допомогою статистичного пакета Statistica 6 (StatSoft Inc, USA). Використовували непараметричні методи дослідження (критерій Уїлкоксона, Манна – Уїтні). Вибіркові параметри, наведені далі в таблицях і тексті, мають такі позначення: x – вибіркове середнє, SE – стандартна помилка середнього. Відмінності вважали статистично вірогідними за $P < 0,05$ і нижче.

Результати

Результати досліджень виявили значні зміни показників крові у людей із розладами психіки та поведінки внаслідок вживання алкоголю (табл. 1).

Таблиця 1
Різниця окремих показників крові
у людей контрольної та експериментальної групи (x ± SE)

Показники крові	Контрольна група, n = 10	Експериментальна група, n = 30
Еритроцити ($^{x}10^{12}$/ л)	4,5 ± 0,17	2,6 ± 0,02*
Гемоглобін (г/л)	120,0 ± 3,24	90,0 ± 10,43*
Кольоровий показник	0,81± 0,001	1,31 ± 0,001*
Швидкість осідання еритроцитів (мм/год)	11,4 ± 1,02	7,4 ± 0,92*

Примітка: * – $P < 0,05$ щодо контрольної групи.

Порівняно з людьми контрольної групи в експериментальній групі загальна кількість еритроцитів знижується на 42,2%, що тісно корелює ($r = 0,82$) зі зниженням на 25,0% рівня гемоглобіну ($P < 0,05$). При цьому кольоровий показник у людей із розладами психіки та поведінки внаслідок вживання алкоголю збільшується на 28,7%, а швидкість осідання еритроцитів знижується на 35,1%, залишаючись на рівні нижньої межі фізіологічної норми.

Порівняно з контрольною групою, у людей експериментальної групи спостерігається зниження кількості еритроцитів (табл. 2) на 42,2% (у 3,0% розчині хлориду натрію), на 28,6% (у 0,5% розчині хлориду натрію), на 46,2% (за концентрації розчину натрію хлориду 0,46%) і на 54,5% (за 0,3% розчину хлориду натрію). Результати нашого дослідження вказують на зниження стійкості еритроцитів у людей експериментальної групи за збільшення площі поверхні їх цитоплазматичної мембрани. Це добре можна прослідкувати на прикладі структурної перебудови, яку ми спостерігали у процесі дослідження еритроцитів різними морфологічними методиками (рис. 1, 2).

Таблиця 2
Показники осмотичної резистентності еритроцитів
за різних концентрацій розчину хлориду натрію (x ± SE)

Концентрація хлориду натрію	Контрольна група, n = 10	Експериментальна група, n = 30
3,00%	4,5 ± 0,09	2,6 ± 0,04*
0,50%	2,0 ± 0,04	1,5 ± 0,08*
0,46%	1,5 ± 0,01	0,7 ± 0,03*
0,30%	1,1 ± 0,01	0,6 ± 0,01*

Примітка: див. табл. 1.

Порівняно з контрольною групою, у людей експериментальної групи вміст 2,3-дифосфогліцерату та лактату вірогідно ($P < 0,05$) зростає на 42,5% і 51,6%, а концентрація піровиноградної кислоти знижується на 51,7% (табл. 3). При цьому активність супероксиддисмутази підвищується на 61,2%, тоді як активність каталази зменшується на 16,8% (табл. 4). Зменшується вміст відновленого глутатіону на фоні зниження активності глутатіонредуктази та глутатіонпероксидази (табл. 5).

Таблиця 3
Вміст 2,3-дифосфогліцерату, піровиноградної кислоти
та лактату в еритроцитах людей контрольної
та експериментальної групи (x ± SE)

Група	Показники, ммоль/л		
	2,3-дифосфогліцерат	піровиноградна кислота	лактат
Контрольна група, n = 10	7,02 ± 0,24	1,14 ± 0,02	4,34 ± 0,12.
Експериментальна група, n = 30	10,01 ± 0,67*	0,55 ± 0,003*	6,58 ± 0,14*

Примітка: див. табл. 1.

Таблиця 4
Активність супероксиддисмутази (од./г Hb)
і каталази (x 10^4/г Hb) в еритроцитах людей контрольної
та експериментальної групи (x ± SE)

Група	Показники	
	супероксиддисмутаза	каталаза
Контрольна група, n = 10	634,3 ± 8,6	482,9 ± 4,5
Експериментальна група, n = 30	1 022,3 ± 12,6*	401,8 ± 4,0*

Примітка: див. табл. 1.

Таблиця 5
Вміст відновленого глутатіону
та активність ферментів його обміну в еритроцитах людей
контрольної та експериментальної групи (x ± SE)

Група	Показники		
	глутатіон, ммоль/г Hb	глутатіон-редуктаза, ммоль/г Hb на хвилину	глутатіон-пероксидаза, ммоль/г Hb на хвилину
Контрольна група, n = 10	2,77 ± 0,11	4,65 ± 0,11	353,88 ± 3,26
Експериментальна група, n = 30	2,06 ± 0,04	3,28 ± 0,02*	290,95 ± 6,03*

Примітка: див. табл. 1.

Обговорення

Якісно-кількісні характеристики еритроцитів у людей із розладами психіки та поведінки внаслідок вживання алкоголю залежать від багатьох факторів, загальний механізм дії яких виражається в розвитку гіпоксичних станів (Bianchini & Wright, 2013). Такими факторами можуть виступати токсичні речовини, наприклад алкоголь і наркотичні речовини, які викликають найрізноманітніші порушення метаболізму в організмі людини (Hajela, 2014). Широко відома роль цих речовин у порушеннях імунної, серцево-судинної системи, органів травлення, а також патогенезі алкоголізму та наркоманії, лімітації стрес-реакції в центральній нервовій системі та периферичних органах, спотворенні антиноціоцептивної чутливості (Nielsen et al., 2012; Khalsa, 2014; Kurniasanti, 2014).

Стан мембрани еритроцитів – чутливий індикатор змін нормального перебігу фізіологічних, біохімічних та біофізичних процесів в організмі, зумовлених впливом факторів зовнішнього середовища, у тому числі психогенних, до яких належить вживання алкоголю та різні види наркоманій (Bunt, 2014).

Визначення осмотичної стійкості еритроцитів і поєднані з цим явищем зміни їх форми – важливий метод дослідження у біології та діагностики в медицині, а також часто використовується для вивчення механізму патологічних процесів та дії деяких ліків або біологічно активних сполук (González-Alonso, 2012).

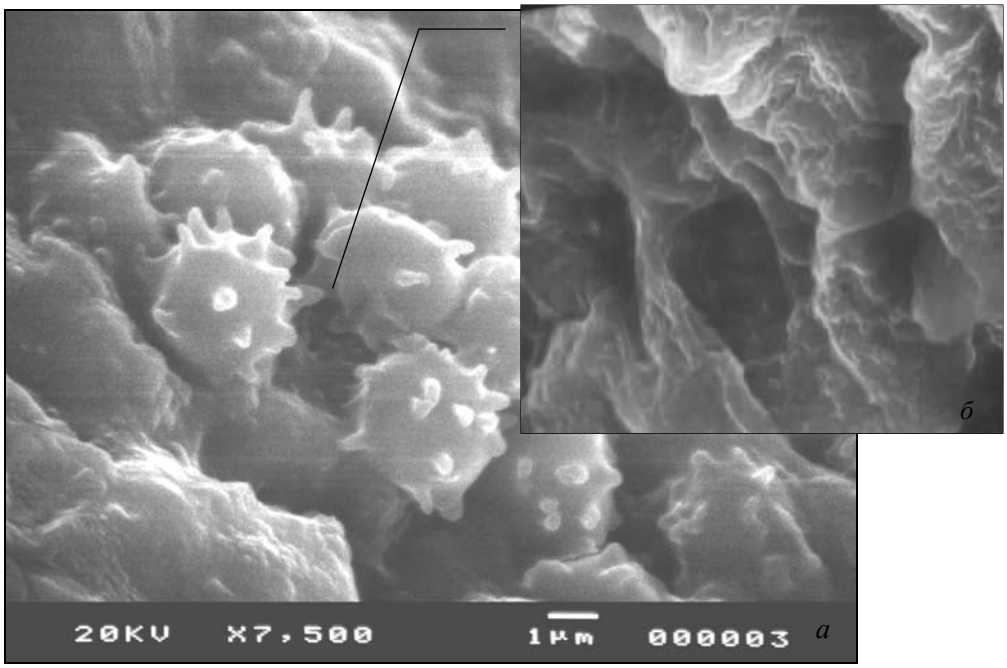


Рис. 1. Зміна поверхневого мікрорельєфу еритроцитів у пацієнта А., вік 35 років (історія хвороби № 24462/14): спостерігається збільшена кількість ехіноцитів (*а*) та утворення широких мембранних пор (*б*); сканувальна електронна мікроскопія: *а* – ˣ7 500, *б* – ˣ50 000

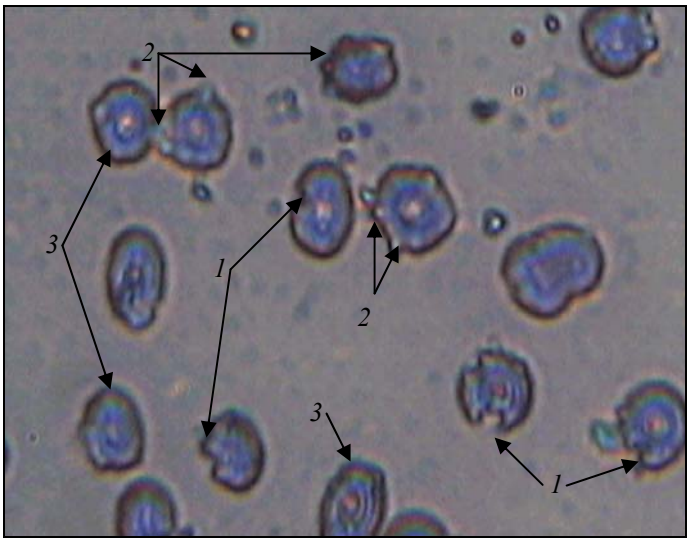


Рис. 2. Структурні перетворення еритроцитів периферичної крові пацієнта А., вік 35 років (історія хвороби №24462/14): *1* – «узуровані» клітини, *2* – шипуваті клітини, *3* – клітини-«мішені»; фазово-контрастна темнопольна мікроскопія, ˣ4 800

Виявлене нами збільшення кольорового показника у людей із розладами психіки та поведінки внаслідок вживання алкоголю вказує на нормохромний тип анемії (Ainul, 2017), а зниження швидкості осідання еритроцитів до рівня нижньої межі фізіологічної норми вказує, що система крові реагує не тільки кількісними, а і якісними змінами свого складу на вплив несприятливих факторів із метою підтримання гомеостазу (у нашому випадку, токсичний вплив продуктів метаболізму етанолу та речовин, що утворюються внаслідок порушення обміну нутрієнтів після тривалого вживання алкоголю) (Khalsa, 2014).

Зниження стійкості еритроцитів можна пояснити тим, що у людей із розладами психіки та поведінки через вживання алкоголю токсичні сполуки включаються в ліпідний шар клітинних мембран і збільшують площу поверхні їх цитоплазматичної мембрани. Це добре можна прослідкувати на прикладі структурної перебудови, яку ми спостерігали під час дослідження еритроцитів різними морфологічними методами. Нині алкоголь залишається одним із поширених і доступних у побуті токсичних речовин, який за своїми фармакологічними властивостями належить до наркотичних речовин жирного ряду. Провідними факторами, що визначають токсичну дію алкоголю, є його мембранотоксичний ефект, виснаження запасів окисненого нікотинамідаденіндинуклеотиду, утворення ацетилальдегіду та конкуренція алкоголю з іншими джерелами енергії, наприклад вуглеводами (Kutubi et al., 2016).

Алкоголь викликає розрідження клітинних мембран, зміну структури їх фосфоліпідного шару та порушення трансмембранного перенесення іонів (Kayani & Parry, 2010). Масивне навантаження алкоголем або його хронічний прийом можуть ослабити інтенсивність окиснення в печінці багатьох інших субстратів (тригліцеридів, жирних кислот, гормонів тощо), що вимагають присутності окисненого нікотинамідаденіндинуклеотиду. Існує певна кореляція між симптомами сп'яніння та зміною напрямку метаболізму серотоніну – з окиснювального на відновний тип, який відбувається в результаті накопичення у печінці відновленого нікотинамідаденіндинуклеотиду (Hafez

et al., 2016). Під час хронічного отруєння токсична дія алкоголю на організм виявляється широким спектром різних ефектів. Алкоголь чинить негативний вплив на метаболізм вуглеводів, викликає хвороби печінки, підшлункової залози, інших органів шлунково-кишкового тракту, м'язової тканини, спричинює порушення діяльності ЦНС, ендокринної системи, збільшує вірогідність розвитку серцево-судинних, інфекційних захворювань і сприяє новоутворенням. Один із найважливіших аспектів токсичної дії алкоголю на організм – його вплив на кровотвірну систему (Wigmore, 2009). Токсичний вплив на гемопоез може бути наслідком прямої дії алкоголю, вторинних порушень процесу травлення або токсичного ураження печінки. За хронічного алкоголізму можливий прояв цілої низки гематологічних синдромів. Алкоголь здатний безпосередньо індукувати макроцитоз еритроцитів. Повільне зникнення макроцитозу у період абстиненції відрізняє цей феномен від інших проявів прямої токсичної дії алкоголю на гемопоез: мегало- та сидеробластних змін, вакуолізації стовбурових гемопоетичних клітин-попередників і тромбоцитопенії.

Нерідко спостерігаються анемії, що супроводжуються гемолітичним синдромом, причина яких – підвищений гемоліз еритроцитів. Такі зміни – наслідок токсичної дії алкоголю на клітини крові, ураження печінки, викликані жировою інфільтрацією та цирозом (Renwick & Asker, 2008). Зменшується густина упаковки фосфоліпідів у мембранах еритроцитів і зростає текучість біліпідного шару в мембранах еритроцитів. Збільшується кількість холестерину та жирних кислот з індексом 18 : 1, відбувається зниження вмісту фосфатидилетаноламіну та відносної кількості жирних кислот з індексом 18 : 2. Така ж токсична дія алкоголю виявлена в мембранах клітин печінки та головного мозку. Ці зміни розглядають як адаптивні, що компенсують розріджувальну дію алкоголю на клітинні мембрани.

Зміни у складі ліпідів мембран лежать в основі молекулярних механізмів формування толерантності до алкоголю та залежності від нього. Фазовий стан рідкокристалічної структури ліпідного біошару мембрани, ступінь її текучості створюють істотний вплив на в'язко-еластичні властивості еритроцитів, їх здатність до деформації, на проникність мембран еритроцитів для води, на швидкість дифузії кисню через мембрани, на активність мембранозв'язаних ферментів. Відповідно розріджувальна дія алкоголю на ліпіди мембран порушує нормальне функціонування мембранних структур еритроцитів у цілому.

Флюїдизувальна (розріджувальна) дія алкоголю на мембрани еритроцитів пояснюється його вбудовою у поверхневі ділянки мембран між полярними групами фосфоліпідів. Між мембранами еритроцитів і плазмою крові відбувається постійний обмін ліпідами. Жирні кислоти, пов'язані з альбуміном плазми, включаються до складу фосфатидилхоліну мембран еритроцитів у ході реакцій ацилювання лізофосфатидилхоліну. Цей процес вимагає енергетичних витрат.

Надходження холестерину в мембрани еритроцитів здійснюється пасивно, тобто в мембрану еритроцитів включається тільки вільний холестерин, не пов'язаний із жирними кислотами. Рівень вільного холестерину в плазмі крові залежить від активності ферменту фосфатидилхолін-холестеринацилтрансферази, який синтезується в печінці та здійснює перенесення жирної кислоти від фосфатидилхоліну до холестерину з утворенням ефірів холестерину. Високий вміст холестерину в мембранах еритроцитів у хворих на алкоголізм пояснюють порушенням синтезу фосфатидилхолін-холестеринацилтрансферази в результаті ураження печінки. Внаслідок цього у плазмі крові зростає кількість вільного холестерину, який включається в мембрани еритроцитів.

У наших дослідженнях у людей із розладами психіки та поведінки внаслідок вживання алкоголю з явними ознаками ураження печінки виявлені значні зміни складу ліпідів у мембранах еритроцитів і, як наслідок, поява акантоцитів і мішеноподібних клітин. Поява еритроцитів мішеноподібної форми зумовлена підвищеним вмістом у мембранах холестерину та фосфатидилхоліну, молярне відношення холестерин / фосфоліпіди зростає на 15,0%. Помірний гемоліз у людей із розладами психіки та поведінки через вживання алкоголю за появи мішеноподібних еритроцитів зумовлений наявністю портальної гіпертензії та спленомегалії, характерними для цирозу печінки. Більш виражений гемоліз зі зниженням величини гематокриту до 16,0% спостерігається в осіб із цирозом печінки при появі у крові акантоцитів – еритроцитів із нерівним контуром мембрани. У результаті зростає мікров'язкість мембран акантоцитів, погіршуються їх реологічні властивості, що ймовірно, і зумовлюють розвиток гемолітичної анемії разом із портальною гіпертензією та спленомегалією.

У людей із розладами психіки та поведінки внаслідок вживання алкоголю з ураженням печінки можуть з'являтися еритроцити з ротоподібною смугою та проясненням у центрі, так звані стоматоцити, які під час сканувальної електронної мікроскопії мають вигляд товстостінної чаші. Середній об'єм стоматоцитів достовірно збільшений. Вміст холестерину, триацилгліцеридів, ціанкоболаміну, фолієвої кислоти у крові таких пацієнтів немає залежності від наявності чи відсутності стомацитів.

Трансформацію дискоцит-стоматоцит викликають агенти, що блокують роботу кальцієвого насосу еритроцитів. У результаті в їх цитоплазмі зростає концентрація іонів кальцію, що спричинює агрегацію молекул білка спектрину, локалізованого на цитоплазматичній поверхні мембрани. Для деформації мембрани стоматоцита потрібне велике зусилля порівняно з мембраною дисокоцита.

Про важливу роль процесів перекисного окиснення ліпідів у механізмі пошкодження еритроцитів у випадку вживання алкоголю свідчать результати дослідження (Miller, 2012), які виявили низький рівень альфа-токоферолу у плазмі крові та ліпідах мембран еритроцитів у людей із розладами психіки та поведінки внаслідок вживання алкоголю та синдромом Циве, а також зниження в них кількості відновленого глутатіону, аденозинтрифосфорної кислоти, 2,3-дифосфогліцерату, нестабільність піруваткінази та низьку стійкість клітинниої мембрани до перекисного гемолізу.

Для синдрому Циве у людей із зазначеними розладами психіки та поведінки характерні помірна анемія, гіпербілірубінемія, жирова інфільтрація та незначні зміни функції печінки. Гемоліз еритроцитів пояснюють збільшенням у плазмі крові кількості лізоформ фосфоліпідів, вільних жирних кислот і стероїдів. У процес перекисного окиснення у першу чергу залучаються молекули фосфоліпідів, до складу яких входять ненасичені жирні кислоти. При цьому зростає мікров'язкість мембран, зменшується їх текучість. Це дозволяє розглядати активацію процесів перекисного окиснення ліпідів як швидку компенсаторну реакцію, що забезпечує впорядкованість структури мембран еритроцитів за лізуючої (флюїдизуючої, розріджувальної) дії алкоголю.

Цитоскелет мембрани еритроцитів – міцна, гнучка, еластична сітка, утворена білками на внутрішній поверхні ліпідного біошару мембрани еритроцитів. Це важлива функціональна структура, яка визначає в'язкість і еластичні властивості мембран еритроцитів. Порушення метаболізму еритроцитів, зниження рівня аденозинтрифосфорної кислоти, відновленого глутатіону супроводжуються змінами з боку цитоскелета еритроцитів, утворенням макромолекулярних білкових агрегатів, низькою здатністю еритроцитів до деформації і стаєть причиною розвитку гемолітичних анемій.

Значення фазового стану мембрани, ступінь її текучості для нормального функціонування еритроцитів дозволяють розглянути активацію процесів перекисного окиснення ліпідів, зміни ліпідного складу мембран (збільшення відношення холестерин / фосфоліпіди, зменшення вмісту ненасичених кислот), зниження кількості мембранозв'язаних гліканів за дії алкоголю, як адаптивні, що компенсують розріджувальну дію алкоголю на мембрани еритроцитів. Проте подібні зміни негативно позначаються на активності мембранозв'язаних ферментів, метаболізмі та реологічних властивостях еритроцитів, що посилюється пошкодженнями печінки та порушеннями ліпідного обміну. Зрештою, це – причина розвитку в людей із розладами психіки та поведінки внаслідок вживання

алкоголю гемолітичного синдрому. У результаті наших досліджень виявлено специфічні особливості осмотичної резистентності еритроцитів у людей із зазначеними розладами психіки та поведінки, які полягають у прогресуючому зменшенні кількості дископодібних еритроцитів зі зниженням концентрації розчину хлориду натрію, що вказує на підвищену текучість мембранних білків (Najafipour & Beik, 2016).

У патогенезі багатьох нозологічних одиниць, пов'язаних з уживанням алкоголю, першорядна роль надається не стільки самому терміну вживання алкоголю пацієнтами, як окисному стресу в різних клітинах. Еритроцити розглядаються багатьма авторами як пасивні «клітини-інформатори», проте залишаються мало вивченими (Renwick & Asker, 2008). У процесі виконання одного із завдань даного дослідження, яке стосувалося питання, чи змінюється антиоксидантний стан еритроцитів у людей із розладами психіки та поведінки внаслідок вживання алкоголю та в якій мірі, ми показали, що в разі посилення окисного стресу в еритроцитах виявляється пониження активності глутатіонпероксидази за підвищення концентрації перекису водню та органічних гідропероксидів, із паралельним зниженням співвідношення глутатіон / глутатіондисульфід і активності глутатіонтрансферази.

Виявлена нами активація метаболізму еритроцитів, що проявляється накопиченням 2,3-дифосфогліцерату та лактату, може бути направлена не тільки на енергозабезпечення цих клітин і поліпшення оксигенації тканин шляхом зниження спорідненості гемоглобіну до кисню, а й на підтримку функціональної активності системи антиоксидантного захисту. Зокрема, відомо, що відновлений нікотинамідаденіндинуклеотид необхідний для реактивації супероксиддисмутази, що втратила активність у результаті накопичення неорганічних пероксидів (Miller, 2012). З урахуванням того, що система антиоксидантного захисту виконує особливу роль у захисті еритроцитів від пошкодження в умовах високого парціального тиску кисню, ми визначили деякі її показники, які вказують на приріст активності супероксиддисмутази та зменшення активності каталази. Таким чином, в еритроцитах людей із розладами психіки та поведінки внаслідок вживання алкоголю відбуваються протилежно направлені зміни активності супероксиддисмутази та каталази, що створює передумови для активації вільнорадикальних процесів.

Виявлене нами зростання вмісту глутатіону на фоні збільшення активності глутатіонредуктази служить для забезпечення функціонування глутатіонпероксидази. Враховуючи залежність глутатіонової системи від пулу відновленого нікотинамідаденіндинуклеотидфосфату та відновленого нікотинамідаденіндинуклеотиду, підвищення продукції лактату в еритроцитах, на наш погляд, відображає активацію гліколізу з метою захисту мембрани та гемового заліза від активних форм кисню. Виявлена динаміка показників свідчить про прооксидантне навантаження за вживання алкоголю та спроби компенсувати дисбаланс у першій лінії системи антиоксидантного захисту.

Треба зазначити, що проведення паралельних біохімічних, біофізичних і морфологічних досліджень еритроцитів розширює можливості встановлення глибини ураження організму, а також дає можливість широкому колу дослідників виявляти ефективність лікувально-профілактичних заходів для лікування алкоголізму та наркоманії.

Висновки

Дослідження кількісного складу еритроцитів і гемоглобіну, а також їх співвідношення в людей із розладами психіки та поведінки внаслідок вживання алкоголю виявило зниження кількості еритроцитів і гемоглобіну на 42,2% і 25,1% відповідно, що свідчить про наявність у них анемічної гіпоксії.

У людей із такими розладами психіки та поведінки відзначається зниження осмотичної стійкості еритроцитів до гемолізу за різної концентрації натрію хлориду.

Погіршення стану еритроцитарних мембран тісно корелює зі зменшенням розмірів еритроцитів, а також різними змінами їх мікрорельєфу. Понижена активність глутатіонпероксидази в еритроцитах має високу специфічність у всіх обстежених пацієнтів експериментальної групи, тому цей показник може служити новим маркером для таких людей, а зміни інших показників окисного стресу відображають неспецифічні порушення в організмі у відповідь на тривале вживання алкоголю.

References

Ainul, M., Badrul, M., & Sultana, T. (2017). Efficient approach to detect hypochromic and normochromic anemia through image processing. Journal of Computer Applications, 159(2), 1–5.

Bergamini, C., Gambetti, S., Dondi, A., & Cervellati, C. (2004). Oxygen, reactive oxygen species and tissue damage. Current Pharmaceutical Design, 10(14), 1611–1626.

Bianchini, K., & Wright, P. A. (2013). Hypoxia delays hematopoiesis: Retention of embryonic hemoglobin and erythrocytes in larval rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, during chronichypoxia exposure. Journal of Experimental Biology, 216(23), 4415–4425.

Billieux, J. (2014). Overview of internet addiction. Alcohol and Alcoholism, 49(1), 19.

Bunt, G. (2014). Nutritional and alternative interventions in addiction medicine. Alcohol and Alcoholism, 49(1), 31.

Chick, J. (2014). Recovery: Twelve simple steps to life beyond addiction. Alcohol and Alcoholism, 50(1), 103–105.

Eve, D., Steele, M., Sanberg, P., & Borlongan, C. (2016). Hyperbaric oxygen therapy as a potential treatment for post-traumatic stress disorder associated with traumatic brain injury. Neuropsychiatric Disease and Treatment, 12(2), 2689–2705.

Foroughi, M., Maghsoudi, Z., & Askari, G. (2016). The effect of vitamin D supplementation on blood sugar and different indices of insulin resistance in patients with alcoholic fatty liver disease (NAFLD). Iran Journal of Nurse Midwifery Research, 21(1), 100–104.

González-Alonso, J. (2012). ATP as a mediator of erythrocyte-dependent regulation of skeletal muscle blood flow and oxygen delivery in humans. Journal of Physioljgy, 590(20), 5001–5013.

Hafez, E., Hamad, M., Fouad, M., & Abdel-Lateff, A. (2016). Auto-brewery syndrome: Ethanol pseudo-toxicity in diabetic and hepatic patients. Human and Experimental Toxicology, 4, 1–6.

Hajela, R. (2014). Assessment, diagnoses and treatment for addiction is addiction. Alcohol and Alcoholism, 49, 8–9.

Kayani, M. A., & Parry, J. M. (2010). The *in vitro* genotoxicity of ethanol and acetaldehyde. Toxicology, 24(1), 56–60.

Khalsa, J. H. (2014). Nutrients, nutrition, nutrigenomics and nutrigenetics in addiction disorders. Alcohol and Alcoholism, 49(1), 31.

Ko, C. H. (2014). The next step of internet addiction in Taiwan. Alcohol and Alcoholism, 49(1), 39.

Koivu, S. (2014). Palliative care equality for people with IV drugaddiction. Alcohol and Alcoholism, 49(1), 65.

Koob, G. F. (2014). Addiction as a reward, stress and executive function disorder. Alcohol and Alcoholism, 49(1), 11.

Kurniasanti, K. S. (2014). Psychiatric trainee's perspective towards addictionin university of Indonesia. Alcohol and Alcoholism, 49(1), 53.

Kutubi, A., Giles, S., & Brennan, D. (2016). Investigating the effects of early embryonic ethanol exposure on primary cilium morphology. Reproductive Toxicology, 64, 46.

Leggio, L. (2011). Alcohol and tobacco. Medical and sociological aspects of use, abuse and addiction. Alcohol and Alcoholism, 46(3), 366.

Miller, R. R. (2012). Ethanol-induced lipid peroxidation and apoptosis in embryopathy. Alcohol, nutrition, and health consequences. Humana Press, New York.

Moskalewicz, J., Razvodovsky, Y., & Wieczorek, L. (2016). East-west disparities in alcohol-related harm. Alcoholism and Drug Addiction, 29(4), 209–222.

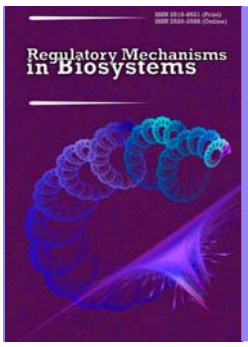
Najafipour, H., & Beik, A. (2016). The impact of opium consumption on blood glucose, serum lipids and blood pressure, and related mechanisms. Front Physiology, 7, 436–440.

Nielsen, D. A., Bahl, A. H. A., Varma, P., Kellogg, S., Borg, L., & Kreek, M. J. (2012). Former heroin addicts with or without a history of cocaine dependence are more impulsive than controls. Drug and Alcohol Dependence, 124, 114–120.

Oslin, D. (2011). Personalized addiction treatment: How close are we? Alcohol and Alcoholism, 46(3), 231–232.

Raheb, G., Khaleghi, E. A., Moghanibashi-Mansourieh, F., Farhoudian, A., & Teymouri, R. (2016). Effectiveness of social work intervention with a systematic approach to improve general health in opioid addicts in

addiction treatment centers. Psychology Research Behaviour Management, 9, 309–315.
Rehm, J., & Poznyak, V. (2015). On monitoring unrecorded alcohol consumption. Alcoholism and Drug Addiction, 28(2), 79–89.
Renwick, J. H., & Asker, R. L. (2008). The time course of response of erythrocyte volume to ethanol and to its withdrawal. Clinical and Laboratory Haematology, 4(3), 325–326.
Welle-Strand, G. K. (2014). Norway: A new full specialty in addiction medicine. Alcohol and Alcoholism, 49(1), 13–14.
Wigmore, J. G. (2009). Blood ethanol concentrations are less stable than serum or plasma upon storage because of oxyhemoglobin-mediated oxidation of ethanol to acetaldehyde. Journal of Analytical Toxicology, 33(3), 182–183.



Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(2), 118–123
doi: 10.15421/021720

Structural changes in skeletal muscles in hypokinesia and physical loading in the posthypokinetic period of recovery of rats' organisms

S. L. Popel'

Precarpathian V. Stefanyk National University, Ivano-Frankivsk, Ukraine

Article info

Received 25.02.2017
Received in revised form 20.03.2017
Accepted 23.03.2017

Precarpathian V. Stefanyk National University, Shevchenko str., 57, Ivano-Frankivsk, 76000, Ukraine.
Tel.: +38-097-87-41-446.
E-mail: popelsergij@gmail.com

Popel', S. L. (2017). Structural changes in skeletal muscles in hypokinesia and physical loading in the posthypokinetic period of recovery of rats' organisms. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(2), 118–123. doi:10.15421/021720

This article reports the study of histo-ultrastructural changes of different structural components of the direct muscle of the thigh of sexually mature male rats over a prolonged period of hypokinesia and subsequent application of the physical loading of average aerobic power. Using a light optical, electronic microscope (for the exposure of structural transformations of muscle components) and histochemical (for determination of activity of succinate dehydrogenase according to the Nahlas method to identify muscle fibers with different phenotypes) methods, we studied the structural manifestations of adaptation of muscle fibres under prolonged (240 day) hypokinesia and 15–30 episodes of physical loading of average aerobic power in the posthypokinetic period among 55 sexually mature rats. Under prolonged hypokinesis we primarily observed changes in the intramuscular network and morphometric changes in the blood vessels. These data closely correlate with the progression of changes of the subcellular components responsible for energetic and flexible balance of muscle fibres. We found that fast oxygen-glycolytic muscle fibers and their peripheral nervous apparatus are the most sensitive to prolonged hypokinesia. As a result of application of the physical loading of average aerobic power, reparative regeneration is intensified, which substantially shortens the period of recovery of structural-functional properties of skeletal muscles in the conditions of hypokinetic disorders. Thus, in prolonged hypokinesia, changes primarily affect the sources of blood supply to skeletal muscles, with the secondary development of reverse processes in muscle fibers and peripheral nervous apparatus with certain morphometric signs.

Keywords: hypokinesia; muscle fibers; blood vessels; physical loading

Структурні зміни в скелетних м'язах за гіпокінезії та фізичного навантаження у постгіпокінетичному періоді відновлення організму щурів

С. Л. Попель

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

Вивчено гістоультраструктурні зміни різних структурних компонентів прямого м'яза стегна статевозрілих щурів-самців у віддалені терміни гіпокінезії та за подальшого застосування фізичного навантаження середньої аеробної потужності. Світлооптичним, електронномікроскопічним (для виявлення структурних перетворень м'язових компонентів) і гістохімічним (для визначення м'язових волокон різного фенотипу за активністю сукцинатдегідрогенази за Нахласом) методами у 55 статевозрілих щурів вивчали структурний слід адаптації м'язових волокон за тривалої (240 діб) гіпокінезії та 15–30-разового фізичного навантаження середньої аеробної потужності у післягіпокінетичному періоді. За тривалої гіпокінезії у першу чергу спостерігали зміни внутрішньом'язової ангіоархітектоніки з подальшим морфометричним перекаблюванням гемокапілярів. Ці дані тісно корелюють із прогресуючими змінами субклітинних компонентів, відповідальних за енергетичний і пластичний баланс м'язових волокон. Швидкі окисно-гліколітичні м'язові волокна та їх периферичний нервовий апарат найчутливіші до тривалої гіпокінезії. У результаті фізичного навантаження середньої аеробної потужності інтенсифікується фізіологічна регенерація, що істотно скорочує терміни відновлення структурно-функціональних властивостей скелетних м'язів за гіпокінетичної хвороби. Таким чином, за тривалої гіпокінезії первинні зміни торкаються джерел кровопостачання скелетних м'язів, із вторинним розвитком зворотних процесів у м'язових волокнах і периферичному нервовому апараті з певними морфометричними ознаками.

Ключові слова: гіпокінезія; м'язові волокна; гемокапіляри; фізичне навантаження

Вступ

Одна з причин зростання цілої низки захворювань серцево-судинної та ендокринної системи – зниження рівня рухової активності. Це послужило основою для виділення такої нозологічної одиниці як гіпокінетична хвороба (Guttridge, 2012; Afonin, 2016). На сучасному етапі розвитку морфологічної науки не з'ясовані окремі аспекти впливу тривалої гіпокінезії на органи опорно-рухо-

вого апарату, тому подальше дослідження цього питання залишається актуальною науковою проблемою. Зміни в організмі людини викликають підвищену увагу не тільки лікарів та фізіологів, а й спеціалістів у галузі фізичної культури та спорту, оскільки вирішення цієї проблеми може створити основу для розробки оптимальних рухових режимів у людей різного віку та статі, враховуючи специфіку їх професії (Kyba, 2016).

Багато авторів (Voigt, 2010; Ishikura et al., 2012; Zorbas et al., 2012), відмічають успіхи морфологічних досліджень із застосуванням електрофізіологічних методів та мікродіалізу, що дало змогу вивчити характер порушень у коркових ядрах рухових аналізаторів в умовах експериментальної моделі гіпокінезії та, більш широко, подати характеристику змін за метаболічного синдрому, де пониження рівня рухової активності відіграє особливу роль.

Незважаючи на ці успіхи, у сучасній нейроморфології питанням впливу гіпокінезії на складові компоненти скелетних м'язів не приділяється належна увага (Aguado et al., 2017). Залишається не вирішеною проблема чутливості м'язових волокон різного фенотипу до гіпокінезії, а також реакція гемомікроциркуляторного русла за таких умов (Schiaffino et al., 2016).

Деструктивні процеси в скелетних м'язах достатньо часто виникають на грунті попередньої тривалої гіпокінезії (Amtage et al., 2013; Afonin, 2016), яка часто зумовлена умовами життя, особливостями професії, віком, різноманітними захворюваннями, іммобілізацією різних частин тіла людини після травм опорно-рухового апарату (Leermakers and Gosker, 2016). У дослідженнях окремих авторів (Zorbas et al., 2012; Tylicki et al., 2015) показана зміна не тільки функції, а й метаболізму в скелетних м'язах за гіпокінезії-гіподинамії, однак дані про їх структурну перебудову за таких умов залишаються фрагментарними та потребують подальшого вивчення (Nevo et al., 2010; Sakuma et al., 2014). Пошук чинників, які прискорюють відновлення функції скелетних м'язів після тривалої гіпокінезії, дозволив виявити позитивний вплив дозованого фізичного навантаження на їх фізіологічну регенерацію (Schiaffino et al., 2013). Враховуючи його потужний стимулювальний вплив на різноманітні органи та тканини людського організму (Shpakov et al., 2010), ми поставили за мету дослідження виявити особливості структурної перебудови м'язових волокон за гіпокінезії та дозованого фізичного навантаження у постгіпокінетичному відновному періоді.

Матеріал і методи досліджень

Експеримент проведений на 55 дорослих щурах-самцях лінії Вістар. У першій серії експерименту обмеження рухової активності (240 діб) проводили у спеціальних клітках-пеналах (4). Досліджували структуру прямого м'яза стегна. Забір матеріалу під час експериментальної тривалої гіпокінезії проводили через 90, 180 (по 5 тварин у кожному терміні дослідження) і 240 діб (15 тварин). Контрольна група складалася з 15 інтактних тварин, яких утримували у стандартних умовах віварію, та по 5 тварин виводили з експерименту у вказані вище терміни для дотримання чистоти експерименту, щоб усунути вплив вікових змін на результати мрофометричного аналізу в кожному терміні дослідження.

У другій серії експерименту у 10 тварин, які заздалегідь витримали умови тривалої гіпокінезії протягом 240 діб, фізичне навантаження середньої аеробної потужності моделювали в тредмілі (щоденні тренування упродовж 15 хвилин за швидкості бігу 20 м/хв). Після чого їх виводили з експерименту через 15 і 30 діб (по 5 тварин у кожен термін). Контроль проводили з результатами, одержаними у 5 тварин попередньої групи, тобто після 240 діб тривалої гіпокінезії. Всі дослідження проведені згідно з «Правилами проведення робіт із використанням лабораторних тварин».

Матеріал для гістологічного дослідження обробляли гематоксиліном і еозином за загальноприйнятою методикою. Для дослідження м'язових тканин за Більшовським – Грос шматочки об'ємом 0,5 $см^3$ фіксували в рідині, яка складається з рівних частин 96,0% спирту, нейтрального формаліну та насиченого розчину миш'яковистої кислоти протягом 1 години. Потім їх без промивання переносили в 12% нейтральний формалін на 10 діб. Після цього шматочки сполоскували у дистильованій воді та різали на заморожувальному мікротомі (МКП-4, ПО "ХЗМТ", Харків, Україна). Зрізи товщиною 25 мкм переносили в 20% розчин азотнокислого срібла, де час їх перебування встановлювали дослідним шляхом, і продовжували процедуру імпрегнації на окремих зрізах. Потім зрізи швидко проводили через 4–5 ємностей, наповнених 20% формаліном, приготованим на водопровідній воді, поміщали у розчин аміачного срібла. Невеликий об'єм 20% розчину азотнокислого срібла титрували на годинниковому склі краплями 25% розчину аміаку, поки не зникне осад. У цьому розчині зрізи імпрегнували під контролем мікроскопа. Після закінчення імпрегнації їх поміщали на 10–15 хв в аміачну воду, а потім на декілька годин – у дистильовану воду для промивання. Одержані зрізи монтували на лабораторних скельцях і покривали полістеролом.

Для визначення м'язових волокон різного фенотипу проводили гістохімічну реакцію на активність сукцинатдегідрогенази за Нахласом (Schiaffino and Reggiani, 2012). Для електронно-мікроскопічного дослідження матеріал готували за загальноприйнятою методикою. Ультратонкі зрізи отримували на ультрамікротомі УМТП-6М (ВО "СЕЛМІ", Україна), контрастували за методикою Рейнольдс і переглядали в електронному мікроскопі ПЕМ-125 К (ВО "СЕЛМІ" Україна) з прискорювальною напругою 75 кВ із подальшим фотографуванням за збільшення від 1 200 до 20 000 разів. Напівтонкі зрізи завтовшки 1 мкм фарбували 1% спиртним розчином метиленового синього з додаванням 0,4% розчину їдкого натрію.

Гістологічні препарати та напівтонкі зрізи вивчали під світловим мікроскопом МС 300 (ТХР, Австрія) та фотографували за допомогою Digital camera for microscope DCM 900 (ТХР, Австрія).

Морфометрію здійснювали в усіх тварин на 20 препаратах по кожному терміну дослідження за допомогою програмного забезпечення «Image J» (NIH, USA) в автоматичному або ручному режимі з урахуванням збільшень. Структурні зміни на певному етапі дослідження аналізували в 50 полях зору та визначали: 1) загальну кількість м'язових волокон на 1 $мм^2$ площі поперечного перерізу, 2) товщину м'язових волокон, 3) абсолютну та відносну кількість гемокапілярів, 4) діаметр їх просвіту, 5) об'ємну частку сполучної та жирової тканини, 6) кількість фібробластів і макрофагів (Bosurgi et al., 2011).

Статистичну обробку даних проводили за допомогою програмного пакета Statistica 6 (StatSoft Inc., USA). Застосовували непараметричні методи дослідження (критерій Уілкоксона, Манна – Уїтні). Вибіркові параметри, наведені далі в таблиці та тексті, мають такі позначення: x – вибіркове середнє, SE – стандартна помилка середнього. Статистичні відмінності вважали вірогідними за $P < 0,05$.

Результати

Дані про зміну морфометричних показників м'язових волокон у різні терміни тривалої гіпокінезії та після фізичного навантаження середньої аеробної потужності наведені в таблиці. Через 90 діб після початку моделювання тривалої гіпокінезії на різних ділянках прямого м'яза стегна спостерігається виражений набряк і проліферація клітинних елементів навколо судинно-нервових пучків. Порівняно з контрольною групою тварин на 50% збільшується кількість клітин фібробластичного ряду ($P < 0,05$). Саркоплазма має низьку електронно-оптичну щільність, містить підвищену кількість піноцитозних пухирців, лізосом, залишкових тілець і аутофагосом (рис. 1). Ядра у м'язових волокнах містять маргінально розташований хроматин та зміщені до середини волокна. Цистерни саркоплазматичної сітки розширені, в мітохондріях виявляються редуковані кристи, порушується правильна конфігурація Z-ліній. У м'язових волокнах через 180 діб від початку моделю-

вання тривалої гіпокінезії міофібрили розволокнені (рис. 2). Саркоплазма вакуолізована, виявляється значна кількість мієліноподібних тілець. Матрикс мітохондрій має низьку електронно-оптичну щільність. Розмір мітохондрій збільшується, а кристи зменшуються та піддаються фрагментації, концентруються в основному в зонах деструкції міофібрил, спостерігається підвищена кількість лізосом і осміофільних включень. Через 240 діб від початку моделювання тривалої гіпокінезії на фоні зменшення явищ гідратації збільшується кількість м'язових волокон із деструктивно-атрофічними та паранекротичними явищами. При цьому спостерігається збільшення кількості клітин сполучнотканинного ряду (фібробластів, макрофагів, жирових клітин), а також збільшується кількість невпорядкованих пучків колагенових волокон поблизу м'язових волокон і мікросудин.

Таблиця 1

Динаміка зміни морфометричних параметрів прямого м'яза стегна за тривалої гіпокінезії та після дозованого фізичного навантаження (x ± SE, n = 55)

Показники	Контрольна група (n = 15)	Тривала гіпокінезія, діб			Тривала гіпокінезія + фізичне навантаження середньої аеробної потужності, разів	
		90 (n = 5)	180 (n = 5)	240 (n = 5)	15 (n = 5)	30 (n = 5)
Кількість м'язових волокон на 1 мм^2 площі поперечного перерізу	997 ±36,7	345 ± 23,1*	141 ± 31,2*	97 ± 10,3*	374 ± 14,5$^{\#}$	466 ± 21,4$^{\#}$
Абсолютна кількість гемокапілярів	82 ± 4,5	42 ± 3,3*	21 ± 2,5*	16 ± 1,4*	45 ± 3,2$^{\#}$	52 ± 4,7
Відносна кількість гемокапілярів	12,1 ± 0,22	8,2 ± 0,46	6,7 ± 0,33*	6,1 ± 0,25*	8,3 ± 1,07$^{\#}$	9,0 ± 1,98
Об'ємна частка сполучної тканини, %	8,0 ± 0,16	14,0 ± 0,85*	18,0 ± 1,11*	25,0 ± 1,95*	19,0 ± 0,85	8,0 ± 0,23$^{\#}$
Кількість фібробластів	5,0 ± 0,11	10,0 ± 0,55*	17,0 ± 0,29*	26,0 ± 3,12*	12,0 ± 1,33$^{\#}$	12,0 ± 0,81
Кількість макрофагів	2,0 ± 0,01	5,0 ± 0,34*	6,0 ± 1,03*	5,0 ± 1,84*	15,0 ± 1,94$^{\#}$	7,0 ± 0,63$^{\#}$
Об'ємна частка жирової тканини, %	4,0 ± 0,09	15,0 ± 0,62*	19,0 ± 1,88*	24,0 ± 1,71*	12,0 ± 0,32$^{\#}$	4,0 ± 0,15$^{\#}$

Примітки: * – P < 0,05 порівняно з контрольною групою; # – P < 0,05 порівняно з показниками попередньої групи спостереження.

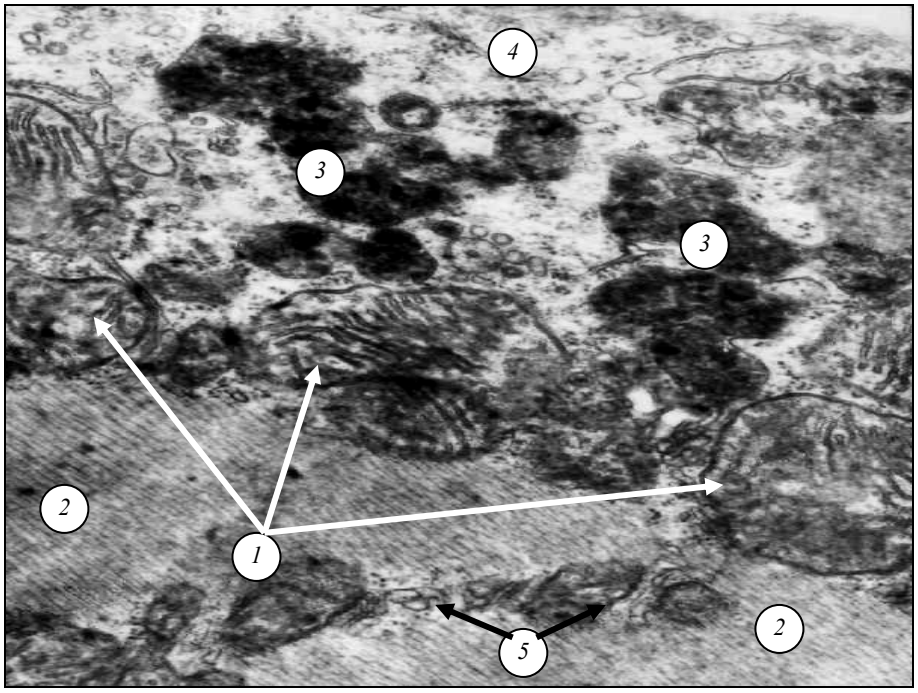


Рис. 1. Концентрація аутофагосом і залишкових тілець у ділянці локальної деструкції м'язового волокна через 90 діб після початку моделювання гіпокінезії: *1* – мітохондрія, *2* – міофібрили, *3* – залишкові тільця, *4* – саркоплазма, *5* – цистерни саркоплазматичної сітки; збільшення ^{x}12 000

М'язові волокна потоншуються, на окремих ділянках не мають поперечної смугастості, іноді утворюють локальні потовщення в цей період експерименту. Деструктивні зміни за даними електронномікроскопічного дослідження мають дифузний характер: діаметр м'язових волокон зменшується, в окремих із них спостерігаються зони лізису, поряд з якими збільшується кількість вторинних лізосом, залишкових тілець і аутофагосом. Контури ядер у м'язових волокнах змінюються, нуклеоплазма має низьку електронно-оптичну щільність та містить маргінований хроматин. Мітохондрії з матриксом низької електронно-оптичної щільності, фрагментованими та значно редукованими кристами. Іноді спостерігається руйнування зовнішньої мембрани, що викликає зменшення кількості швидких гліколітичних волокон, пониження активності сукцинатдегідрогенази у швидких окисно-гліколітичних волокнах і появу окремих деферментованих волокон (рис. 3).

Фізичне навантаження середньої аеробної потужності після тривалої гіпокінезії створює виражений та швидкий відновний ефект. Після 15-разового фізичного навантаження значно знижується кількість ділянок деструкції м'язових волокон. Паранекротичні ділянки практично не зустрічаються, спостерігаються тільки витончені, спіралеподібно скручені м'язові волокна без поперечної смугастості. Порівняно з результатами попередньої серії дослідження зменшується також набряк в ендомізії. При цьому (табл.) утричі збільшується кількість макрофагів, удвічі зменшується кількість фібробластів, у 2,2 раза – жирових включень (P < 0,05). Вищезгадані процеси відбуваються на обмежених ділянках поперечного перерізу м'язової тканини, не мають тенденції генералізації та ліквідовуються у перші 15 діб після фізичного навантаження середньої аеробної потужності. Звертає на себе увагу збільшення абсолютного числа гемокапілярів, які виявляються на площі

1 мм^2 поперечного перерізу прямого м'яза стегна (табл.). Це зумовлює збільшення площі взаємного перекриття зон кровопостачання сусідніх гемокапілярів. Збільшення кратності дії фізичного навантаження до 30 разів спричиняє появу в саркоплазмі значної кількості глікогену, канали саркоплазматичної сітки розширяються. При цьому значно зменшується відносна частка жирової тканини в ендомізії (табл.).

В ендотеліоцитах внутрішньом'язових гемокапілярів згладжується мікрорельєф люмінальної поверхні, підвищується кількість та діаметр мікропіноцитозних пухирців.

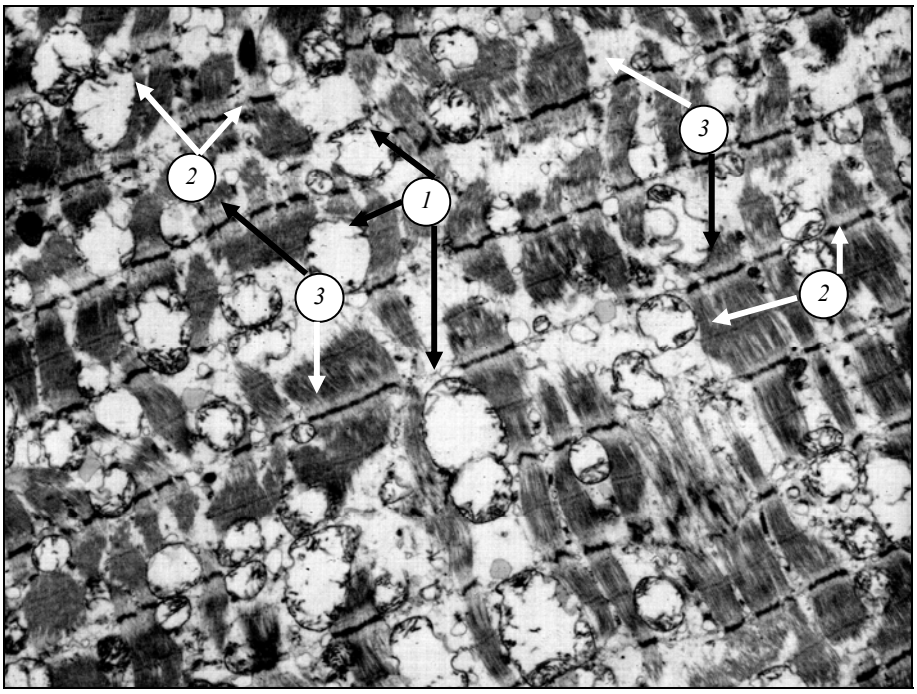


Рис. 2. Ультраструктурна організація м'язового волокна через 180 діб після початку моделювання тривалої гіпокінезії: спостерігається набряк більшості мітохондрій із вкороченням і фрагментацією крист; *1* – мітохондрія, *2* – міофібрили, *3* – Z-лінія; збільшення ^{x}6 000

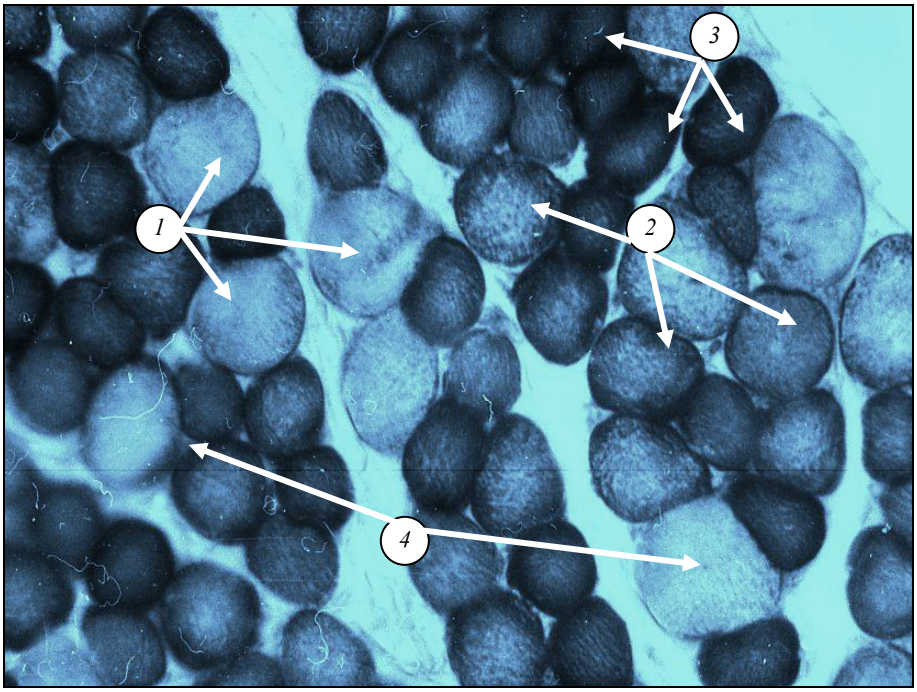


Рис. 3. Активність ферментативної реакції на сукцинатдегідрогеназу у м'язових волокнах різних типів через 240 діб після початку моделювання тривалої гіпокінезії на поперечному зрізі прямого м'яза стегна: *1* – швидкі гліколітичні м'язові волокна, *2* – швидкі окисно-гліколітичні м'язові волокна, *3* – повільні окисні м'язові волокна, *4* – деферментація м'язових волокон; метод виявлення активності сукцинатдегідрогенази за Нахласом; збільшення ^{x}600

Обговорення

Вивчення скелетних м'язів при багатьох фізіологічних і патологічних процесах підтвердило думку окремих дослідників (Shpakov et al., 2010; Suetta and Kjaer, 2010; Sumi, 2014) про досить високу чутливість їх складових до умов тривалої гіпокінезії. Виявлені зміни м'язових волокон уже через 90 діб після початку моделювання тривалої гіпокінезії свідчать про їх неспецифічність, оскільки вони часто зустрічаються за деяких міопатій (Rayavarapu et al., 2013; Sakuma, 2014), а також як реакція адаптації м'язів до метаболізму в умовах порушення мікроциркуляції крові (Schiaffino et al., 2013).

За гіпокінезії відбувається звуження просвіту гемокапілярів, затримання продуктів обміну, блокується транспорт кисню, що викликає тканинну гіпоксію (Liu et al., 2012; Sfyri et al., 2015). Вона, у свою чергу, спричиняє локальну гідратацію клітинних компонентів і позаклітинного простору у скелетних м'язах (Guttridge, 2012).

Спостерігається пониження електронно-оптичної щільності більшості мітохондрій з укороченням і фрагментацією крист, що викликає зменшення активної робочої поверхні мітохондрій, внаслідок чого створюються передумови для виникнення дефіциту макроергічних сполук, і свідчить про глибокі зміни внутрішньоклітинних метаболічних процесів (Melkonvan, 2005; Liu et al., 2012). Цистерни саркоплазматичної сітки звужуються, що може сприяти гальмуванню транспортних процесів на її мембранах. Такі зміни відображаються на гістохімічній перебудові м'язових волокон, яка проявляється декомпозицією скелетних м'язів (Guttridge, 2012; Pichavant and Pavlath, 2014). Кінцеві відділи Т-трубочок редукуються, збільшується кількість залишкових тілець, аутофагосом, мієлінових фігур – наслідок структурної трансформації м'язових волокон за тривалої гіпокінезії (Demontis et al., 2013; Merlini et al., 2014; Schiaffino et al., 2016).

Зменшення абсолютної та відносної кількості гемокапілярів за тривалої гіпокінезії викликає ішемію, внаслідок якої відбувається збільшення кількості жирових клітин та фібробластів, що служить причиною збільшення об'ємної частки сполучної тканини в цілому (Bosurgi et al., 2011; Kassem, 2014; Forcales, 2015).

Сукупність морфологічних змін у прямому м'язі стегна за тривалої гіпокінезії можна кваліфікувати як паранекротичний процес (Ciciliot and Schiaffino, 2010; Kyba, 2016). Оскільки будь-який подразник за певної сумарної інтенсивності або дози може викликати загибель клітин, вплив тривалої гіпокінезії слід розглядати як певний етап на шляху до деструкції м'язових волокон у відповідь на функціональну депривацію. Саме відсутність функції вказується як найчастіша причина морфофункціональних порушень соматичних клітин у різних тканинах організму тварин і людини (Pichavant and Pavlath, 2014; Tylicki et al., 2015; Schiaffino et al., 2016). Із цього погляду паранекроз може швидко перейти в некроз, морфологічні ознаки якого ми спостерігали в окремих м'язових волокнах у віддалені терміни тривалої гіпокінезії. Проте паранекроз відрізняється від істинного некрозу зворотністю деструктивних процесів. Тому в окремих зарубіжних публікаціях цей термін замінюється поняттям «зворотне пошкодження». Відмінності перебігу цього процесу залежно від природи або дози діючого чинника на різні тканини вивчали багато авторів (Amtage et al., 2013; Polkovenko, 2014; Aguado et al., 2017). Вони зазначають, що зворотні пошкодження характеризуються своєю неспецифічністю, оскільки дія різних чинників викликає однотипний комплекс структурних змін. Разом із такою неспецифічністю спостерігається і ціла низка специфічних ознак. Така часткова специфічність виявляється при багатьох патологічних процесах (Buričová et al., 2011; Leermakers and Gosker, 2016). Слід зазначити, що зворотні пошкодження за тривалої гіпокінезії виникають на фоні редукції внутрішньом'язової мікроциркуляції крові (Nemeth et al., 2003; Novoselova et al., 2008).

Доведено факт швидкого відновлення та активації мікроциркуляції крові під час фізичного навантаження (Gajdosik, 2001; Ertunc et al., 2010; DiFranco et al., 2015). Проте залишається поза увагою дослідників питання про енергетичну спрямованість такого навантаження. У науковій літературі, особливо в галузі фізичної культури та спорту, існують іноді діаметрально протилежні погляди на застосування фізичного навантаження анаеробного або аеробного характеру в різних реабілітаційних схемах після травм, які супроводжуються вимушеним тривалим ліжковим режимом (Deogenov et al., 2009).

Скелетні м'язи становлять окремий інтерес, оскільки від швидкості їх морфофункціонального відновлення часто залежить подальша перспектива спортсмена. Тому морфологічні дослідження закономірностей їх регенерації під час фізичного навантаження середньої аеробної потужності необхідні для розроблення сучасних реабілітаційних методик. Виявлена нами позитивна динаміка у відновленні структури мікросудин вже після 15-разового фізичного навантаження середньої аеробної потужності відображає тісний характер взаємної перебудови гемомікроциркуляторного русла та складових компонентів скелетних м'язів (Novoselova et al., 2008; Schiaffino and Patridge, 2008; Schiaffino and Reggiani, 2012).

Будучи негентропійним чинником, фізичне навантаження середньої аеробної потужності зумовлює швидкий зворотний перебіг деструктивних процесів після тривалої гіпокінезії (Abzalov and Sitdikova, 1985; Canu et al., 2003). Про це свідчить відновлення не тільки більшості внутрішньоклітинних органел, а й кількості гемокапілярів, зменшення об'ємної частки сполучної тканини та фібробластів. При цьому спостерігається збільшення кількості макрофагів, які прискорюють утилізацію продуктів розпаду м'язових волокон (Bosurgi et al., 2011).

Таким чином, прискорене відновлення скелетної м'язової тканини за впливу фізичного навантаження свідчить про стимуляцію метаболічних процесів, які реалізуються за допомогою збільшення кількості гемокапілярів та мітохондрій, що забезпечує м'язове волокно енергією та пластичним матеріалом. Потужний ефект регенерації, який спостерігається під час фізичного навантаження середньої аеробної потужності, можна пояснити впливом активного механічного розтягнення дистрофічно змінених м'язових волокон, на фоні активованого кровообігу у м'язах під час бігу тварин у тредмілі, що підтримує високий рівень метаболічних процесів.

Висновки

Тривала гіпокінезія – причина паранекротичних змін, які проявляються порушенням структури ядра, мітохондрій, саркоплазматичної сітки у більшості м'язових волокон, що на фоні деструктивних змін гемокапілярів стає причиною зниження метаболічного забезпечення внутрішньоклітинних компонентів скелетного м'яза, яке відображається у зміні ферментативної активності на сукцинатдегідрогеназу у м'язових волокнах різних фенотипів.

Дозоване фізичне навантаження аеробного характеру посилює репаративну регенерацію скелетних м'язів після тривалої гіпокінезії, що підтверджується кількісно-якісними даними морфометричного дослідження складових елементів м'язових волокон.

References

Abzalov, R. A., & Sitdikova, R. R. (1985). Effect of hypokinesia and muscular training on stroke, control patterns in rats. Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 100(2), 1043–1045.

Afonin, B. V. (2016). Dynamics of the glycemic profile in women in long-term antiorthostatic hypokinesia. Human Physiology, 42(4), 425–431.

Aguado, E., Mabilleau, G., Goyenvalle, E., & Chappard, D. (2017). Hypodynamia alters bone quality and trabecular microarchitecture. Calcified Tissue International, 100(4), 332–340.

Amtage, F., Feuerstein, T. J., Meier, S., Prokop, T., Piroth, T., & Pinsker, M. O. (2013). Hypokinesia upon pallidal deep brain stimulation of dystonia: Support of a GABAergic mechanism. Frontiers in Neurology, 4, 1–5.

Bosurgi, L., Manfredi, A., & Rovere-Querini, P. (2011). Macrophages in injured skeletal muscle: A perpetuum mobile causing and limiting fibrosis, prompting or restricting resolution and regeneration. Frontiers in Immunology, 2(11), 234–240.

Buričová, L., Škrobánek, P., & Baranovská, M. (2011). Effect of hypodynamia on structure of vestibular apparatus in Japanese quail chicks: Light microscopy. Acta Veterinaria Brno, 80(1), 125–127.

Canu, M.-H., Langlet, C., Dupont, E., & Falempin, M. (2003). Effects of hypodynamia–hypokinesia on somatosensory evoked potentials in the rat. Brain Research, 978, 162–168.

Ciciliot, S., & Schiaffino, S. (2010). Regeneration of mammalian skeletal muscle. Basic mechanisms and clinical implications. Current Pharmaceutical Design, 16(8), 906–914.

Demontis, F., Piccirillo, R., Goldberg, A. L., & Perrimon, N. (2013). Mechanisms of skeletal muscle aging: insights from *Drosophila* and mammalian models. Disease Models and Mechanisms, 6(6), 1339–1352.

Deogenov, V. A., Zorbas, Y. G., Kakuris, K. K., & Federenko, Y. F. (2009). The impact of physical exercise on calcium balance in healthy subjects during prolonged hypokinesia. Nutrition, 25(10), 1029–1034.

DiFranco, M., Yu, C., Quiñonez, M., & Vergara, J. L. (2015). In ward rectifier potassium currents in mammalian skeletal muscle fibres. Journal of Physiology, 593(5), 1213–1238.

Ertunc, M., Atalay, A., Yildirim, M., & Onur, R. (2010). Exercise and suspension hypokinesia-induced alterations in mechanical properties of rat fast and slow-twitch skeletal muscles. Acta Physiologica Hungarica, 97(3), 316–325.

Forcales, S.-V. (2015). Potential of adipose-derived stem cells in muscular regenerative therapies. Frontiers in Aging Neuroscience, 7, 1–12.

Gajdosik, R. L. (2001). Passive extensibility of skeletal muscle: Review of the literature with clinic alimplications. Clinical Biomechanics, 16(2), 87–101.

Ishikura, F., Takano, Y., & Ueyama, T. (2012). Amlodipine has a preventive effect on temporal left ventricular hypokinesia after emotional stress compared with an angiotensin II receptor blocker. Journal of Medical Ultrasonics, 40(1), 3–7.

Kassem, M. (2014). Skeletal (stromal) stem cells – basic biology and clinical use in tissue regeneration. Hamdan Medical Journal, 7(4), Suppl. 1.

Kyba, M. (ed.), 2016. Skeletal muscle regeneration in the mouse. Springer-Verlag, New York.

Leermakers, P. A., & Gosker, H. R. (2016). Skeletal muscle mitophagy in chronic disease. Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Carevolume, 19(6), 427–433.

Liu, G., MacGabhann, F., & Popel, A. S. (2012). Effects of fiber type and size on the heterogeneity of oxygen distribution in exercising skeletal muscle. PLoS ONE, 7(9), 443-475.

Melkonvan, K. (2005). Relationship between cerebrovascular diseases and hypokinesia. Atherosclerosis Supplements, 6(1), 149.

Merlini, L., Vagheggini, A., & Cocchi, D. (2014). Sarcopenia and sarcopenic obesity in patients with muscular dystrophy. Frontiers in Aging Neuroscience, 6, 1–6.

Nemeth, N., Lesznyak, T., & Brath, G. (2003). Changes in microcirculation after ischemic process in rat skeletal muscle. Microsurgery, 23(5), 419–423.

Nevo, Y., Halevy, O., Genin, O., Moshe, I., Turgeman, T., Harel, M., Biton, E., Reif, S., & Pines, M. (2010). Fibrosis inhibition and muscle histopathology improvement in laminin-alpha2-deficient mice. Muscle Nerve, 42, 218–229.

Novoselova, A. M., Custaud, M. A., Tsvirkun, D. V., Larina, I. M., & Kulchitsky, V. A. (2008). Metabolism in rats during antiorthostatic hypokinesia. Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 146(1), 38–40.

Pichavant, C., & Pavlath, G. K. (2014).Incidence and severity of myofiber branching with regeneration and aging. Skeletal Muscle, 4(1), 9.

Polkovenko, O. V. (2014). Histostructure changes in proxymal and distal metaphyses of white rats' femoral bones under experimental hypokinesia. ScienceRise, 3(1), 31–34.

Rayavarapu, S., Coley, W., Kinder, T. B., & Nagaraju, K. (2013). Idiopathic inflammatory myopathies: Pathogenic mechanisms of muscle weakness. Skeletal Muscle, 3(1), 13.

Sakuma, K., Aoi, W., & Yamaguchi, A. (2014). The intriguing regulators of muscle mass in sarcopenia and muscular dystrophy. Frontiers in Aging Neuroscience, 6, 1–7.

Schiaffino, S., & Patridge, T. (eds.), 2008. Skeletal muscle repair and regeneration. Springer, New-York.

Schiaffino, S., & Reggiani, C. (2012). Skeletal muscle fiber types. Muscle Fundamental Biology and Mechanisms of Disease, 2, 855–867.

Schiaffino, S., Dyar, K. A., Ciciliot, S., Blaauw, B., & Sandri, M. (2013). Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. FEBS Journal, 280(17), 4294–4314.

Schiaffino, S., Pereira, M. G., Ciciliot, S., & Rovere-Querini, P. (2016). Regulatory T-cells and skeletal muscle regeneration. FEBS Journal, 284(4), 517–524.

Sfyri, P., Narkar, V., & Matsakas, A. (2015). Regulation of skeletal muscle metabolic and angiogenic properties by nuclear hormone receptors: Implications for skeletal muscle regeneration. Neuromuscular Disorders, 25, 185.

Shpakov, A. V., Artamonov, A. A., Voronov, A. V., & Melnik, K. A. (2010). The effect of immersion hypokinesia on the kinematic and electromyographic parameters of human locomotion. Human Physiology, 36(7), 828–832.

Stogov, M. V. (2009). Creatine metabolism in skeletal muscles during hypokinesia. Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 148(1), 26–28.

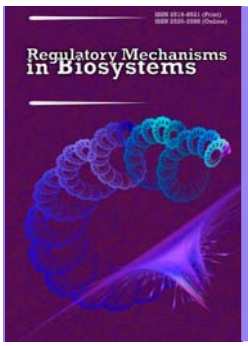
Suetta, C., & Kjaer, M. (2010).What are the mechanisms behind disuse and age-related skeletal muscle atrophy? Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports, 20(2), 167–168.

Sumi, S. M. (2014). Muscular system disorders. School of Medicine, University of Washington, Seattle.

Tylicki, A., Strumilo, J., & Kondracikowska, J. (2015). Comparative properties of pyruvate kinase and lactate dehydrogenase from muscles of pigeons with motor activity and hypodynamia. Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology, 51(1), 69–71.

Voigt, T. (2010). Early effects of carbachol on the morphology of motor endplates of mammalian skeletal muscle fibers. Marin Muscle and Nerve, 41(3), 399–405.

Zorbas, Y. G., Deogenov, V. A., Fedorov, M. A., & Federenko, Y. F. (2012). Magnesium supplementation effect on magnesium absorption during prolonged hypokinesia in rats. Trace Elements and Electrolytes, 29(1), 7–14.



Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(2), 124–134
doi: 10.15421/021721

Mechanism of changing adaptation potential and morpho-biochemical parameters of erythrocytes in students with different modes of daily activity after physical loading

S. L. Popel'*, B. M. Mytckan*, E. Y. Lapkovskyi*, B. P. Lisovskyi*, Y. N. Yatciv*, N. O. Zemskaya*, R. S. Tyagur*, T. S. Mytckan*, I. M. Tkachivska*, L. V. Kovalchuk*, O. N. Leschak*, R. I. Fayichak*, I. V. Melnik**, G. D. Markiv***

**Precarpathian National University named after V. Stefanik, Ivano-Frankivsk, Ukraine*
***Ivano-Frankivsk National Medical University, Ivano-Frankivsk, Ukraine*
****Central City Hospital, Ivano-Frankivsk, Ukraine*

Article info

Received 24.02.2017
Received in revised form 21.03.2017
Accepted 23.03.2017

Precarpathian National University named after V. Stefanik, Shevchenko Str., 57, Ivano-Frankivsk, 76018, Ukraine

Ivano-Frankivsk National Medical University, Galitcka Str., 2, Ivano-Frankivsk, 76025, Ukraine

Central City Hospital, Hetman Mazepa Str., 114, Ivano-Frankivsk, 76025, Ukraine

Tel.: +38-097-874-14-46.
E-mail: popelsergij@gmail.com

Popel', S. L., Mytckan, B. M., Lapkovskyi, E. Y., Lisovskyi, B. P., Yatciv, Y. N., Zemskaya, N. O., Tyagur, R. S., Mytckan, T. S., Tkachivska, I. M., Kovalchuk, L. V., Leschak, O. N., Fayichak, R. I., Melnik, I. V., & Markiv, G. D. (2017). Mechanism of changing adaptation potential and morpho-biochemical parameters of erythrocytes in students with different modes of daily activity after physical loading. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(2), 124–134. doi:10.15421/021721

The aim of this work was to identify morpho-functional and biochemical changes in erythrocytes in students with different daily educational -training regimens after dosed physical exertion. The study involved 50 male students aged 20–22 years who study at the Faculty of Physical Education and Sports. Of these, 25 were untrained students (control group) and 25 were students studying for the highest sports qualification who were engaged in sports in which training was conducted to improve overall endurance (skiing, biathlon, long-distance running). At the end of the school year, all students were required to carry out a single session involving physical loading of maximum intensity on a veloergometer. According to the results of the questionnaire, it was found that the combination of intensive training and training processes caused a mismatch between the functional capabilities of the students' and athletes' biological systems and the increased volume and intensity of their psycho-physical loading, which is closely correlated with a decrease in their level of physical health. In the blood of untrained students, under the influence of dosed physical activity, reversibly altered forms of erythrocyte appeared, which accounted for 2.0% of the total number of erythrocytes. In the morphological study of student athletes, an increase in the content of reversibly and irreversibly altered erythrocytes was observed, the number of which exceeded 2.0% of the total number of erythrocytes. In individual student athletes echinocytes with small-focal microdefects of the outer membrane were observed in the peripheral blood, as well as acanthocytes and stomatocytes, which have low resistance to acid hemolysis. The mechanism of this phenomenon is a decrease in the activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase and glutathione reductase, which leads to a deficiency of reduced glutathione in erythrocytes. Such cells under the influence of oxidizing agents quickly undergo lysis, which is manifested by a violation of their structural integrity. This can lead to the development of "anemia of loading", which is manifested by a decrease in the concentration of hemoglobin and the number of erythrocytes with their morphometric recalibration due to the appearance of macro-microcytic forms. The presence of such changes can adversely affect both the athletic performance and the state of health of students. This requires appropriate correction of the training process, as well as the development and timely application of adequate measures aimed at eliminating the development of the pathological process and eliminating possible undesirable consequences.

Keywords: student-athletes; physical loading; adaptive potential; somatic health; biochemical indicators

Механізм зміни адаптаційного потенціалу та морфобіохімічні параметри еритроцитів у студентів із різним режимом дня після фізичного навантаження

С. Л. Попель*, Б. М. Мицкан*, Е. І. Лапковський*, Б. П. Лісовський*, Я. М. Яців*, Н. О. Земська*, Р. С. Тягур*, Т. С. Мицкан*, І. М. Ткачівська*, Л. В. Ковальчук*, О. М. Лещак*, Р. І. Файчак*, І. В. Мельник**, Г. Д. Марків***

**Прикарпатський національний університет імені Василя Стефаника, Івано-Франківськ, Україна*
***Івано-Франківський національний медичний університет, Івано-Франківськ, Україна*
****Центральна міська лікарня, Івано-Франківськ, Україна*

Виявлено взаємозв'язок між рівнем адаптаційного потенціалу та морфобіохімічними змінами еритроцитів у студентів із різним навчально-тренувальним режимом дня після дозованого фізичного навантаженням. У дослідженні брали участь 50 студентів чоловічої статі віком 20–22 роки, які навчаються на факультеті фізичного виховання та спорту. З них 25 нетренованих (контрольна група) і 25 студентів-спортсменів вищої спортивної кваліфікації, які займалися аеробними видами спорту (лижний спорт, біатлон, тріатлон). У кінці навчального року юнаків піддавали впливу одноразового фізичного навантаження максимальної аеробної потужності на велоергометрі. У крові нетренованих студентів за впливу дозованого фізичного навантаження з'являються близько 2% зворотно змінених форм еритроцитів. Під час морфологічного дослідження у студентів-спортсменів спостерігали підвищення вмісту зворотно та незворотно змінених еритроцитів, кількість яких перевищує 2% їх загальної кількості. В окремих спортсменів у периферійній крові спостерігали ехіноцити з дрібновогнищевими мікродефектами зовнішньої мембрани, а також виявили аканто- і стоматоцити, які мають низьку стійкість до кислотного гемолізу. Механізм такого явища полягає у зниженні активності глюкозо-6-фосфат дегідрогенази та глутатіонредуктази, що спричиняє дефіцит відновленого глутатіону в еритроцитах. Такі клітини за впливу окисних агентів швидко піддаються лізису, що проявляється порушенням їх структурної цілісності. Це може спричинити розвиток «анемії навантаження», яка проявляється зниженням концентрації гемоглобіну та кількості еритроцитів з їх морфометричним перекалібруванням за рахунок появи макро-мікроцитарних форм. Наявність таких змін може негативно впливати як на спортивні результати, так і на стан здоров'я студентів, що вимагає відповідної корекції навчально-тренувального процесу, а також розроблення та своєчасного застосування адекватних заходів, спрямованих на усунення розвитку патологічного процесу та ліквідацію можливих негативних наслідків.

Ключові слова: студенти-спортсмени; фізичне навантаження; адаптаційний потенціал; соматичне здоров'я; біохімічні показники

Вступ

Сучасні умови навчання на факультеті фізичного виховання та спорту висувають до студентів певні вимоги щодо адаптаційних здібностей організму за екстремальної діяльності і, перш за все, за поєднаних значних фізичних і психоемоційних (навчальних) навантажень (Brock et al., 2009; Kang, 2016). При цьому багато студентів поєднують навчання з професійними занятями спортом різного спрямування. На думку багатьох авторів (Lorente-Catalan and Kirk, 2015; Zhu, 2015), тільки оптимальний морфофункціональний стан біологічних систем організму студентів може стати основою для успішної навчальної та професійної діяльності у спорті. Надмірні тренувальні та змагальні навантаження, насиченість та інтенсифікація графіка навчального процесу створюють негативні передумови до розвитку своєрідного передпатологічного стану, що часто спостерігається у студентів у вигляді зниження рівня адаптаційного потенціалу. Існує низка екзо- та ендогенних чинників, які можуть істотно обмежувати фізичну та розумову працездатність студентів (Lambert, 2016). Іноді той чи інший чинник, який викликав обмеження різних видів працездатності, як правило, залишається непоміченим, але через деякий час він викликає дисбаланс основних функціональних систем організму, що негативно позначається на стані соматичного здоров'я студентів. Маніфестація та генералізація цих причин може спричинити розвиток патологічних змін в організмі студентів. Своєчасне виявлення чинників, що лімітують фізичну працездатність, уміння усувати ці чинники та адекватне застосування засобів корекції допомагають не тільки досягти високих результатів одночасно в навчанні та спорті, а й зберегти соматичне здоров'я студентів (Barker et al., 2016).

Поєднана тренувально-змагальна та навчальна діяльність часто супроводжується роботою, коли у функціонально навантажених тканинах збільшується кисневий запит, тим самим підвищується навантаження на систему забезпечення організму киснем. У разі невідповідності між доставкою та підвищеною потребою тканин у кисні розвивається гіпоксія навантаження (González-Alonso, 2012; Mairbäurl, 2013). Дефіцит або порушення функціонування еритроцитів за рахунок їх структурних пошкоджень – один із чинників, що сприяє розвитку такої гіпоксії (Tan et al., 2010; Bianchini and Wright, 2013; Mohanty et al., 2014). Такі зміни структури еритроцитів у поєднанні з гіпоксією навантаження різко знижують фізичну, а потім і розумову працездатність, оскільки як і гіпоксія навантаження, так і гіпоксія за гіпокінезії, що супроводжує навчальний процес, у комплексі посилюють кисневе голодування тканин організму.

Визначення рівня адаптаційного потенціалу та з'ясування особливостей функціонування киснево-транспортних систем організму студентів із різним режимом навчальної та тренувально-змагальної діяльності та своєчасна корекція виявлених змін необхідні для нівелювання несприятливої дії поєднаних інтенсивних фізичних і навчальних навантажень, а також чинників, що лімітують фізичну та розумову працездатність. Це, у свою чергу, дозволить оптимізувати рівень психофізичного стану студентів протягом усього періоду навчання. Незважаючи на актуальність такого роду досліджень, вивчення цієї проблеми не проводилось, що визначило актуальність і мету нашої роботи.

Мета цього дослідження – оцінити адаптаційний потенціал та морфобіохімічні параметри еритроцитів у студентів із різним навчально-тренувальним режимом дня після дозованого фізичного навантаження.

Матеріал і методи досліджень

В обстеженні брали участь 50 студентів чоловічої статі віком 20–22 роки, які навчаються на факультеті фізичного виховання та спорту ДВНЗ «Прикарпатський національний університет імені Василя Стефаника». Із них 25 студентів, які віднесені до контрольної групи, були практично здорові та не залучені до спеціалізованих спортивних тренувань. До складу експериментальної групи зараховано 25 студентів вищої спортивної кваліфікації, які займалися аеробними видами спорту (лижний спорт, біатлон, тріатлон). У кінці навчального року всім студентам рекомендували провести одноразове фізичне навантаження потужністю 2,4 ± 0,10 Вт/кг на велоергометрі «Ketler» (Німеччина).

Для оцінки адаптаційного потенціалу вимірювали рівень артеріального тиску та частоту серцевих скорочень. Кількісне значення цього показника визначали за формулою: $АП = 0{,}011 \times ЧСС + 0{,}014 \times АТ_{сист.} + 0{,}008 \times АТ_{діаст.} + 0{,}014 \times В + 0{,}009 \times Р – 0{,}009 \times L – 0{,}27$, де ЧСС – частота серцевих скорочень (уд./хв); $АТ_{сист.}$ і $АТ_{діаст.}$ – систолічний і діастолічний артеріальний тиск відповідно (мм рт. ст.), В – вік (років), Р – маса тіла (кг), L – довжина тіла (см).

Величина адаптаційного потенціалу служила критерієм резистентності студентів до фізичного навантаженя в межах: до 1,60 бала – дуже висока стійкість до фізичного навантаження, 1,61–1,90 – висока стійкість, 1,91–2,30 – задовільна стійкість, 2,31–2,70 – низька стійкість, 2,71–3,00 бала – дуже низька стійкість до фізичного навантаження.

Для оцінювання соматичного здоров'я визначали довжину та вагу тіла, життєву ємність легенів, силу м'язів кисті, систолічний артеріальний тиск, частоту серцевих скорочень у стані спокою та час її відновлення після функціональної проби (20 присідань за 30 с). При цьому оцінювання рівня соматичного здоров'я здійснюється за такою градацією: низький, нижче середнього, середній, вище середнього та високий.

Для визначення морфофункціональних особливостей еритроцитів у всіх студентів забирали кров двічі: натщесерце та на першій – третій хвилині відновного періоду після виконання рекомендованого фізичного навантаження. Для дослідження структурних змін еритроцитів брали першу краплю капілярної крові з нігтьової фаланги четвертого пальця кисті, другу крап-

лю використовували для визначення рівня глюкози глюкометром «Accu-Chek Active» (Німеччина).

Концентрацію гемоглобіну досліджували стандартним ціанметгемоглобіновим методом, кількість еритроцитів – уніфікованим методом підрахунку в камері Горяєва, гематокрит визначали мікрометодом із використанням стандартних гепаринізованих капілярів. Додатково розраховували морфофункціональні характеристики еритроцитів: MCV кондуктометричним (імпедансним) методом; MCH, MCHC – розрахунковими методами (автоматичний аналізатор). За стандартними методиками досліджували резистентність еритроцитів до гемолітичних дій (кислотної, осмотичної). Кислотну резистентність визначали на основі різної стійкості еритроцитів до соляної кислоти. Визначали так показники: час початку гемолізу (t_0); час закінчення гемолізу (t_{100}); тривалість гемолізу (t_r) за формулою: $t_r = t_{100} - t_0$, а також час 50% гемолізу (t_{50}). Осмотичну резистентність визначали за концентрацією гіпотонічного розчину натрію хлориду.

В еритроцитах досліджували: концентрацію відновленого глутатіону (Hernayanti et al., 2015), активність глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (КФ 1.1.1.49) (Karaseva and Metelitza, 2006) і глутатіонредуктази (КФ 1.6.4.2) (Chen and Nam, 2016).

Аналіз мазків виконано за допомогою мікроскопа Leica CME з подальшим переведенням зображення у цифрову форму (відеокамера Sony ExwaveHad SSC-DC58AP). Для більш чіткого виявлення та збільшення якості вимірів, еритроцити попередньо фарбували за оригінальною методикою (Karle, 2009). Вимірювали максимальний та мінімальний діаметр еритроцитів, довжину їх окружності, визначали відсоткове співвідношення їх морфотипів до та після стандартного фізичного навантаження. Мазки крові протягом 10 хв фіксували у парах формаліну, обробляли н-бутанолом протягом 2 хв, потім занурювали у 0,01% розчин бромфенолового синього у суміші етанол-діоксан-оцтова кислота (5 : 4 : 1) на 10 хв і після повторного промивання у н-бутанолі висушували протягом 2 хв для перегляду під мікроскопом. Підрахунок здійснювали на 500 клітин. Мікрофотографування проводили за допомогою цифрової фотокамери «Olympus Camedia C-480 ZOOM» (Olympus Corp., Японія). Зображення аналізували із застосуванням пакетів програм NIHimage (Macintosh) та ScionImage (PC).

Морфологічні дослідження проводили у світлооптичному мікроскопі МС 300 (ТХР) та сканувальному електронному мікроскопі JEOL-25M-T220A (Японія) за загальноприйнятими методиками з визначенням мікроелементного складу еритроцитів.

Статистичну обробку результатів досліджень здійснювали за допомогою програмного пакета GrafPad Prism 4.0 (GrafPad Sowtware Inc., США). Застосовували непараметричні методи дослідження (критерій Уїлкоксона, Манна – Уїтні). Вибіркові параметри, наведені далі у таблицях і тексті, мають такі позначення: x – вибіркове середнє, SE – стандартна помилка середнього. Виявлені зміни вважали статистично значимими тоді, коли отриманий рівень відповідав $P < 0,05$.

Результати

Аналіз анкетування показав, що 88% студентів експериментальної групи не справляються з навчальним навантаженням внаслідок інтенсивних занять спортом, насиченим тренувальним графіком і участю у змагальный діяльності. Також 72% студентів цієї групи вказують на хронічну втому.

Ці дані добре узгоджуються з показниками адаптаційного потенціалу, який виявився у студентів-спортсменів на 52% нижчим, ніж у нетренованих студентів ($P < 0,05$). Отримані дані про адаптаційний потенціал вказують на чітку різницю у структурі фізичної працездатності студентів із різним режимом навчання та фізичного навантаження наприкінці навчального року. Якщо у нетренованих студентів до зони задовільної працездатності належать 45% від їх загальної кількості, а до категорії низької – 45%, то у студентів-спортсменів 25% можна віднести в зони задовільної, а 46% і 29% відповідно до зони з низькою та дуже низькою працездатністю. У зоні високої адаптації до фізичного навантаження в кінці навчального року не виявлено жодного з усіх обстежених студентів.

У нетренованих студентів у кінці навчального року середній і вище за середній рівні соматичного здоров'я виявлено у 1,5 раза частіше, ніж у студентів-спортсменів, що також вказує на негативний вплив на їх організм режиму дня з підвищеним рівнем фізичного (тренувального) навантаження. В усіх студентів до тестування з фізичним навантаженням вміст еритроцитів, гемоглобіну та показники гематокриту крові перебувають у межах фізіологічної норми, за помірно підвищеної кількості ретикулоцитів в експериментальній групі (табл. 1).

Таблиця 1

Зміни показників еритроцитів нетренованих студентів і студентів, які тренують витривалість, до та після одноразового фізичного наванаження (x ± SE)

Показники	Контрольна група (n = 25), нетреновані студенти		Експериментальна група (n = 25) студенти-спортсмени	
	до фізичного навантаження	після фізичного навантаження	до фізичного навантаження	після фізичного навантаження
Еритроцити, 10^{12}/л	4,55 ± 0,19	4,88 ± 0,22	4,70 ± 0,24	4,39 ± 0,18$^{*\#}$
Гемоглобін, г/л	144,90 ± 2,62	148,40 ± 2,54$^{\#}$	146,11 ± 4,15	146,43 ± 2,91
Гематокрит,%	44,20 ± 2,82	46,70 ± 1,89$^{\#}$	44,90 ± 3,93	46,80 ± 2,44$^{\#}$
Середній об'єм еритроцита, фл	89,89 ± 5,02	91,95 ± 4,83$^{\#}$	88,76 ± 2,49	92,67 ± 2,95$^{*\#}$
Коефіцієнт варіації об'єму еритроцита,%	14,20 ± 1,54	16,40 ± 1,71$^{\#}$	13,70 ± 2,00*	15,40 ± 1,35$^{*\#}$
Ретикулоцити,%	1,02 ± 0,32*	1,02 ± 0,32*	1,34 ± 0,39	1,76 ± 0,39$^{\#}$

Примітки: * – $P < 0,05$ порівняно з контрольною групою, $^{\#}$ – $P < 0,05$ порівняно з попереднім терміном спостереження.

Під час морфологічного дослідження практично в усіх обстежених студентів констатували підвищення вмісту еритроцитів зі зміненою поверхневою цитоархітектонікою. За фізіологічної норми допускають уміст змінених клітин не більше 8%, а вміст незворотно змінених еритроцитів не має перевищувати 1% їх загальної кількості. У периферійній крові студентів-спортсменів разом із нормоцитами з високою гемоглобінізацією реєстрували субпопуляції макроцитарних і мікроцитарних клітин із низьким рівнем гемоглобіну (рис. 1).

Для окремих студентів характерна присутність у периферійній крові зворотно та незворотно змінених форм еритроцитів, кількість яких перевищувала рекомендовану межу фізіологічної норми. Слід зауважити, що поява цих форм еритроцитів має суто індивідуальний характер і немає статистично вірогідного групового характеру. Спостерігалися ехіноцити з дрібною узурацією зовнішньої мембрани (рис. 2), а в окремих студентів мали місце аканто-, стомато-, (рис. 3) та ехіноцити (рис. 4).

Після дозованого фізичного навантаження у 43% студентів експериментальної групи спостерігали збільшення кількості еритроцитів, тоді як у 57% студентів їх кількість знижувалася. При цьому статистично вірогідні зміни вмісту гемоглобіну та показників гематокриту не спостерігається, тоді як мікроскопія мазків крові у студентів зі зниженою кількістю еритроцитів вказує на їх лізис (рис. 5).

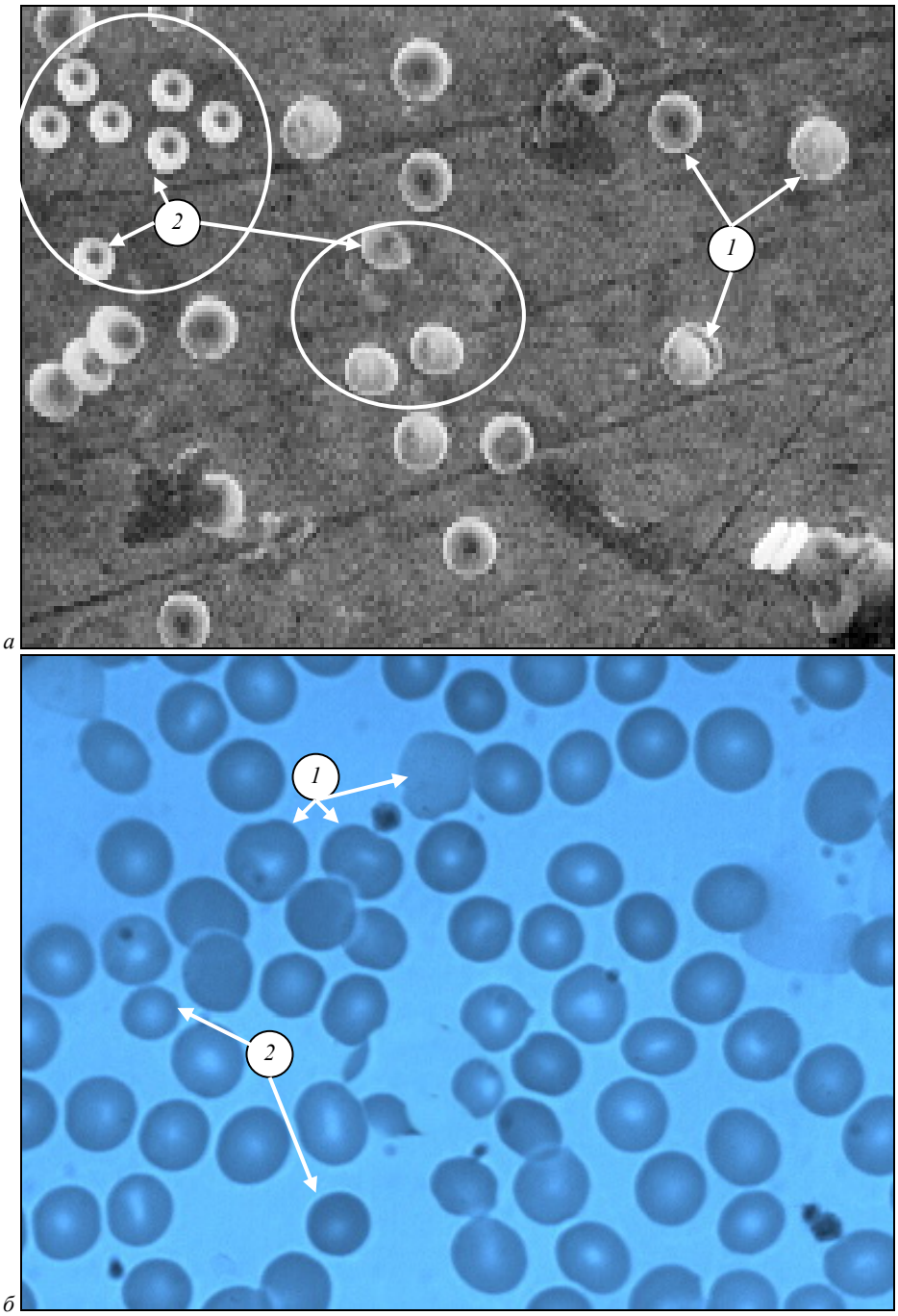


Рис. 1. Нормоцити, субпопуляція макро- (*1*) та мікроцитарних (*2*) еритроцитів у крові студентів-спортсменів після дозованого велоергометричного фізичного навантаження: *а* – сканувальна електронна мікроскопія, *б* – забарвлення за Романовським; *а* – ^{x}1 350, *б* – ^{x}1 000

У фізіологічних умовах еритроцити, які циркулюють у периферійній крові, відрізняються один від одного розмірами, структурою, метаболізмом та іншими фізико-хімічними якостями, що зумовлені їх віковими особливостями. Для характеристики вікової різноякісності еритроцитів запропоновано визначати їх стійкість до біологічних, термічних, хімічних факторів середовища. В усіх студентів виявлено знижену осмотичну стійкість еритроцитів, виразність якої залежала від форми клітин. Зниження осмотичної стійкості, збільшення на еритрограмі групи низькостійких клітин корелює з переважанням еритроцитів сферичної форми.

У студентів поряд зі зниженням кількості еритроцитів після фізичного навантаження знижується активність як глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (на 29,5%, $P < 0,05$), так і глутатіонредуктази (23,2%, $P < 0,05$) (табл. 2).

Таблиця 2

Біохімічні показники еритроцитів нетренованих студентів і студентів, які тренують витривалість (x ± SE)

Показники	Фізіологічна норма	Контрольна група (n = 25)	Експериментальна група (n = 25)
Вміст відновленого глутатіону, мкмоль/г гемоглобіну	5,18–6,38	5,95 ± 0,44	4,95 ± 0,27*
Активність глюкозо-6-фосфатдегідрогенази, мкмоль/(хв.г гемоглобіну)	4,93–6,17	5,15 ± 0,39	4,35 ± 0,67*
Активність глутатіонредуктази, мкмоль/(хв.г гемоглобіну)	185,0–233,0	198,0 ± 10,2	179,5 ± 6,7*

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

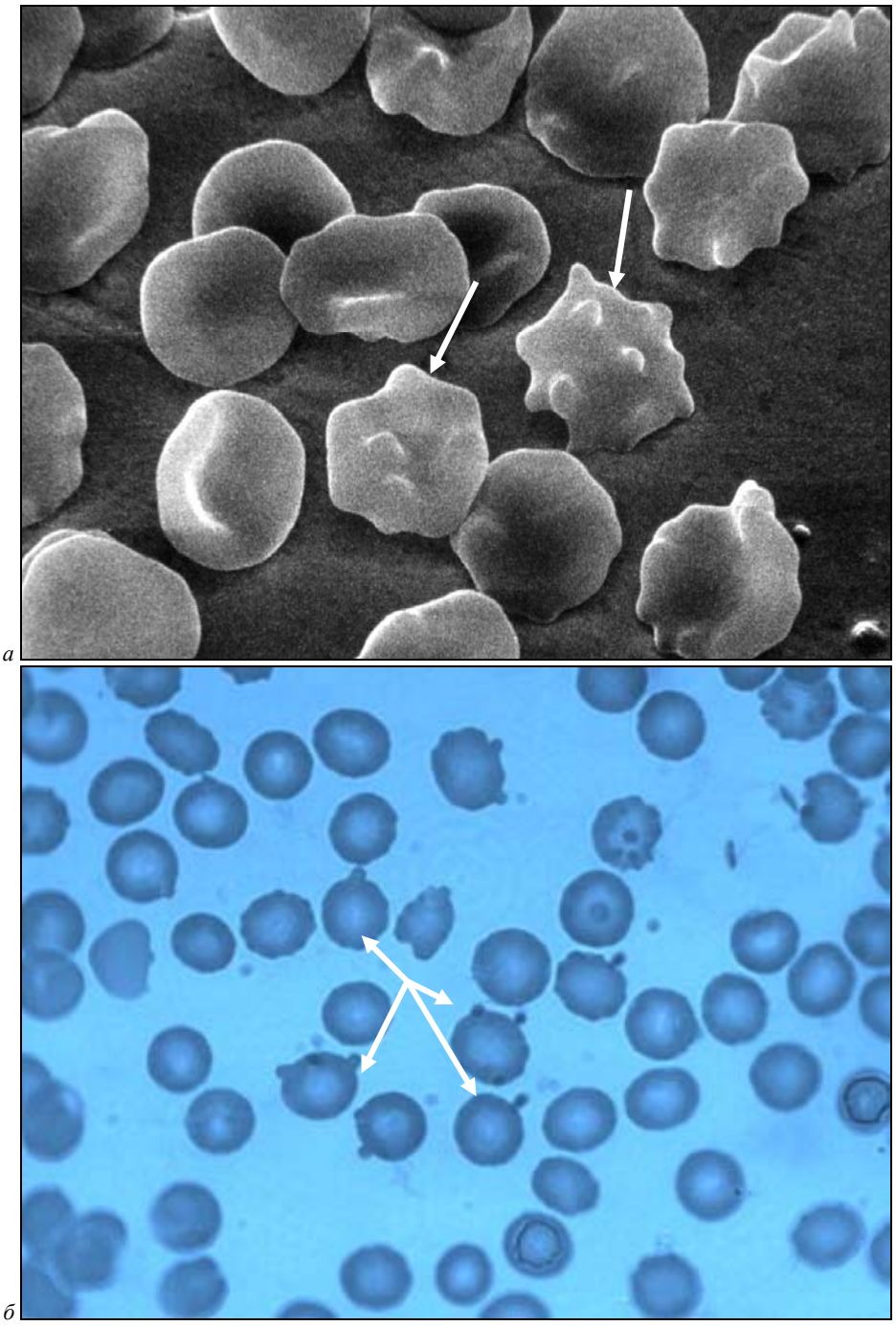


Рис. 2. Клітини ехіноцити (показані стрілками) в крові студентів-спортсменів:
а – сканувальна електронна мікроскопія, *б* – забарвлення за Романовським; *а* – ^{x}5 000, *б* – ^{x}1 350

При цьому у контрольній групі вміст відновленого глутатіону залишається в межах діапазону показників фізіологічної норми, тоді як у студентів експериментальної групи його концентрація зменшується на 22,4% ($P < 0,05$).

Обговорення

Проведені дослідження стосовно адапатційного потенціалу студентів показали, що у кінці навчального року студенти-спортсмени мають низький рівень функціональних резервів організму, що вимагає пильної уваги вчених різних спеціалізацій до їх психо-фізичного стану. При цьому виявлений нами чіткий взаємозв'язок між режимом навчання студентів із різним рівнем фізичного навантаження протягом дня та величиною адапатційного потенціалу вказує на те, що запропоновану градацію його величини можна використовувати як критерій для визначення об'єму навчально-тренувальних навантажень протягом усього навчального року. Це узгоджується з аналогічними критеріями, встановленими іншими авторами (Ignat'eva and Kubasov, 2014).

Фізичне навантаження різного рівня інтенсивності відіграє велику роль у формуванні загальної витривалості організму, яка виявляється у різного роду діяльності та у повсякденному житті людей (Lambert, 2016). Вона відображає загальний рівень працездатності організму людини. Будучи багатофункціональною властивістю людського організму, витривалість інтегрує в собі велику кількість процесів, що відбуваються на різних рівнях: від клітинного та до цілісного організму (Bergamini et al., 2004). Як показують результати сучасних наукових досліджень, у переважній більшості випадків провідна роль у дослідженнях витривалості належить встановленню факторів, які сприяють активізації енергетичного обміну та вегетативних

систем його забезпечення – серцево-судинної та дихальної, а також центральної нервової системи. При цьому залишаються поза увагою дослідження клітинних реакцій за фізичного навантаження у процесі тренувань, пов'язаних із підвищенням загальної витривалості організму студентів (Koumantakis et al., 2005; Kang, 2016). Еритроцити в даному випадку служать зручним об'єктом для такого роду досліджень, оскільки вони мають участь у процесах, пов'язаних із підтриманням гомеостазу на рівні цілого організму (Jensen, 2009; Mairbäurl, 2013; Mikhaylova, 2013). Ці клітини крім властивої для них специфічної газотраспортної функції мають здатність брати участь у регуляції кислотно-лужного стану, водно-електролітного балансу, мікрореологічного статусу крові, в імунних реакціях, зв'язуванні та перенесенні амінокислот і ліпідів, що являє безпосередній інтерес для розвитку загальної витривалості організму (Shephard and Åstrand, 2000; Nemytov, 2007; Valbones et al., 2009; Tan et al., 2010; Zhu, 2015).

Під час фізичного навантаження відбувається статистично вірогідне збільшення гематокриту на 5,0%, а рівня гемоглобіну на 2,7%. Однак на загальному фоні збільшення числа еритроцитів у силу розвитку гемоконцентрації, в окремих студентів контрольної групи фізичне навантаження викликає зменшення кількості еритроцитів. Таке явище може бути викликане деструктивним впливом на еритроцити посиленням гемодинаміки, підвищенням температури, ацидозом під час фізичного навантаження тощо.

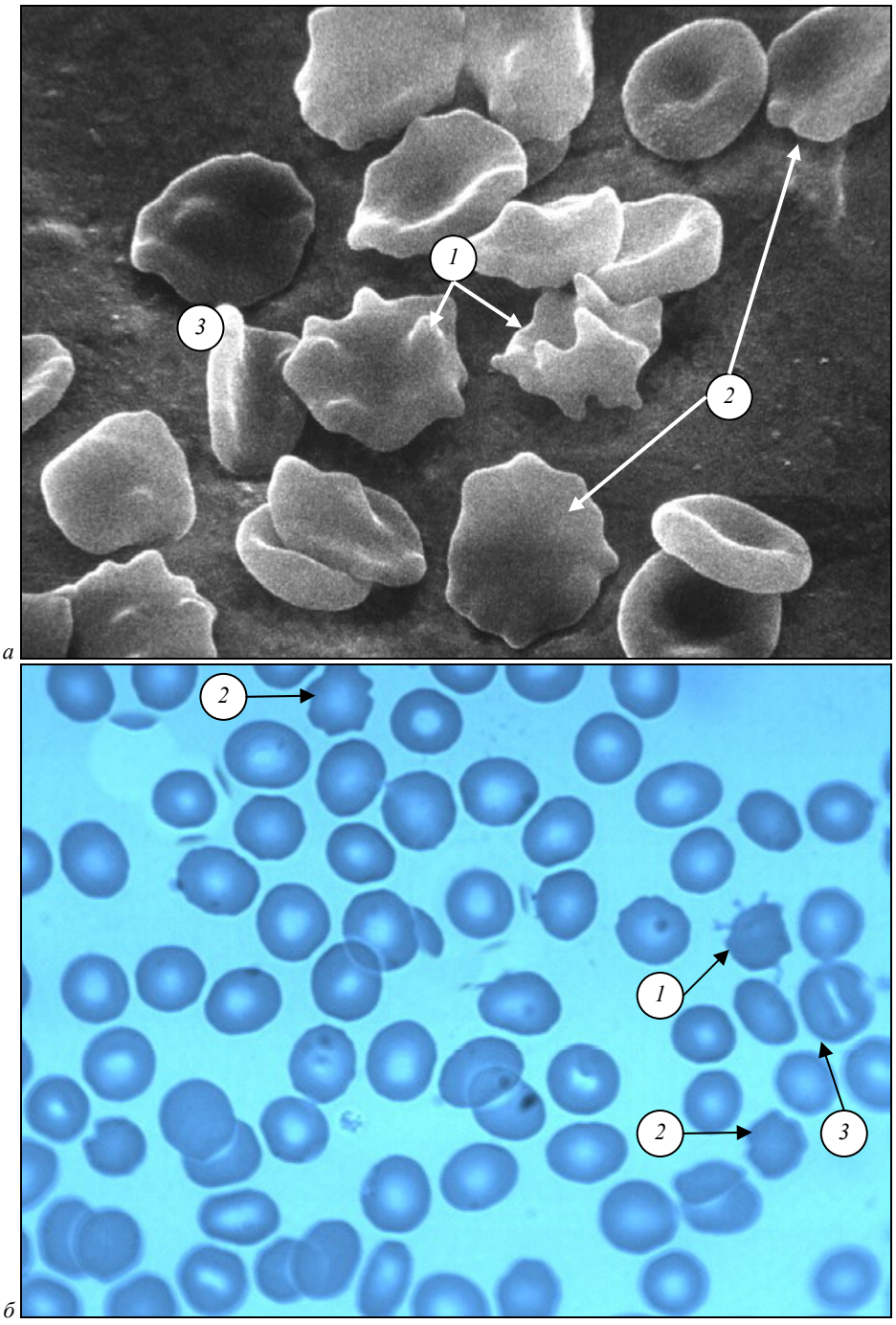
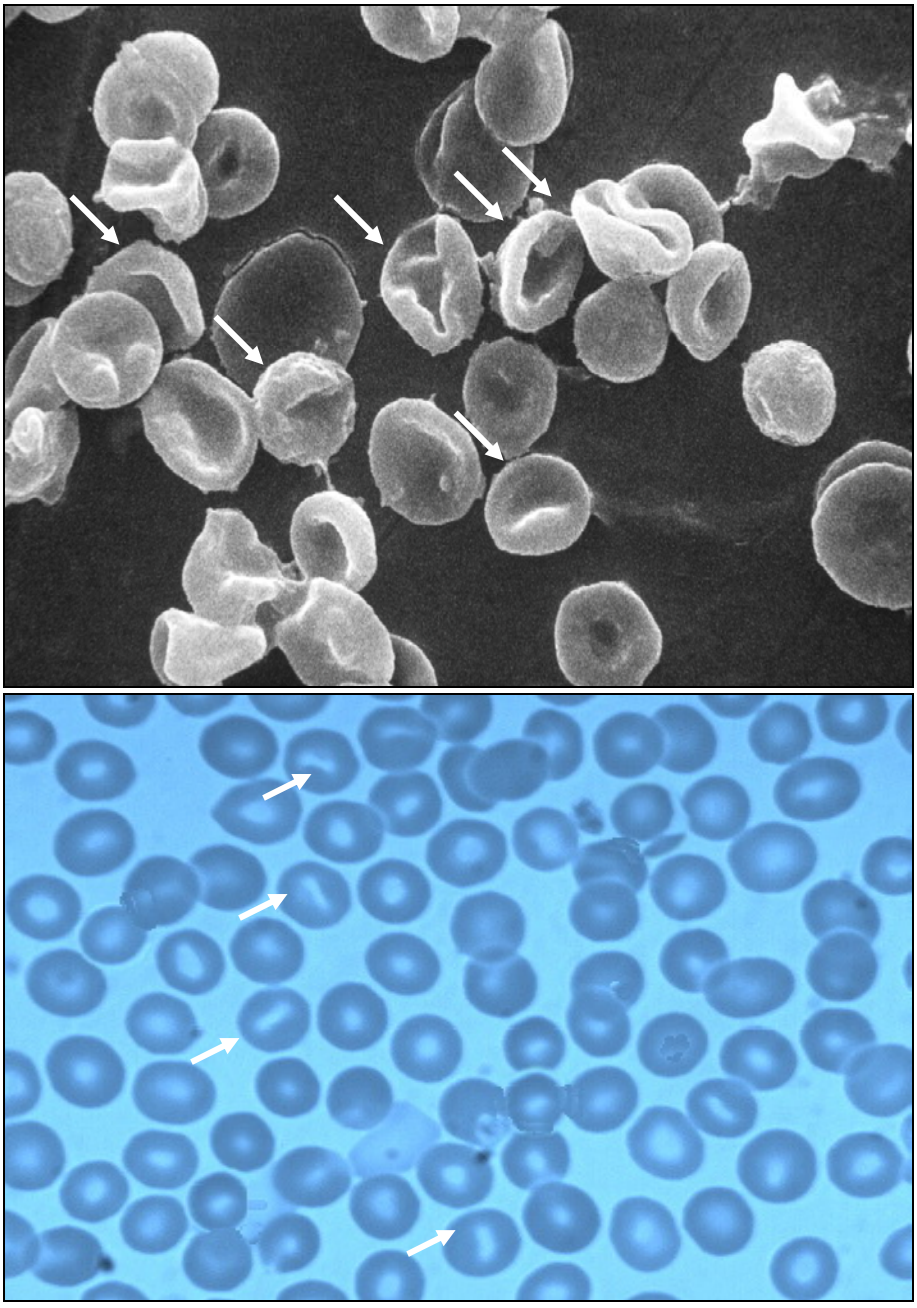


Рис. 3. Атипові форми еритроцитів крові студентів-спортсменів: ехіноцити (*1*), акантоцити (*2*) та стоматоцити (*3*); *а* – сканувальна електронна мікроскопія, *б* – забарвлення за Романовським; *а* – ˣ5 000, *б* – ˣ1 350

Одноразове фізичне навантаження викликає збільшення кількості великих еритроцитів на 3,0% ($P < 0,05$). Кількість і об'єм циркулюючих еритроцитів визначає реологічні властивості крові. Зміна цих показників за фізичного навантаження може істотно впливати на киснево-транспортну функцію крові і здатне спричинювати негативні явища в системі мікроцир-

куляції, тим самим зменшуючи адаптаційний потенціал організму студентів (Valbonesi et al., 2009). Посилення агрегації еритроцитів (вміст агрегатів збільшився на 15,6%) і підвищення коефіцієнта їх деформованості (на 17,9%), що спостерігаються внаслідок м'язової роботи, викликає підвищення в'язкості циркулюючої крові. Такі зміни показників еритроцитів несприятливі для реалізації кисневотранспортної функції крові та свідчать про недостатню адаптацію нетренованих студентів до фізичного навантаження (Lambert, 2016). Дефіцит в еритроцитах відновленого глутатіону, знижена активність глюкозо-6-фосфодегідрогенази та глутатіонредуктази за впливу окисних агентів зумовлює зниження вмісту глутатіондисульфіду. У разі виснаження процесів регенерації глутатіону сповільнюються або припиняються внутрішньоклітинні окисно-відновні процеси, настає «хімічна», а, отже, і біологічна смерть еритроцитів (Holcik, 2001). Вони або фагоцитуються клітинами моноцитарно-фагоцитарної системи (під час фізіологічного старіння чи внаслідок апоптозу), або піддаються внутрішньосудинному розпаду за впливу окисних агентів (Abdelha and Abdelmotta, 2010).



а

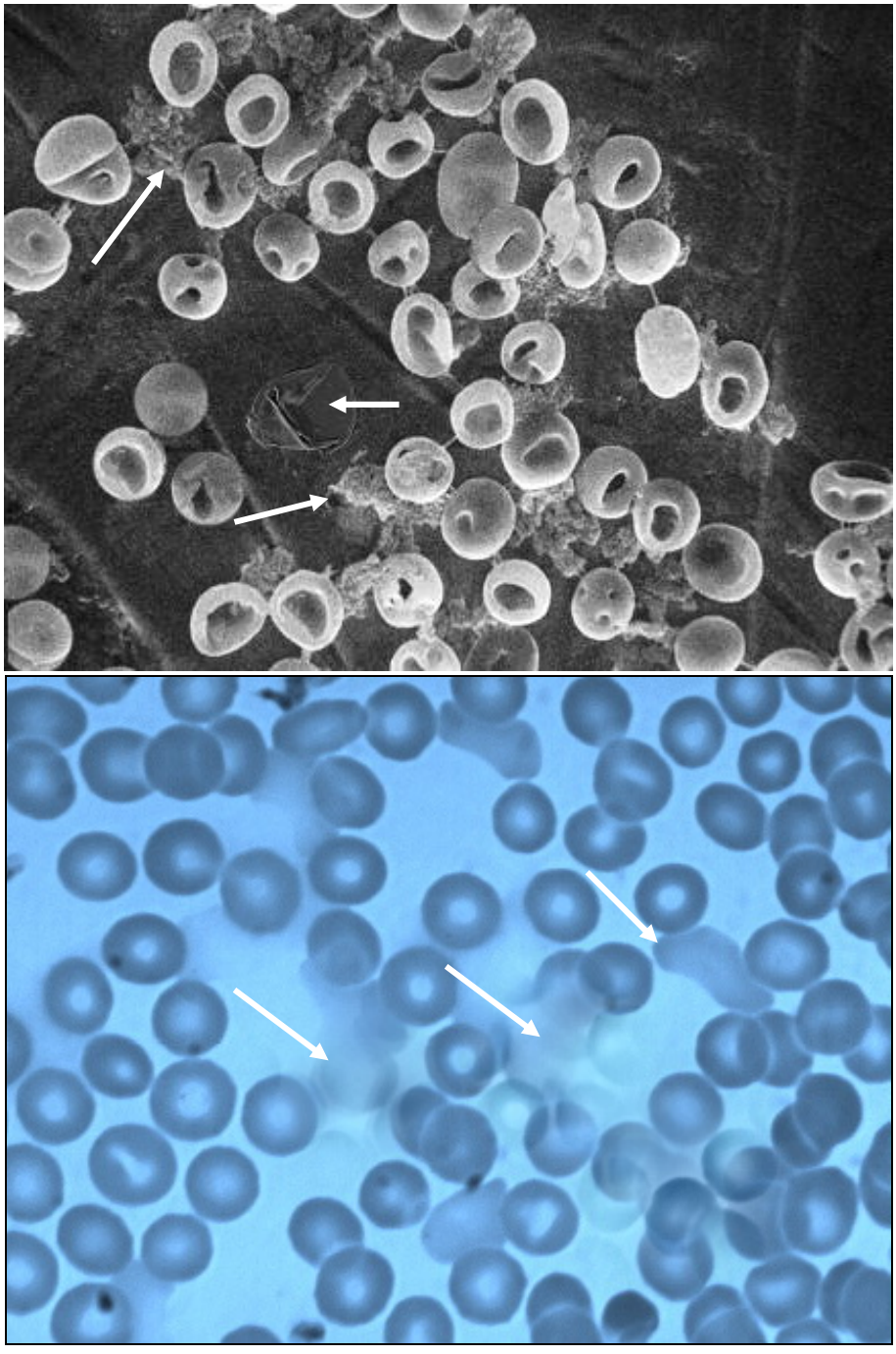
б

Рис. 4. Стоматоцити (показані стрілками) в крові студентів-спортсменів:
а – сканувальна електронна мікроскопія, *б* – забарвлення за Романовським; *а* – ×3 000, *б* – ×1 350

Під час дослідження ми встановили, що у 57% студентів-спортсменів за впливу дозованого фізичного навантаження виникають негативні морфологічні зміни еритроцитів, що зумовлено дисметаболічними порушеннями. Основу цих змін, ймовірно, складає невідповідність функціональних можливостей біосистем організму до поєднаного негативного впливу підвищеного об'єму навчального та високого рівня інтенсивності фізичного навантаження (Brock et al., 2009; Chen and Nam, 2016).

За таких умов виникають порушення структурної цілісності еритроцитів, що, у свою чергу, сприяє їх внутрішньосудинному лізису та може спричинити розвиток анемії (Matarrese, 2005). Наявність цих змін, як правило, негативно впливає на рівень соматичного здоров'я, спортивну результативність і успішність студентів. Це вимагає відповідної корекції навчального та тренувального процесу, а також ліквідації негативних наслідків, розроблення та своєчасного застосування адекват-

них заходів, спрямованих на усунення розвитку можливих патологічних змін в організмі студентів. У сучасних дослідженнях системи крові набула поширення кислотна еритрограма або тест розподілу еритроцитів відносно часової стійкості до дії кислоти (Abdelha and Abdelmotta, 2010). Результати обстежень за цією методикою вказують, що у студентів із пониженою кількістю еритроцитів після фізичного навантаження спостерігається зниження стійкості мембрани еритроцитів до кислотного гемолізу, що проявляється зміною часу гемолізу та його максимуму. Окремі автори вважають, що лізис еритроцитів під час пониження pH середовища зумовлений денатурацією та подальшою агрегацією мембранних білків (Mohanty et al., 2014) внаслідок олігомеризації білків цитоскелета. Такі явища найбільш виражені у зрілих і старих еритроцитах (Ratcliffe and Bishop, 2014).



а

б

Рис. 5. Специфічні літичні форми еритроцитів (показані стрілками) в мазку крові студентів-спортсменів: *а* – сканувальна електронна мікроскопія, *б* – забарвлення за Романовським; *а* – ^{x}1 500, *б* – ^{x}1 350

Домінування у крові студентів вмісту еритроцитів зі зміненим поверхневим мікрорельєфом, зниження стійкості клітинної мембрани за кислотного гемолізу, як і реєстрація в окремих студентів після рекомендованого фізичного навантаження лізисних форм еритроцитів, може бути зумовлене цілою низкою причин, що мають у своїй основі розвиток дискоординації метаболічних процесів і супроводжуються ушкодженнями мембрани. Поява змішаних структурних змін в еритроцитах вказує на високий ризик внутрішньосудинного гемолізу, особливо серед студентів зі зворотно зміненими формами, та розвитку патологічного стану, що у спортивній медицині отримав назву «анемія навантаження, або змагальна анемія» (Mairbäurl, 2013).

Зважаючи на це, ми дослідили активність окремих ферментів еритроцитів, які беруть участь у метаболізмі: глюкозо-6-фосфатдегідрогенази та глутатіонредуктази, які забезпечують збереження мембрани еритроцитів за їх окиснення за дії різних факторів. Ці ферменти посідають ключове місце у внутрішньоеритроцитарному метаболізмі, зокрема, беруть участь

у пентозофосфатному циклі перетворення глюкози та глутатіоновому циклі (Chen et al., 2010; Hernayanti et al., 2015). Близько 90% глюкози, що засвоюється в еритроциті, перетворюється у процесі гліколізу на лактат і приблизно 10% окиснюється через утворення глюкозо-6-фосфату у 6-фосфоглюконат. Вказану реакцію каталізує глюкозо-6-фосфат. Саме ця реакція в основному забезпечує еритроцит необхідною кількістю відновленого нікотинамідаденін-динуклеотидфосфату, найважливішого донатора водню, що використовується для відновлення глутатіону (Karaseva and Metelitza, 2006). Відновлення глутатіону до глутатіондисульфіду відбувається за безпосередньої участі глутатіонредуктази, основна функція якої полягає у захисті сульфгідрильних груп білків, зберігаючи їх у відновленому стані. Швидка регенерація глутатіону оберігає гемоглобін від окиснювальної денатурації.

Лінійні розміри еритроцитів упродовж усього періоду тренувального збору характеризуються малими, але системними зрушеннями. Зокрема, максимальні розміри еритроцитів розрізняються тільки у вигляді тенденцій до збільшення діаметрів. Однак по коротких осях спостерігаються значніші ($P < 0,05$) відмінності. Центральні ямки дисків поглиблюються, але при цьому на 50–75 нм зменшується товщина дисків, що зумовлено зменшенням товщини білково-глобулярного шару мембрани еритроцитів (Jensen, 2009; Karle, 2009; Bianchini and Wright, 2013). Це має адаптивне значення, оскільки розширює пластичні можливості еритроцитів під час проходження через капілярний сегмент гемомікроциркуляторного русла. Отримані нами дані вказують на досить малі відхилення кожного з параметрів (у межах 5–7%), але вони накопичуються та набувають системного характеру. Це робить дані зрушення функціонально значимими в кінці навчального року.

На відміну від контрольної групи, де гістограма розподілу еритроцитів має вигляд нормального розподілу, тоді як в експериментальній групі гістограма розподілу еритроцитів за розміром асиметрична та мультиполярна за рахунок збільшення лівого крила, тобто внаслідок зростання кількості варіюючих класів клітин малого розміру. Порівняльний аналіз показує, що у контрольній групі об'єм розмірних класів у лівому крилі складає тільки 20%, тоді як в експериментальній групі – близько 70%. Збільшення кількості еритроцитів лівого крила гістограми супроводжується вірогідним ($P < 0,05$) зменшенням значень медіани та моди.

Вказані особливості гістограми означають, що у відповідь на дію фізичного навантаження реагують, перш за все, еритроцити малих розмірів, що характерно для короткотривалих, швидкоплинних реакцій, які, очевидно, відбуваються внаслідок викиду клітин «першого ешелону стрес-реакції» з резервного пулу загального кровотоку (Holcik, 2001; Mairbäurl, 2013).

Розподіл еритроцитів у студентів експериментальної групи стає більш екстремальним: збільшується кількість інтервалів, об'єми окремих класів варіюють унаслідок різких «стрибків», а досягнення значень центральних параметрів відбувається хвилеподібно (у контролі по монотонно висхідному тренду). Хвилеподібна форма гістограми, мабуть, відображає нестабільно-коливальний стан еритроцитів у періоді активного тренування організму (Shephard and Åstrand, 2000; Lambert, 2016). Це підтверджується зміною електролітного складу еритроцитів, перш за все натрію та калію, оскільки відомо, що їх співвідношення дозволяє опосередковано оцінити стан клітинного метаболізму в цілому організмі (Hernayanti et al., 2015). Тому знання загальних закономірностей розподілу електролітів в організмі, зокрема, калію та натрію, а також взаємостосунків цього розподілу з концентрацією та пересуванням іонів інших металів дозволяє скласти загальне уявлення про те, що відбувається всередині кожної клітини в організмі (Jensen, 2009).

Безпосередня небезпека загальної та, головним чином, клітинної гіпокаліємії полягає в тому, що, перш за все виникає гіпорефлексія та страждає скоротлива функція м'язів, зокрема міокард і гладка мускулатура кишечника. За внутрішньоклітинної гіпокаліємії можливий розвиток паралічів скелетної мускулатури, паралітичної кишкової непрохідності, серцевих аритмій (Maroulis et al., 2000; Streeten et al., 2008; Chang and Bo, 2015), а також підвищеної чутливості до допінг-препаратів, які так часто присутні в різних тренувальних схемах у спортивній підготовці студентів (Takahashi and Tatsugi, 2013).

Оцінка більш інформативного показника, так званої трансмінералізації еритроцитів і трансмембранного потенціалу по калію дає можливість судити про втрати клітинної маси еритроцитів. Зниження трансмембранного потенціалу по калію нижче 20 ммоль/л свідчить про загальний дефіцит калію в організмі людини, а зменшення трансмінералізації внаслідок зниження показників концентрації калію та збільшення вмісту натрію дозволяє припускати наявність подібних порушень і в інших клітинних структурах.

За дії екстремальних чинників система переходить у детермінований стан, хаотичність флуктуацій зменшується, коливання набувають регулярного, впорядкованого характеру. Статистично цей ефект виявляється у вигляді зменшення показників дисперсії та ексцесу. Еритроцит немовби «стискається» та переходить до більш мономорфного унімодального стану. Зменшуються числові значення ширини інтервалів, що вказує на вкорочення сумарної довжини хвилі флуктуюючих коливань. Якщо інтерполювати ці співвідношення на індивідуальні клітини, можна припустити, що за впливу фізичного навантаження в організмі студентів із низьким рівнем тренованості чи у стані психофізичного перенавантаження збуджуються флікерні (шумові) коливання еритроцитів, які ведуть до появи мікро- та макродискоцитів (Hernayanti et al., 2015).

При цьому самі клітини піддаються пружній деформації, а коливання, виходячи з форми розмірних гістограм, по амплітуді та частоті стають вище початкових. Збільшення частоти осцилюючих коливань неминуче викликає розбалансування стабільного стану клітинної мембрани, а це, у свою чергу, посилить плавлення ліпідів та підвищить текучість мембран. Морфологічно це виявляється активною конформацією еритроцитів і розширенням мембранних пор. Вони стискаються або витягуються, що відповідає вищим значенням коефіцієнта варіації показників індексу форми. Зміни фізичного стану мембранних ліпідів супроводжуються зменшенням показників шорсткості та питомої площі поверхні мембран.

Це означає, що в мембранах еритроцитів збільшується поверхневий натяг і, відповідно, зменшується поверхнева енергія. Збільшенню поверхневого натягу сприяє також ущільнення мембрани еритроцитів, що спостерігається у вигляді збільшення вагових індексів натрію, кальцію, магнію та хлору, але знижується концентрація калію, схильного виходити з клітини за дії найрізноманітніших механічних або біохімічних перетворень (Maroulis et al., 2000; Streeten et al., 2008; Chang and Bo, 2015). Внаслідок дії сил поверхневого натягу мембрани розправляються, кількість вогнищ, що концентрують напруження зменшується, а мембрани стають міцнішими на розрив. Одночасно у поверхневих шарах стінки еритроцитів з'являються вогнища ущільнень. Морфологічно ці вогнища мають вигляд дегранульованих ділянок, які виступають на 50–80 нм над поверхнею. За даними вимірювань, знятих із цих ділянок, показники шорсткості та адгезивність істотно зменшуються відносно решти поверхні дискоцитів. Це означає, що дані ділянки більш гідрофобні, тобто мають меншу здатність до змочування. У нормі питома площа таких ділянок не перевищує 5%, і їх поява, імовірно, зумовлена підсиханням зразків. Проте в експериментальній групі площа вогнищ ущільнення збільшується практично удвічі та коливається в межах 10%. Механізми формування подібних ділянок невідомі, але одним із них вважають стресс-зумовлене посилення золь-гель-переходів у ліпопротеїнових комплексах цитоплазматичних мембран. На фоні посилення коливальних рухів еритроцитів і збільшення сил поверхневого натягу, безумовно, посиляться також процеси утворення капілярних хвиль у трансмембранний рідині.

Швидкість руху хвиль у міру зростання поверхневого натягу збільшується, а довжина, у зв'язку зі стоншенням дисків – зменшується (Holcik, 2001). Вказані фундаментальні співвідношення створюють структурні та фізико-механічні передумови для високочастотного зсуву осцилюючих коливань внутрішньоклітинної рідини та мембранних структур еритроцитів (Karle, 2009). Внаслідок нерівномірного розтягування мембрани з'являються вогнища ущільнення з гідрофобною поверхнею та западини з гідрофільними дном і краями. Це збільшує неоднорідність швидкостей і структури гідродинамічних потоків: у розширених порах із гладкими стінками потоки ламінізуються та прискорюються, а в заглибленнях, навпаки, – вони сповільнюються та піддаються турбулентним закручуванням. У результаті цього на певних ділянках мембрани еритроцитів різко зростає тиск, що викликає вдавлювання країв, утворення різноманітних виростків, застій високоадгезивної плазматичної рідини та накопичення частинок «липкого» детриту.

Інтенсивність трансмембранного обміну та, зокрема, швидкість гідродинамічних потоків великою мірою визначаються структурою та формою пор (Bergamini et al., 2004; Abdelha and Abdelmotta, 2010; Mohanty et al., 2014). У мембранах еритроцитів студентів-спортсменів діаметр входу, глибина та відносний об'єм пор істотно вищі за контрольні значення тому, що мембрани стають більш пористими, і, відповідно, більш проникливими. Враховуючи багатократне перевищення відносного об'єму, відбувається це стрибкоподібно. І не тільки за рахунок розширення, а і шляхом утворення пор *de novo*. Розширені пори мають підвищені краї, виконані різнокаліберними зернами із субгранулярною організацією. Багато пор мають лійкоподібну форму з подовженим загостреним «горлом». У нормі лійкоподібні пори зустрічаються рідше, а їх діаметр не перевищує 150 нм. В еритроцитах студентів-спортсменів лійкоподібні пори більші за розмірами (діаметром до 250 нм), дно покрите тонким шаром безформенної «в'язкої» маси та невпорядкованими гранулами.

Простір між гранулами розширений, створює масштабну мережу ультратонких каналів, що спостерігаються на мікрофотографіях за великих збільшень сканувального електронного мікроскопа. Горловина пор глибоко проникає у багатошарові стінки еритроцитів.

Внаслідок різноспрямованої дії деформівних сил мембрани в еритроцитах розправляються нерівномірно: з'являються обширні (діаметром до 300 нм), але неглибокі (15–25 нм) западини. «Береги» западин характеризуються значними перепадами висот, порізані закрутами та схилами. У місцях підйому «береги» немовби вивертаються та можуть піднятися до 100 нм. У функціональному відношенні це означає орієнтацію еритроцитів на переважне виведення речовини, а у патоморфологічному розумінні це розцінюється як підготовка до піроптозу – різновиду апоптозу, у ході якого дегенеративно змінені клітини викидають (виплескують) цитоплазматичний матеріал (Holcik, 2001; Karle, 2009). Закрути (меандри) – петлеподібні прогинання дна на ділянці до 50–100 нм, що розчленовують стінки западин. Поява подібних структур свідчить про уповільнення потоків трансмембранної рідини. Схили в основному опуклі, а їх мікрорельєф ускладнюється дво-триярусними терасами, сходинки яких оголяють пластинчасту структуру стінок еритроцитів. Сканування дна западин у режимі вторинних електронів дозволяє деталізувати тонку текстуру поверхні, виявляються наноканали та частинки детриту різного ступеня дисперсності. Наноканали утворюють густу розгалужену сітку, а детрит відкладається переважно у «прибережних» ділянках у вигляді поліморфних аглютинатів.

Поверхня западин, особливо на дні, відрізняється високою адгезивністю, що свідчить про накопичення в'язкої маси. Вищеперераховані морфологічні особливості ускладнюють текстуру поверхні еритроцитарних дисків. Це зумовлює неоднорідність швидкості та структури внутрішньо- та трансмембранних гідродинамічних потоків. Під час проходження рідини через розширені пори з відносно гладким рельєфом стінок швидкість потоків збільшується і вони ламінізуються. У дрібних западинах із розгалуженими краями швидкість гідродинамічних потоків сповільнюється і вони починають закруглятись. За зменшення кінетичної енергії (швидкості) гідродинамічних потоків тиск (і, відповідно, тертя, що створюється біля стінки та дна западини), збільшується. Циркулююча трансмембранна рідина починає застоюватися, «замулюватися», перетворюється на в'язкий флюїд, який розчиняє дно та стінки. У результаті западини перетворюються на мембранні дефекти, які розвиваються за принципом «повзучих» ерозій.

У цілому до цих конформацій додаються зміни площі контакту мембрани еритроцитів не всією своєю поверхнею, а тільки дуже малою площею на вершинах шипоподібних виростів і тоді стає зрозумілою вся глибина порушення трансмембранного перенесення життєво необхідних речовин на рівні обмінної ланки гемомікроциркуляторного русла.

Висновки

Поглиблене вивчення механізмів дії фізичних навантажень стресового рівня на стан киснево-транспортної системи крові, організація гематологічного контролю на різних етапах і періодах спортивно-змагальної діяльності, а також під час проведення корекційно-відновлювальних заходів, спрямованих на усунення порушень, що виникають у результаті відхилень від оптимуму фізичної активності, – це актуальне завдання що вимагає негайного виконання.

Під час морфологічного обстеження практично в усіх студентів-спортсменів констатовано неоднорідність клітинних субпопуляцій еритроцитів. У периферійній крові, разом із нормоцитами з високою гемоглобінізацією, реєстрували субпопуляції макро- та мікроцитарних клітин. У більшості нетренованих студентів спостерігали різні морфологічні зміни форми еритроцитів, які виявляються у вигляді ехіно-, аканто- та стоматоцитозу, що свідчать про нестабільність мембран еритроцитів.

У студентів-спортсменів за впливу дозованого велоергометричного фізичного навантаження зменшувалася кількість еритроцитів, знижувалася їх осмотична та кислотна стійкість, реєстрували клітини лізису. Біохімічні дослідження показали зниження активності глюкозо-6-фосфатдегідрогенази та глутамінредуктази та вмісту відновленого глутатіону.

Виявлені морфо-біохімічні зміни свідчать про порушення структурної цілісності мембранних утворень еритроцитів і мають негативні наслідки щодо ймовірного впливу на стан здоров'я студентів-спортсменів, які поряд із навчальним навантаженням зазнають значного тренувально-змагального стресу.

References

Abdelha, M. A. K., & Abdelmotta, S. (2010) Biochemical changes of hemoglobin and osmotic fragility of red blood cellsin high fat diet rabbits. Pakistan Journal of Biological Sciences, 13(2), 73–77.

Barker, D., Wallhead, T., & Quennerstedt, M. (2016). Student learning through interaction in physical education. European Physical Education Review, 4, 1–6.

Bergamini, C., Gambetti, S., Dondi, A., & Cervellati, C. (2004). Oxygen, reactive oxygen species and tissue damage. Current Pharmaceutical Design, 10(14), 1611–1626.

Bianchini, K., & Wright, P. A. (2013). Hypoxia delays hematopoaesis: Retention of embryonic hemoglobin and erythrocytes in larval rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, during chronic hypoxia exposure. Journal of Experimental Biology, 216(23), 4415–4425.

Brock, S. J., Rovegno, I., & Oliver, K. L. (2009). The influence of student status on student interactions and experiences during a sport education unit. Physical Education and Sport Pedagogy, 14(4), 355–375.

Chang, Y., & Bo, B. (2015). Effects of exhaustive exercise on the ATP-sensitive potassium channel of rat cardiac sinoatrial node. Journal of Science and Medicine in Sport, 19, 65.

Chen, S., & Nam, Y. H. (2016). Energy balance education in schools. European Physical Education Review, 4, 1–5.

Chen, Y. L., Tseng, H. S., Kuo, W. H., Yang, S. F., Chen, D.-R., & Tsai, H.-T. (2010). Gluthation S-transferase P1 (GSTP1) gene polymorphism increase age-related susceptibility-hepatocellular carcinoma. BMC Medical Genetics, 11(46), 1–8.

Doronin, K., & Kozlov, H. (2007). Ob urovne obshhej vynoslivosti u studentok i ego dinamike v techenie uchebnogo goda [On the level of general endurance of students and its dynamics during the school year]. Scientific Notes of the University named after P. F. Lesgafta, 32(10), 29–32 (in Russian).

González-Alonso, J. (2012). ATP as a mediator of erythrocyte-dependent regulation of skeletal muscle blood flow and oxygen delivery in humans. Journal of Physioljgy, 590(20), 5001–5013.

Hernayanti, H., Laksana, A. S. D., & Aziz, S. (2015). Efekt polimorfisme gena gstp-1 terhadap aktivitas glutations-transferase (gst) pada individu terpapar logam berat timbal (Effect of GSTP-1 Gene polymorphismson glutation S-transferase (GST) activity in heavy metals lead-exposed individual). Manusia dan Lingkungan, 22(3), 305.

Holcik, M. (2001). Do mature red blood cells die by apoptosis? Trends in Genetics, 18(3), 121.

Ignat'eva, S. N., & Kubasov, R. V. (2014). Metabolicheskie adaptacionnye vozmozhnosti organizma k obucheniju studentov medicinskogo vuza na evropejskom severe [Metabolic adaptation resources of organism to studying at medical university students in european north]. Annals of the Russian Academy of Medical Sciences, 69(11–12), 84–88 (in Russian).

Jensen, F. B. (2009) The dual roles of red blood cells in tissue oxygen delivery: Oxygen carriers and regulators of local blood flow. Journal of Experimental Biology, 212(21), 3387–3393.

Kang, M. (2016). Should the physical educator be held accountable for student physical activity levels beyond physical education? Physical Education, Recreation and Dance, 87(6), 55–56.

Karaseva, E. I., & Metelitza, D. I. (2006). Stabilization of glucoso-6-phosphate dehydrogenase by its substrate and cofactor in an ultrasonic field. Journal of Bioorganic Chemistry, 32(5), 436–443.

Karle, H. (2009). Destruction of erythrocytes during experimental fever. Acta Medica Scandinavica, 186(1–6), 349–359.

Koumantakis, G. A., Watson, P. J., & Oldham, J. A. (2005). Supplementation of general endurance exercise with stabilisation training versus general exercise only. Clinical Biomechanics, 20(5), 474–482.

Lambert, M. I. (2016). General adaptations-exercise: Acute versus chronic and strength versus endurance training. Exercise and Human Reproduction. Springer, New York; Heidelberg Dordrecht, London.

Lorente-Catalan, E., & Kirk, D. (2015). Student teachers understanding and application of assessment for learning during a physical education teacher education course. European Physical Education Review, 22(1), 65–81.

Mairbäurl, H. (2013). Red blood cells in sports: Effects of exercise and training on oxygen supply by red blood cells. Frontiers in Physiology, 4, 34–36.

Maroulis, S. L., Schofield, P. J., & Edwards, M. R. (2000). The role of potassium in the response of *Giardia intestinalis* to hypo-osmotic stress. Molecular and Biochemical Parasitology, 108(1), 141–145.

Matarrese, P. (2005). Peroxynitrite induces senescence and apoptosis of red blood cells through the activation of aspartyl and cysteinyl proteases. FASEB Journal, 19(3), 416–418.

Mikhaylova, L. A. (2013). Central hemodynamics indices in senior pupils with increased educational and motive loading. Siberian Medical Review, 3, 55–58.

Mohanty, J. G., Nagababu, E., & Rifkind, J. M. (2014). Red blood cell oxidative stress impairs oxygen delivery and induces red blood cell aging. Frontiers in Physiology, 5, 1–5.

Nemytov, A. A. (2007). The development of general endurance of the cadets Academy Federal Security Service at graduation courses. Uchenye Zapiski Universiteta imeni P. F. Lesgafta, 28(6), 70–73.

Ratcliffe, P. P., & Bishop, T. (2014). Signaling hypoxia by hypoxia-inducible factor protein hydroxylases: A historical overview and future perspectives. Hypoxia, 2, 197–212.

Shephard, R. J., & Åstrand, P.-O. (2000). Endurance sports, in endurance in sport. Blackwell Science Ltd, Oxford.

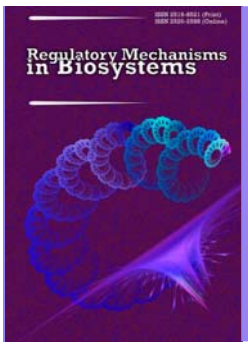
Streeten, D. H. P., Speller, P. J., & Fellerman, H. (2008). Use of corticotropin-induced potassium changes in the diagnosis of both hypo- and hyperkalemic periodic paralysis. European Neurology, 33(2), 103–108.

Takahashi, M., & Tatsugi, Y. (2013). Investigation of the attitudes of Japanese Physical Educational University students toward doping in sports. Journal of Sports Medicine and Doping Studies, 3(1), 122–125.

Tan, Y., Sun, D., Wang, J., & Huang, W. (2010). Mechanical characterization of human red blood cells under different osmotic conditions by robotic manipulation with optical tweezers. IEEE Transactions on Biomedical Engineering, 57(7), 1816–1825.

Valbonesi, M., Garelli, S., Montani, F., Cefis, M., & Florio, G. (2009). A simple and rapid test for the quantification of osmotic fragility of red blood cells. Acta Haematologica, 69(2), 106–110.

Zhu, X. (2015). Student perspectives of grading in physical education. European Physical Education Review, 21(4), 409–420.



Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(2), 135–146
doi: 10.15421/021722

Mechanism of damage to platelet and erythrocyte hemostasis in rats with prolonged hypokinesia

S. L. Popel'*, O. F. Kryzanivskaya*, V. M. Zhurakivskyi**, R. Y. Chovhan*, U. N. Dutchak**, O. O. Klipich**, Y. I. Klipich**, T. V. Knyazevich-Chorna**, A. V. Sinitsa*, N. O. Zemskaya*, I. V. Melnik**, Y. N. Yatciv*, E. Y. Lapkovskiy*, Y. V. Lutckiy*, N. I. Schovkova**

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

Article info

Received 27.03.2017
Received in revised form 17.04.2017
Accepted 23.04.2017

Precarpathian National University named after V. Stefanik, Shevchenko Str., 57, Ivano-Frankivsk, 76018, Ukraine

Ivano-Frankivsk National Medical University, Galitcka Str., 2, Ivano-Frankivsk, 76025, Ukraine
Tel.: +38-097-87-41-446.
E-mail: popelsergij@gmail.com

Popel', S. L., Kryzanivskaya, O. V., Zhurakivskyi, V. M., Chovhan, R. Y., Dutchak, U. N., Klipich, O. O., Klipich, Y. I., Knyazevich-Chorna, T. V., Sinitsa, A. V., Zemskaya, N. O., Melnik, I. V., Yatciv, Y. N., Lapkovskiy, E. Y., Lutckiy, Y. V., & Schovkova, N. I. (2017). Mechanism of damage to platelet and erythrocyte hemostasis in rats with prolonged hypokinesia. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(2), 135–146. doi:10.15421/021722

The aim of the study was to determine the morphological changes in the cellular elements of blood in rats of different ages under conditions of prolonged hypokinesia. Research into the structural and functional properties of platelets and erythrocytes was carried out by electron microscope and by biochemical methods in 90 mature male rats aged 2, 12 and 24 months. We found that in young (2 month animals) there was a significant increase in the relative content of activated platelets while the normal content of aggregated and degranulated forms with the appearance of single platelets was maintained with an imbalance of alpha and delta granules. In 12-month-old animals, platelet hemostasis disorders were manifested by a significant increase in the relative content of activated platelets (by 125.8–134.7%) with an increase in aggregated and degranulated forms, the appearance of numerous platelets with an imbalance of alpha- and delta-granules, and reduction of mitochondria (by 24.9–27.8%). In 24 month old animals there was a sharp violation of platelet hemostasis due to a significant increase in the content of activated, degranulated and aggregated platelets, the release of the majority of granules, the development of intravascular platelet hyperactivation, an increase in the number of reversible and irreversibly transformed erythrocytes, an increase in the level of aggregation, in particular the appearance of complex cellular aggregates and bizarre forms of red blood cells. The greatest degree of manifestation of morpho-functional changes was revealed in animals aged 24 months, with relative stability of the hemostasis system in 2 and 12 month old animals. Our results showed that irrespective of age, the degree of disturbance of platelet-erythrocyte hemostasis rose as the period of hypokinesia increased and also depended on the increase in the level of serum creatinine. Taken together, intravascular platelet hyperactivation, an imbalance in the content of all types of granules, the transformation of surface cytoarchitectonics of erythrocytes, and the formation of platelet aggregates may play the role of an early predictor of the development of hypokinetic disease.

Keywords: hypokinesia; blood platelet; erythrocytes; hemostasis; ultrastructure

Механізм тромбоцитарно-еритроцитарного гемостазу щурів різного віку за тривалої гіпокінезії

С. Л. Попель*, О. Ф. Крижанівська*, В. М. Жураківський**, Р. Я. Човган*, У. М. Дутчак**, О. О. Кліпич**, Я. І. Кліпич**, Т. В. Князевич-Чорна**, А. В. Синиця*, Н. О. Земська*, І. В. Мельник**, Я. М. Яців*, Е. Й. Лапковський*, Я. В. Луцький*, Н. І. Шовкова**

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

Мета досліджень полягала у визначенні морфологічних змін клітинних елементів крові у щурів різного віку за тривалої гіпокінезії. Дослідження структурно-функціональних властивостей тромбоцитів та еритроцитів проведені електронномікроскопічними та біохімічними методами на 90 статевозрілих щурах-самцях віком 2, 12 і 24 місяці. У двомісячних тварин відбувається вірогідне збільшення відносного вмісту активованих тромбоцитів зі збереженням нормального вмісту агрегованих і дегранульованих форм і появою поодиноких тромбоцитів із дисбалансом альфа- та дельта-гранул. У 12-місячних тварин порушення тромбоцитарного гемостазу полягають у вірогідному збільшенні відносного вмісту активованих тромбоцитів (на 125,8–134,7%) з підвищенням вмісту агрегованих і

дегранульованих форм, появою численних тромбоцитів із дисбалансом альфа- та дельта-гранул, а також редукцією мітохондрій (на 24,9–27,8%). У 24-місячних тварин спостерігається значна активація тромбоцитарно-еритроцитарної ланки гемостазу за рахунок вірогідного наростання вмісту активованих, дегранульованих і агрегованих тромбоцитів, вивільнення вмісту більшості гранул, розвитку внутрішньосудинної гіперактивації тромбоцитів, збільшення кількості зворотно та незворотно трансформованих еритроцитів, підвищення рівня агрегації, зокрема, появи складних клітинних агрегатів і химерних форм еритроцитів. Найбільший ступінь прояву морфофункціональних змін виявляється у тварин віком 24 місяці, за відносної стійкості системи гемостазу у тварин 2- та 12-місячного віку. Незалежно від віку ступінь порушення тромбоцитарно-еритроцитарного гемостазу підвищується у міру зростання терміну гіпокінезії та залежить також від збільшення рівня креатиніну сироватки крові. У своїй сукупності внутрішньосудинна гіперактивація тромбоцитів, дисбаланс вмісту всіх типів гранул, трансформація поверхневої цитоархітектоніки еритроцитів і формування тромбоцитарних агрегатів можуть відігравати роль раннього предиктора розвитку гіпокінетичної хвороби.

Ключові слова: гіпокінезія; тромбоцит; еритроцит; гемостаз; ультраструктура

Вступ

Нині серед екстремальних факторів навколишнього середовища, які впливають на структуру та функцію організму, особливо виділяється обмеження рухової активності. При цьому існує досить багато літературних джерел, присвячених вивченню механізмів впливу гіпокінезії, а також розробок заходів профілактики її шкідливого впливу на організм людини (Zorbas et al., 2012; Tseilikman et al., 2013; Lutfi, 2016).

Однак залишається мало вивченим вплив гіпокінезії на гемостаз. У багатьох публікаціях останніх років, присвячених еритроцитно-тромбоцитарному гемостазу, підкреслюється важливість вихідного морфофункціонального стану клітинних елементів крові для формування адекватних реакцій та зміни гомеостазу. Причин, що зумовлюють гіпокінезію в сучасної людини, багато: професії у високоавтоматизованих і механізованих галузях виробництва, навчання в різноманітних навчальних закладах, звичка до малорухомого способу життя, тривалий ліжковий режим за деяких захворювань (травми, паралічі, інфаркт міокарда, розлади мозкового кровообігу тощо).

Нині відомі різні аспекти негативного впливу гіпокінезії на організм, внаслідок чого з'являються різні морфофункціональні зміни. Перш за все, досліджено порушення опорно-рухового апарату та його нейротрофічного забезпечення під час обмеження рухової активності (Jaeger and Jung, 2015). При цьому менше уваги приділяли морфологічній перебудові органів кардіореспіраторної, травної та видільної системи. І зовсім небагато праць присвячено вивченню ендокринної та імунної системи, а також біохімічним змінам за гіпокінезії. Однак у механізмі гіпокінетичних порушень структури майже всіх органів провідну роль відіграють реакція мікросудин та зміни клітинних компонентів крові (Tseilikman et al., 2013). Тому наукову та практичну значимість становить усебічне вивчення впливу гіпокінезії на еритроцитно-тромбоцитарний гемостаз.

Профілактика мікро- та макросудинних ускладнень за гіпокінезії полягає в інтенсивній корекції багатьох розладів, найважливіші з яких – дисфункція ендотелію та порушення внутрішньосудинного еритроцитарно-тромбоцитарного гемостазу (Marks, 2012; Delano et al., 2015).

Важливу роль у патогенезі мікросудинних порушень виконують зміни системи гемостазу та пошкодження реологічної функції – ендотелію судин, тромбоцитів, фібринолізу та гемокоагуляції (Bennett, 2014). Виражені гемореологічні дефекти визначаються навіть на ранніх стадіях гіпокінетичної хвороби та характеризуються підвищенням в'язкості крові та агрегаційної здатності еритроцитів і тромбоцитів, а також фібринолітичної активності плазми крові (Huang et al., 2016). У циркуляції відбувається постійне утворення агрегатів із тромбоцитів, еритроцитів, лейкоцитів, а також конгломератів, що виникають завдяки взаємодії окремих клітин крові між собою (Hayward, 2011).

За даними морфологічних досліджень, у патогенезі багатьох захворювань тією або іншою мірою відіграють роль порушення функції тромбоцитів і еритроцитів. Гіпокінезія та супутні зміни метаболізму викликають аномалії внутрішньоеритроцитарних і мембранних обмінних процесів у тромбоцитах.

Патогенез коагулопатичного синдрому за тривалої гіпокінезії залишається недостатньо вивченим. При цьому деякі автори (Juravlyova et al., 2016) вказують на підвищення агрегаційної здатності тромбоцитів і еритроцитів унаслідок гіперліпідемії та диспротеїнемії, які закономірно виникають за тривалої гіпокінезії (Zorbas et al., 2012; Gainutdinov et al., 2013). Це погіршує реологічні властивості крові, що викликає уповільнення кровообігу та посилення агрегації тромбоцитів і еритроцитів (Korneychuk et al., 2016).

Окремі автори (Lutfi, 2016), вказують, що у людей під час імобілізаційного стресу істотно підвищується внутрішньосудинна активація тромбоцитів на фоні зниження антиагрегантної активності стінки судин, що викликає появу в судинному руслі не тільки тромбоцитарних, а й масивних за своїм клітинним складом тромбоцитарно-еритроцитарних агрегатів із подальшим порушенням мікроциркуляції (Tseilikman et al., 2013). Отже, актуальним залишається з'ясування та подальше розроблення багатьох проблем, пов'язаних з аналізом морфологічного субстрату внутрішньоклітинних процесів та міжклітинних взаємодій, що відбуваються за тривалої гіпокінезії.

Мета роботи – вивчити морфологічні зміни клітинних елементів крові у щурів за тривалої гіпокінезії.

Матеріал і методи досліджень

Гіпокінезію моделювали в лабораторних щурів лінії Вістар за загальноприйнятою методикою у модифікації Jaeger and Jung (2015). Тварин експериментальної групи поділили на три вікові підгрупи (по 30 тварин у кожній). До складу I підгрупи увійшли 2-місячні щури, до II – 12-місячні, до III – 24-місячні тварини. Тварин виводили з експерименту через 90, 180 і 240 діб із початку моделювання гіпокінезії з дотриманням загальноприйнятих правил. Контролем служили 45 інтактних тварин (по 15 щурів у кожній підгрупі відповідного віку).

Морфологічне типування клітинних елементів крові здійснювали за рекомендаціями Kitchen and Makris (2010) і Falet (2012).

Для визначення активності ферментів антиоксидантної системи в еритроцитах кров забирали з хвостової вени щомісячно з першого по восьмий місяць експерименту. Активність ферментів антиоксидантної системи захисту визначали в гемолізатах еритроцитів. Для лізису використовували 0,01% розчин сапоніну в 0,01 М Na-K-фосфатному буфері (pH 7,4). Активність каталази визначали за швидкістю утилізації перекису водню за участі FOX-реактиву. За каталазну активність еритроцитів приймали кількість мкмоль субстрату (H_2O_2), перетворюваного ферментом за хвилину, розраховану на міліграм гемоглобіну (Hb) у пробі, тобто в мкмоль/(хв•мг Hb).

Активність супероксиддисмутази визначали спектрофотометричним методом. Для відображення істинної природи взаємозв'язку між активностями ферментів системи антиоксидантного захисту аналізували їх співвідношення.

Для ультраструктурного аналізу видаляли прямий м'яз стегна та тромбоцити зі збагаченої фракції плазми крові, які використовували для подальшого дослідження відповідно до рекомендацій Ali (2015). Для виготовлення епоксидних блоків використовували композицію епон-аралдіт. Зрізи одержували на ультрамікротомі УМТП-6М (Selmi, Україна). Дослідження проводили за допомогою трансмісійного електронного мікроскопа ПЕМ-100К (Selmi, Україна) з прискорювальною напругою 75 кВ за

збільшень 2 000–80 000 разів. У цілому, електронномікроскопічне дослідження проводили за стандартною схемою (Mio et al., 2016).

Вивчення поверхневої цитоархітектоніки еритроцитів і тромбоцитів венозної крові проводили за допомогою сканувальною електронного мікроскопа JEOL-25A-T3225 (Японія) з прискорювальною напругою 20 кВ. Тварин утримували в умовах віварію згідно з нормативними документами.

Для статистичної обробки результатів застосовували пакет Statistica 6.1 (StatSoft Inc., USA). Для порівняння дослідних груп (залежно від типу статистичного розподілу) брали парний t-критерій Стьюдента або його непараметричний аналог – критерій Уїлкоксона. Оцінювання відповідності розподілу величин нормальному (Гаусса) проводили за допомогою коефіцієнтів ексцесу та асиметрії.

Результати

В усіх тварин незалежно від віку максимум активності супероксиддисмутази припадає на 90-ту добу експерименту, коли її концентрація в 1,8–2,1 раза перевищує дані контрольної групи. Через 180 діб із початку моделювання гіпокінезії активність супероксиддисмутази знижується, однак залишається в 1,4–1,5 раза вищою за контроль, проте до 240-ї доби активність ферменту була нижчою за контроль на 45–50% ($P < 0,05$). Інша динаміка показників спостерігається в активності каталази, коли виявляються два максимуми: перший – через 90 діб, другий – через 210 діб із початку моделювання гіпокінезії (рис. 1). Порівняно з контрольними тваринами біохімічний склад крові змінюється також за рахунок підвищення рівня креатиніну, яке залежить від віку щурів і терміну гіпокінезії. У тварин I групи рівень креатиніну підвищується на 12,4% через 90 діб, на 19,8% – через 180 діб і на 24,6% – через 240 діб після початку моделювання гіпокінезії. Значно менші коливання спостерігаються у щурів II вікової групи: відповідно на 8,9%, 12,1% і 18,4% ($P < 0,05$). Найбільші зміни виявляються у тварин III групи, в яких рівень креатиніну підвищується відповідно на 14,6%, 22,7% і 28,2% ($P < 0,05$).

Одночасно з біохімічними змінами спостерігається структурна перебудова клітинних компонентів крові. При цьому у щурів I підгрупи через 90 діб після початку моделювання гіпокінезії кількість дегранульованих тромбоцитів зросла у 2,87 раза ($P < 0,05$). Це відбувається за рахунок вивільнення переважно альфа-гранул, тому частка активованих і агрегованих тромбоцитів більше ніж удвічі перевищувала значення контрольної групи (табл. 1). У складі тромбоцитарного пулу цих тварин виявляли лише поодинокі форми клітин із помітним дисбалансом альфа- та дельта-гранул, а також змінами в умісті лізосом і ультраструктури мітохондрій. Фрагменти тромбоцитів і псевдоподії спостерігали в невеликій кількості. У переважної більшості тварин морфологія хромомера тромбоцитів свідчить про незначний ступінь порушення тромбоцитарно-еритроцитарного гемостазу (рис. 2*а*, *б*).

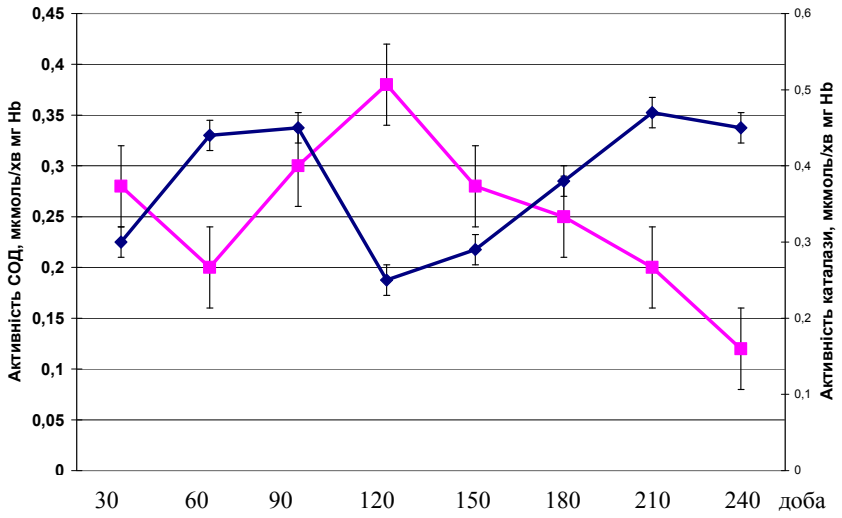


Рис. 1. Зміна активності основних ферментів системи антиоксидантного захисту еритроцитів у різні терміни тривалої гіпокінезії: СОД – супероксиддисмутаза

У тварин I підгрупи через 180 діб спостерігали значні патологічні зміни тромбоцитів, які супроводжувалися істотною гетероморфністю тромбоцитарного пулу за його функціональною гіперактивністю та змінами структури хромомера більшості тромбоцитів. Вказані зміни свідчать про те, що за гіпокінезії часто розвивається псевдоподіальний та, рідше, гіаліновий тип морфологічної трансформації тромбоцитів (рис. 3, 4).

Визначення морфології циркулюючих агрегатів крові виявило наявність значної кількості функціонально активних поліморфноядерних лейкоцитів у складі агрегатів із розвиненими псевдоподіями, численними фагосомами та їх комплексами зі специфічними та неспецифічними гранулами. Разом із цим, присутність незрілих форм нейтрофілів підтверджувала наявність як ендотеліальної дисфункції, так і активного внутрішньоклітинного запалення. Про розвиток запального процесу свідчила також значна частка активованих еозинофілів у складі тромбоцитарно-лейкоцитарних агрегатів. Такі еозинофіли разом зі зрілими гранулами та характерним кристалоїдом високої електронної щільності містили поліморфні зерна значно менших розмірів поблизу ядра.

Зустрічали також частково дегранульовані клітини із залишками лабільних гранул під цитолемою. Слід зазначити, що разом зі значним підвищенням частки агрегованих тромбоцитів спостерігали наявність великих сферичних форм із новоутвореними псевдоподіями, ознаками дестабілізації зовнішньої мембрани та істотним розширенням відкритої системи канальців. Глибокі ділянки цієї системи містили аморфний матеріал помірної електронної щільності, який кількісно значно перевищує вміст альфа-гранул.

У щурів I групи через 240 діб спостерігали істотне зниження вмісту нормальних дископодібних тромбоцитів щодо контролю (на 24,2%, $P < 0,05$) за рахунок різкого наростання кількості дискоехіноцитів, сфероцитів і сфероехіноцитів, що викликало підвищення вмісту активних клітин удвічі ($P < 0,05$). Установлено пропорційне наростання в циркуляції малих тромбоцитарних агрегатів, тоді як великі тромбоцитарні агрегати не утворюються. Кількісна оцінка вмісту зворотно та незворотно конформованих еритроцитів також не виявила істотних змін у тварин цієї вікової підгрупи порівняно з контрольною групою.

У щурів II групи через 90 діб гіпокінезії знайдено значну активацію тромбоцитарної ланки гемостазу та пошкодження тинкторіальних властивостей еритроцитів. Частка активованих

тромбоцитів у цій групі тварин перевищувала рівень контрольної групи майже в 2,5 раза (табл. 2). Також різко підвищеним виявився рівень агрегованих і дегранульованих форм. За рахунок цього вміст неактивованих тромбоцитів крові поступався контрольному показнику на 45,2% ($P < 0,05$).

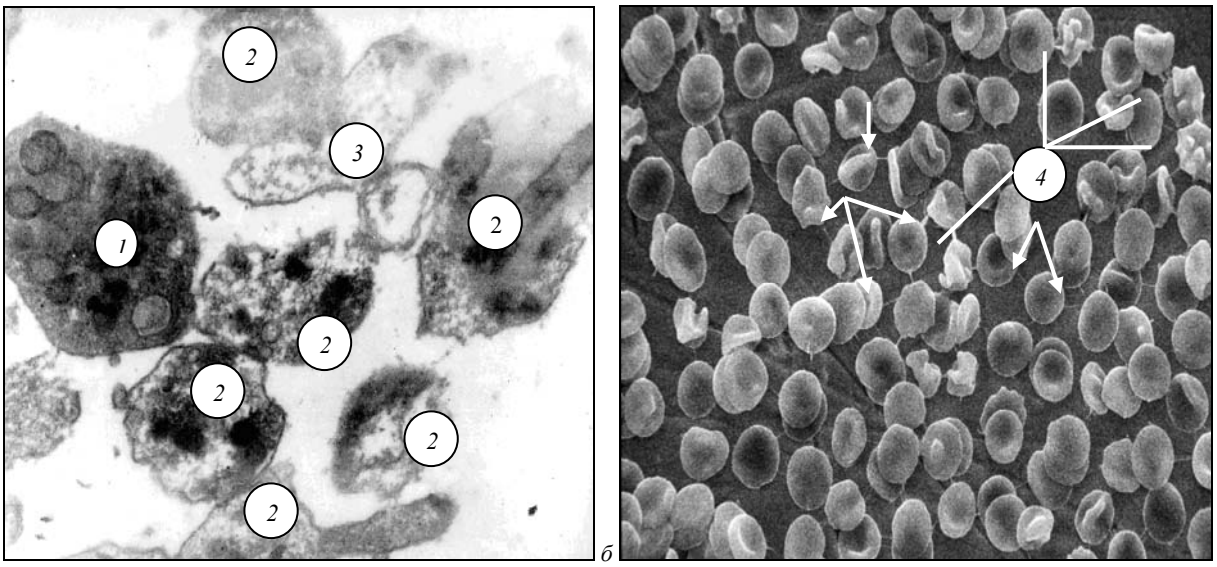
Утворення дегранульованих форм відбувалося переважно за рахунок вивільнення альфа-гранул. Ступінь вказаних патоморфологічних змін значною мірою залежав від рівня креатиніну у плазмі крові. У складі тромбоцитарного пулу крові тварин II групи виявлялася незначна кількість тромбоцитів з істотним дисбалансом альфа- та дельта-гранул, а також ультраструктурними змінами лізосом і мітохондрій. Фрагменти тромбоцитів і псевдоподії спостерігали в помірній кількості. У переважної більшості тварин цієї групи морфологія хромомера тромбоцитів свідчить про обмежено розвинений ступінь порушень тромбоцитарного гемостазу (рис. 5).

Таблиця 1

Морфометричні показники клітинних елементів крові у щурів I вікової групи за тривалої гіпокінезії порівняно з контрольною групою тварин (x ± SE)

Параметри	Контрольна група	Експериментальна група: термін експерименту, діб		
		90	180	240
Тромбоцити				
Неактивні тромбоцити, %	76,15 ± 3,33	44,93 ± 2,11*	41,02 ± 2,16*	37,92 ± 1,73*
Агреговані тромбоцити, %	6,79 ± 0,53	14,39 ± 1,05*	17,08 ± 1,34*	18,31 ± 1,17*
Активні тромбоцити, %	15,99 ± 1,27	35,95 ± 2,17*	41,53 ± 2,15*	40,11 ± 2,33*
Активовані тромбоцити, %	23,97 ± 1,85	54,24 ± 2,14*	58,89 ± 3,71*	62,04 ± 3,02*
Біполярні тромбоцити, %	0,55 ± 0,03	0,77 ± 0,03	0,89 ± 0,07*	1,15 ± 0,11*
Дегранульовані тромбоцити, %	5,93 ± 1,11	16,87 ± 1,15*	18,55 ± 1,33*	20,02 ± 1,54*
Дрібні тромбоцитарні агрегати	3,15 ± 0,11	6,18 ± 0,52*	12,01 ± 1,17*	14,36 ± 1,14*
Великі тромбоцитарні агрегати	0,17 ± 0,01	0,21 ± 0,01	2,62 ± 0,14*	4,41 ± 0,83*
Альфа-гранули, мкм^3/мкм^3	0,105 ± 0,011	0,076 ± 0,012*	0,066 ± 0,008*	0,057 ± 0,003*
Дельта-гранули, мкм^3/мкм^3	0,033 ± 0,007	0,031 ± 0,009	0,029 ± 0,005	0,025 ± 0,005*
Лізосоми, мкм$^{-2}$	0,141 ± 0,011	0,124 ± 0,002	0,119 ± 0,001	0,096 ± 0,010*
Мітохондрії, мкм^3/мкм^3	0,023 ± 0,005	0,021 ± 0,005	0,017 ± 0,003*	0,014 ± 0,002*
Еритроцити				
Дискоцити, %	89,71 ± 3,51	63,22 ± 3,92*	57,59 ± 3,21*	51,97 ± 2,40*
Дискоехіноцити, %	10,28 ± 1,54	22,85 ± 1,61*	25,74 ± 2,68*	29,09 ± 1,37*
Сфероцити, %	1,88 ± 0,32	6,04 ± 0,82*	8,61 ± 1,05*	10,81 ± 0,75*
Сфероехіноцити, %	1,72 ± 0,24	2,44 ± 0,52*	2,83 ± 0,33*	3,12 ± 0,14*
Зворотно змінені еритроцити, %	6,34 ± 0,23	11,93 ± 0,85	12,84 ± 0,92*	12,72 ± 0,94*
Незворотно змінені еритроцити, %	2,69 ± 0,11	2,98 ± 0,22	3,23 ± 0,11*	4,01 ± 0,15*

Примітка: * – вірогідна різниця з контрольними показниками $P < 0,05$.



а *б*

Рис. 2. Ультраструктура тромбоцитів (*а*) та еритроцитів (*б*) периферичної крові щурів I підгрупи через 90 діб із початку моделювання тривалої гіпокінезії: *1* – неактивний тромбоцит, *2* – активований тромбоцит, *3* – «тінь тромбоцита», *4* – дегенеративні форми еритроцитів; стрілками показано «нитки агрегації» між окремими еритроцитами; *а* – трансмісійна електронна мікроскопія, *б* – сканувальна електронна мікроскопія; *а* – 15 000, *б* – 2 000

На відміну від тварин попереднього терміну експерименту, у щурів II групи через 180 діб із початку моделювання гіпокінезії виявляли значніші зміни тромбоцитів, які проявляються істотною гетероморфністю тромбоцитарного пулу за його функціональною гіперактивністю. При цьому зміни структури хромомера у більшості тромбоцитів відбуваються на фоні їх морфологічної трансформації за псевдоподіальним типом (рис. 6, 7).

Крім того, у тварин II групи через 180 діб із початку моделювання гіпокінезії з підвищенням креатиніну плазми крові збільшується кількість складних агрегатів, які мають значну кількість еритроцитів. Серед них переважали незворотно трансформовані форми – куполоподібні та сфероцити, а також еритроцити у вигляді «спущеного м'яча» та ехіноцити.

За даними трансмісійної електронної мікроскопії, кількість малих тромбоцитарних агрегатів у 3,7 раза перевищувала показник контрольної групи. У тварин у даний термін дослідження виявляли середні та великі агрегати, які в окремих випадках містили лейкоцити або еритроцити. Ультраструктурним дослідженням

дегранульованих тромбоцитів поблизу цитолеми виявляли численні лабільні гранули із фрагментованими мембранами.

Такі постклітинні форми, на відміну від агрегованих тромбоцитів, переважно зустрічалися поза складом агрегатів. Також спостерігали появу великих сферичних форм із наявністю новоутворених псевдоподій на поверхні, ознаками дестабілізації зовнішньої мембрани та істотним розширенням відкритої канальцевої системи. Глибокі ділянки цієї системи містять аморфний матеріал помірної електронної щільності. Кількість щільних тілець перевищувала вміст альфа-гранул. При цьому кількість лізосом і мітохондрій зменшується порівняно з неактивними тромбоцитами.

У щурів II групи через 240 діб спостерігали зниження вмісту нормальних дископодібних еритроцитів за рахунок різкого наростання кількості дискоехіноцитів, сфероцитів і сфероехіноцитів. Також установлено значне збільшення кількості тромбоцитарних агрегатів найрізноманітніших розмірів.

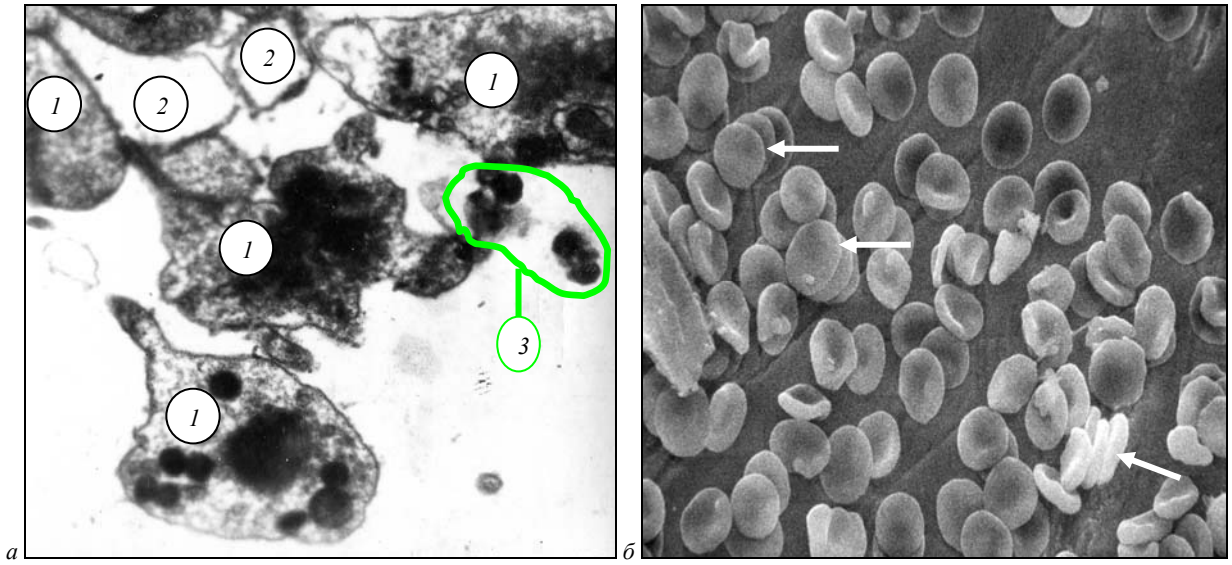


Рис. 3. Ультраструктура тромбоцитів (*а*) та еритроцитів (*б*) периферичної крові щурів I групи через 180 діб із початку моделювання тривалої гіпокінезії: *1* – активований тромбоцит, *2* – «тінь тромбоцита», *3* – вільні гранули тромбоцитів; стрілками показано еритроцитарні сладжі у вигляді «монетних стовпчиків»; *а* – трансмісійна електронна мікроскопія, *б* – сканувальна електронна мікроскопія; *а* – ^{x}15 000, *б* – ^{x}2 000

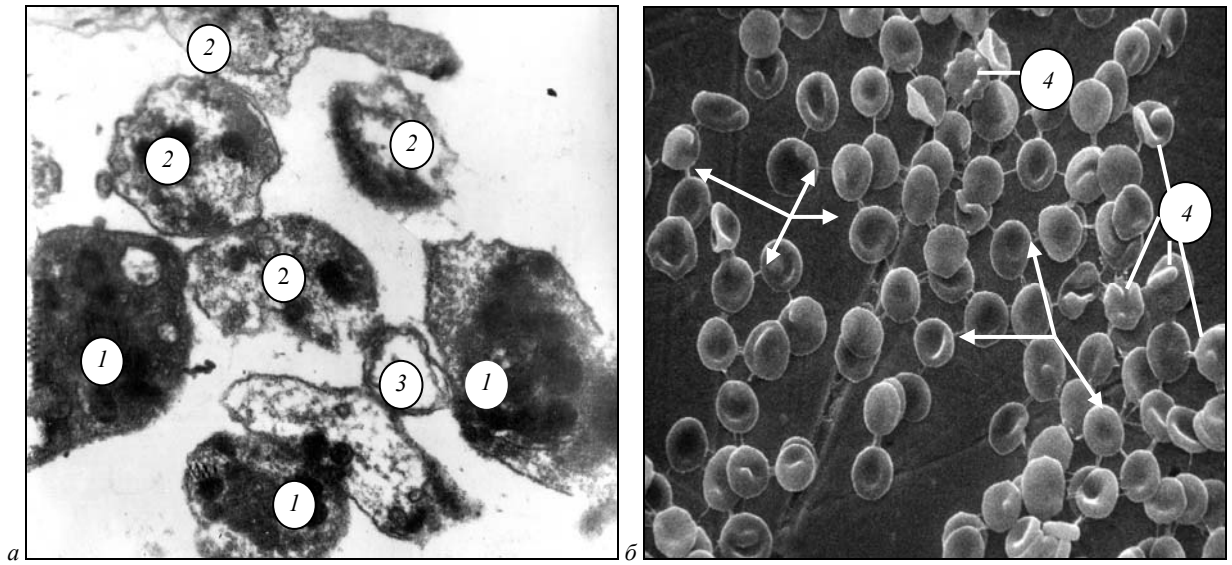


Рис. 4. Ультраструктура тромбоцитів (*а*) та еритроцитів (*б*) периферичної крові щурів I групи через 240 діб із початку моделювання тривалої гіпокінезії: *1* – неактивний тромбоцит, *2* – активований тромбоцит, *3* – «тінь тромбоцита», *4* – дегенеративні форми еритроцитів; стрілками показано численні «нитки агрегації» між окремими еритроцитами; *а* – трансмісійна електронна мікроскопія, *б* – сканувальна електронна мікроскопія; *а* – ^{x}15 000, *б* – ^{x}2 000

Структурний аналіз клітинних елементів крові у тварин III групи через 90 діб виявив значну морфологічну перебудову тромбоцитів. Зокрема, частка активованих тромбоцитів підвищувалася більше ніж у 2,5 раза порівняно з показниками контрольної групи. Спостерігається також значне (у 2,7 раза) зростання кількості активованих форм (рис. 8).

Дегранульовані тромбоцити за відносним вмістом у 3,2 раза перевищували показник контрольної групи за рахунок вивільнення альфа-гранул і дельта-гранул, а також вірогідного зменшення вмісту лізосом і мітохондрій (табл. 3).

У цілому, у складі тромбоцитарного пулу тварин III групи через 180 діб із початку моделювання гіпокінезії виявили численні тромбоцити з помітним дисбалансом альфа- та дельта-гранул, а також зміни лізосом і ультраструктури мітохондрій.

У значній кількості зустрічали фрагменти тромбоцитів і розгалужені псевдоподії на поверхні клітин. У більшості тварин морфологія хромомера тромбоцитів свідчила про виражений ступінь порушень тромбоцитарного гемостазу (рис. 9).

У тварин III групи через 240 діб спостерігали різку активацію тромбоцитів, які супроводжувалися їх істотною гетероморфністю.

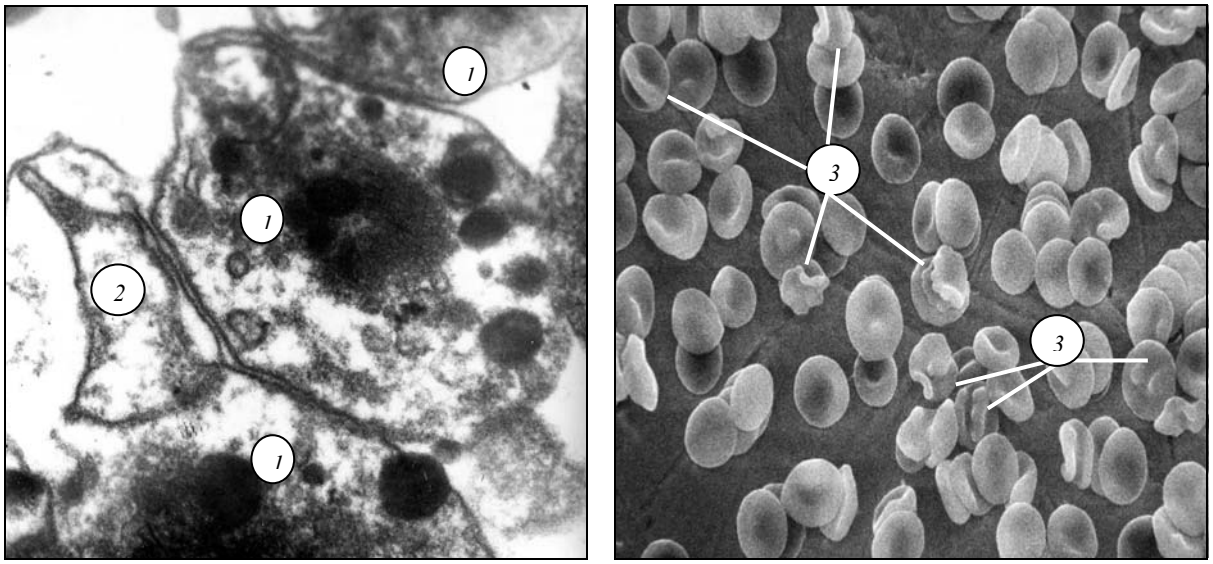
У більшості тромбоцитів це проявляється функціональною гіперактивністю та змінами структури хромомера на фоні обмеженої здатності утворювати псевдоподії (рис. 10). Поряд із цим спостерігали апоптоз ендотеліоцитів і підвищений рівень агрегації клітинних елементів крові (рис. 11). Морфологічно великі за розмірами циркулюючі агрегати відповідали структурі складних утворень, які містять еритроцити химерної форми. Часто спостерігали частково дегранульовані тромбоцити із залишками лабільних гранул.

Таблиця 2

Морфометричні показники клітинних елементів крові у щурів II групи за тривалої гіпокінезії порівняно з контрольною групою тварин (x ± SE)

Параметри	Контрольна група	Експериментальна група: термін експерименту, діб		
		90	180	240
Тромбоцити				
Неактивні тромбоцити, %	75,41 ± 4,61	47,34 ± 4,32*	44,11 ± 3,37*	39,12 ± 2,14*
Агреговані тромбоцити, %	6,82 ± 0,54	10,65 ± 1,23*	14,03 ± 1,27*	16,34 ± 1,12*
Активні тромбоцити, %	16,72 ± 1,22	25,43 ± 3,11*	31,33 ± 2,15*	39,24 ± 2,58*
Активовані тромбоцити, %	22,23 ± 1,73	33,15 ± 2,11*	40,22 ± 2,16*	50,32 ± 2,06*
Біполярні тромбоцити, %	0,55 ± 0,01	0,59 ± 0,03	0,72 ± 0,04	0,93 ± 0,07*
Дегранульовані тромбоцити, %	6,29 ± 0,31	8,31 ± 1,07*	11,55 ± 1,71*	16,83 ± 1,91*
Дрібні тромбоцитарні агрегати	3,14 ± 0,12	4,57 ± 0,43*	8,36 ± 1,12*	11,37 ± 1,85*
Великі тромбоцитарні агрегати	0,18 ± 0,02	0,19 ± 0,03	0,41 ± 0,09*	1,25 ± 0,03*
Альфа-гранули, мкм^3/мкм^3	0,108 ± 0,022	0,082 ± 0,006*	0,074 ± 0,006*	0,061 ± 0,005*
Дельта-гранули, мкм^3/мкм^3	0,037 ± 0,011	0,034 ± 0,008	0,031 ± 0,007	0,027 ± 0,005*
Лізосоми, мкм$^{-2}$	0,142 ± 0,008	0,131 ± 0,005	0,126 ± 0,004	0,119 ± 0,005*
Мітохондрії, мкм^3/мкм^3	0,024 ± 0,006	0,022 ± 0,004	0,019 ± 0,003*	0,016 ± 0,002*
Еритроцити				
Дискоцити, %	84,61 ± 3,17	78,12 ± 4,04*	68,71 ± 2,11*	63,15 ± 2,11*
Дискоехіноцити, %	11,67 ± 0,85	15,72 ± 1,24*	20,23 ± 1,37*	25,17 ± 1,23*
Сфероцити, %	2,93 ± 0,11	3,06 ± 0,32*	5,03 ± 0,19*	8,24 ± 1,56*
Сфероехіноцити, %	1,66 ± 0,02	1,83 ± 0,21*	2,21 ± 0,15*	2,99 ± 0,33*
Зворотно змінені еритроцити, %	9,56 ± 0,88	10,97 ± 0,81 .	12,03 ± 0,77*	14,01 ± 1,77*
Незворотно змінені еритроцити, %	2,73 ± 0,15	2,85 ± 0,11	3,07 ± 0,25*	4,33 ± 0,21*

Примітка: * – вірогідна різниця з контрольними показниками P < 0,05.



а *б*

Рис. 5. Ультраструктура тромбоцитів (*а*) та еритроцитів (*б*) периферичної крові щурів II групи через 90 діб із початку моделювання тривалої гіпокінезії: *1* – активований тромбоцит, *2* – «тінь тромбоцита», *3* – дегенеративні форми еритроцитів; *а* – трансмісійна електронна мікроскопія, *б* – сканувальна електронна мікроскопія; *а* – ^{x}15 000, *б* – ^{x}2 000

У сканувальному електронному мікроскопі циркулюючі агрегати виявляються у формі дрібних груп еритроцитів і тромбоцитів, часто зміненої форми, які помітні на оголеній базальній мембрані та, як правило, вкриті густою сіткою фібрину (рис. 11*в*, *г*). Разом зі значно підвищеним рівнем агрегованих тромбоцитів спостерігали появу великих сферичних форм із псевдоподіями та ознаками дестабілізації зовнішньої мембрани. Мембрани канальців часто фрагментовані. При цьому цитолема тромбоцитів втрачала цілісність на ділянках, які контактували з іншими клітинами у складі агрегатів. У тварин цієї вікової групи концентрація малих тромбоцитарних агрегатів крові в середньому в 4,7 раза перевищувала значення контрольної групи. У цих тварин також спостерігали різке (у 4,4 раза) перевищення контрольних значень вмісту середніх і великих тромбоцитарних агрегатів.

Реєстрували статистично вірогідне (P < 0,05) зниження вмісту нормальних дископодібних еритроцитів (на 36,7%) за рахунок різкого зростання кількості дискоехіноцитів (у 2,7 раза), сфероцитів (у 3,8 раза) і сфероехіноцитів (у 1,9 раза), що відбувається на фоні значного (у 2,5 раза) підвищення вмісту активних форм тромбоцитів, зворотно та незворотно трансформованих еритроцитів – на 50,4% і 25,5% (P < 0,05) відповідно.

Обговорення

Для розкриття патогенетичних механізмів формування пошкоджень на тканинному та клітинному рівні істотний інтерес

становить вивчення ролі гемостазу в забезпеченні адаптаційних реакцій організму під час іммобілізаційного стресу, оскільки еритроцити та тромбоцити, тісно контактуючи з усіма тканинами та вступаючи з ними у морфофункціональні взаємовідносини, власною кількісною та якісною перебудовою відображають фізіологічні та патологічні зміни, що відбуваються в організмі під час різних функціональних станів, у тому числі при гіпокінезії. Тільки окремі автори присвятили дослідження вивченню гемостазу за гіпокінезії у людини та тварин (Zorbas et al., 2012; Juravlyova et al., 2016). Однак вони досліджували гемостатичну функцію крові тільки в короткі терміни гіпокінезії (протягом 15–30 діб). При цьому встановлено, що зниження цієї функції за коротокотривалої гіпокінезії супроводжується розвитком гіпокоагуляції, механізм якого пов'язаний зі зниженням активності факторів згортання плазми крові та функції тромбоцитів.

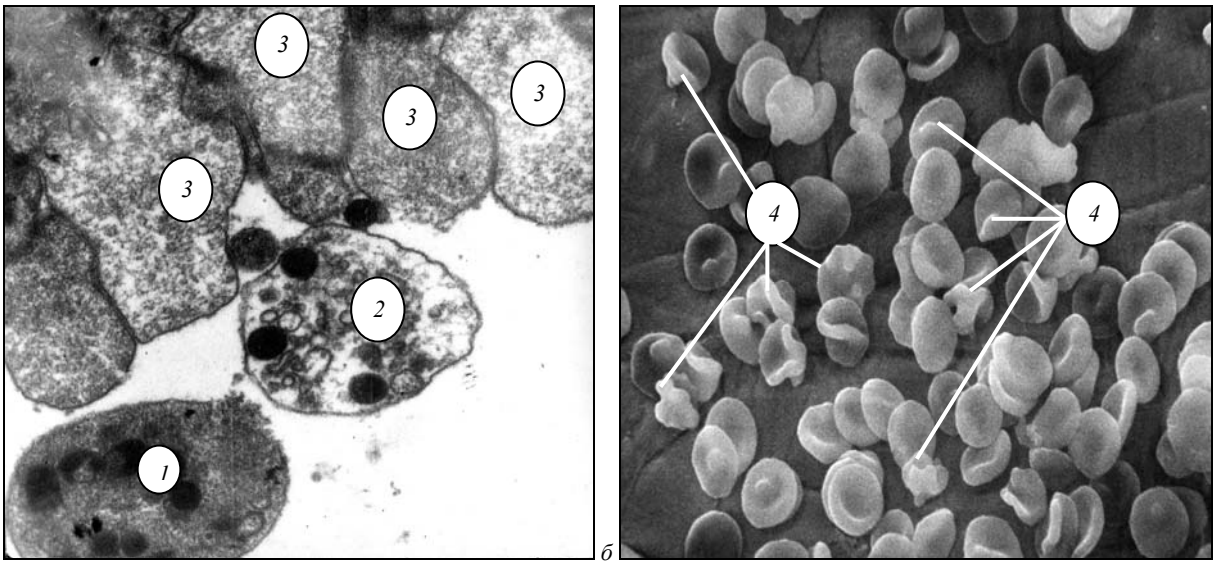


Рис. 6. Ультраструктура тромбоцитів (*а*) та еритроцитів (*б*) периферичної крові щурів II групи через 180 діб із початку моделювання тривалої гіпокінезії: *1* – неактивний тромбоцит, *2* – активований тромбоцит, *3* – «тінь тромбоцита», *4* – дегенеративні форми еритроцитів; *а* – трансмісійна електронна мікроскопія, *б* – сканувальна електронна мікроскопія; *а* – ˣ15 000, *б* – ˣ2 000

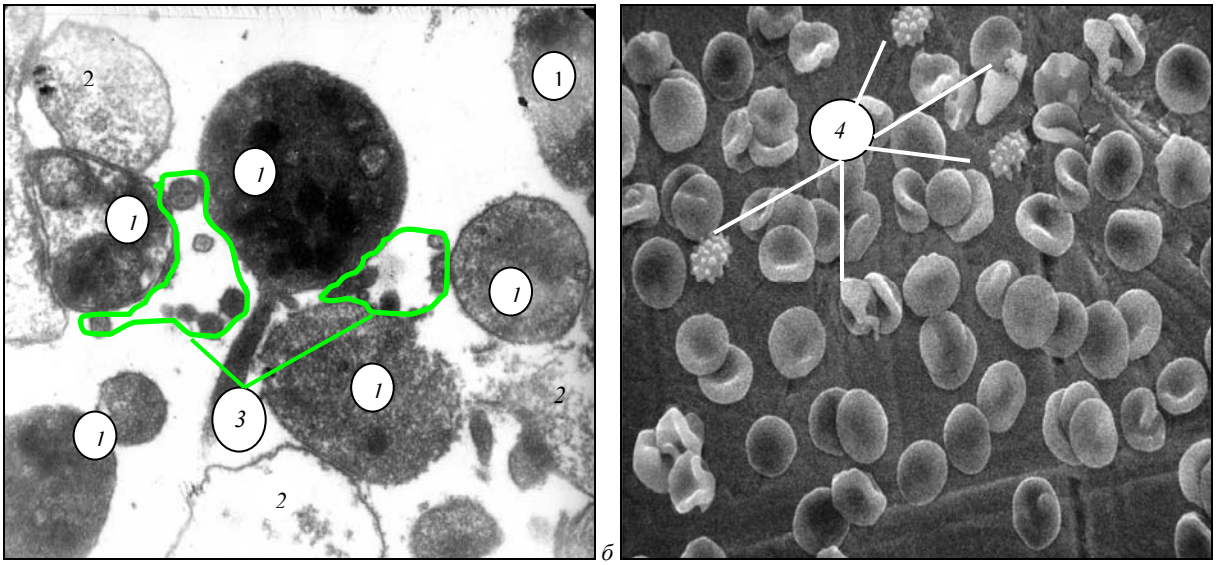


Рис. 7. Ультраструктура тромбоцитів (*а*) та еритроцитів (*б*) периферичної крові щурів II групи через 240 діб із початку моделювання тривалої гіпокінезії: *1* – активований тромбоцит, *2* – «тінь тромбоцита», *3* – вільні гранули, *4* – дегенеративні форми еритроцитів; *а* – трансмісійна електронна мікроскопія, *б* – сканувальна електронна мікроскопія; *а* – ˣ15 000, *б* – ˣ2 000

Gainutdinov et al. (2013) показали, що в реадаптаційному періоді після 30-денної гіпокінезії в людей гіпокоагуляція змінюється підвищенням тромботвірної функції крові, причини та механізм якої залишаються мало вивченими. Невідомі також причини фазних змін гемостазу (з гіпокоагуляції на період гіперкоагуляції крові), що відіграє важливу роль у розвитку тромбгеморагічного синдрому за тривалої гіпокінезії.

Разом із тим, гіпокінезія (Stogov, 2009; Juravlyova et al., 2016) порушує гемокоагуляцію тільки за рахунок порушення концентрації факторів згортання у плазмі крові, а отже, збільшує ризик розвитку кровотечі, але не тромбозів (Duan et al., 2014). Додаткові екстремальні дії (емоційний стрес, оперативне лікування з наступним тривалим ліжковим режимом у разі іммобілізації нижніх кінцівок або тіла в цілому) сприяють прискоренню безперервного внутрішньосудинного згортання крові до ступеня дисемінованого внутрішньосудинного згортання крові (Marcus, 2012; Delano et al., 2015) – тобто викликають гемостатичні зрушення, що вимагають корекції.

Таким чином, дані літератури відносно характеру та механізмів розвитку гемостатичної функції крові за гіпокінезії мають іноді діаметрально протилежні погляди; при цьому механізм цих порушень за тривалої гіпокінезії залишається мало вивченим.

Тому наше дослідження направлене на вивчення не стільки плазматичних факторів, як на тромбоцитарну ланку гемостазу у поєднанні з вивченням ролі еритроцитів та біохімічних факторів, які впливають на гемостаз за тривалої гіпокінезії та можуть запускати механізм тромбемболічних ускладнень, на які вказують багато авторів (Lieberman et al., 2014).

Порівняно з контрольною групою активність супероксиддисмутази та каталази змінюється залежно від терміну досліду та не залежить від вікової групи. При цьому зростання каталазної активності відбувається на фоні вірогідного зниження активності супероксиддисмутази. Перехресна активність цих ферментів пояснюється певною особливістю антиоксидантної системи захисту еритроцитів, в якій для каталази супероксидний аніон-радикал – негативний ефектор, а перекисні сполуки – позитивний, тоді як для супероксиддисмутази – навпаки. Згідно з даними Stogov (2009), така різнонаправлена зміна їх активності характерна для гіпоксії.

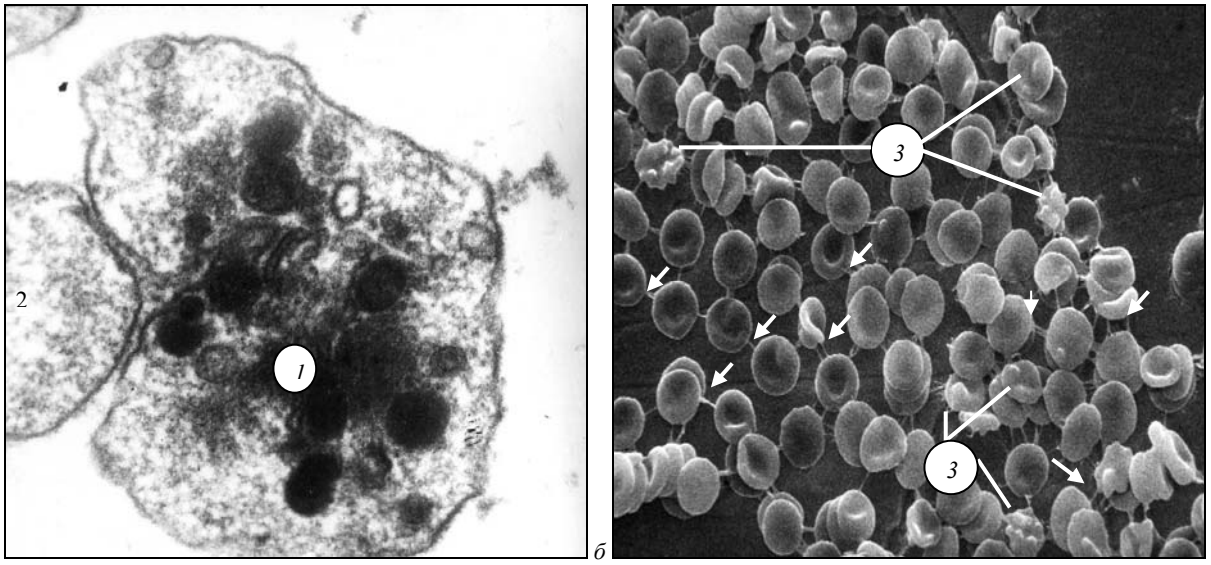


Рис. 8. Ультраструктура тромбоцитів (*а*) та еритроцитів (*б*) периферичної крові щурів III групи через 90 діб після початку моделювання тривалої гіпокінезії: *1* – активований тромбоцит, *2* – «тінь тромбоцита», *3* – дегенеративні форми еритроцитів; стрілками показано «нитки адгезії»; *а* – трансмісійна електронна мікроскопія, *б* – скануюча електронна мікроскопія; *а* – ^{x}15 000, *б* – ^{x}2 000

Таблиця 3

Морфометричні показники клітинних елементів крові у щурів III вікової групи за тривалої гіпокінезії порівняно з контрольною групою тварин, x ± SE

Параметри	Контрольна група	Експериментальна група: Термін експерименту, діб		
		90	180	240
Тромбоцити				
Неактивні тромбоцити, %	74,93 ± 8,25	39,86 ± 4,42*	33,41 ± 4,55*	30,11 ± 3,17*
Агреговані тромбоцити, %	6,38 ± 0,54	14,02 ± 2,56*	19,53 ± 2,27*	24,33 ± 1,75*
Активні тромбоцити, %	16,97 ± 2,53	39,71 ± 3,79*	50,28 ± 4,44*	54,51 ± 4,39*
Активовані тромбоцити, %	24,56 ± 1,64	55,36 ± 4,82*	60,22 ± 6,84*	63,67 ± 5,17*
Біполярні тромбоцити, %	0,51 ± 0,01	0,83 ± 0,05	0,93 ± 0,07	1,05 ± 0,17*
Дегранульовані тромбоцити, %	6,25 ± 0,91	17,97 ± 2,31*	19,58 ± 2,22*	26,15 ± 2,33*
Дрібні тромбоцитарні агрегати	3,54 ± 0,52	7,19 ± 1,53*	12,73 ± 1,65*	14,76 ± 1,84*
Великі тромбоцитарні агрегати	1,09 ± 0,03	1,22 ± 0,14	2,74 ± 0,18*	4,81 ± 0,33*
Альфа-гранули, мкм^3/мкм^3	0,107 ± 0,011	0,069±0,007*	0,063±0,005*	0,051 ± 0,003*
Дельта-гранули, мкм^3/мкм^3	0,036 ± 0,002	0,028 ± 0,006	0,026 ± 0,004	0,022 ± 0,002*
Лізосоми, мкм$^{-2}$	0,141 ± 0,017	0,111 ± 0,003	0,108 ± 0,031	0,091 ± 0,011*
Мітохондрії, мкм^3/мкм^3	0,023 ± 0,005	0,016 ± 0,007	0,011±0,003*	0,010 ± 0,002*
Еритроцити				
Дискоцити, %	83,47 ± 4,11	60,32 ± 4,06*	65,14 ± 6,62*	62,37 ± 2,25*
Дискоехіноцити, %	12,02 ± 1,52	26,17 ± 3,33*	30,15 ± 2,41*	31,42 ± 2,66
Сфероцити, %	3,03 ± 0,17	6,88 ± 1,14*	9,23 ± 1,77*	11,11 ± 2,03*
Сфероехіноцити, %	1,93 ± 0,35	3,15 ± 0,73*	3,79 ± 0,81*	4,02 ± 0,84*
Зворотно змінені еритроцити, %	10,02 ± 1,34	15,61 ± 1,73	17,93 ± 1,85*	18,81 ± 2,73*
Незворотно змінені еритроцити, %	3,01 ± 0,15	3,73 ± 0,21	4,67 ± 0,23*	5,24 ± 0,32*

Примітка: * – вірогідна різниця з контрольними показниками ($p < 0,05$).

Про роль гіпоксії у розвитку структурних змін у різні терміни гіпокінезії вказують тільки окремі автори (Makáry et al., 1987), а результати цих досліджень фрагментарні, вимагають поглибленого розгляду та узагальнення.

Проведений нами статистичний аналіз вказує на існування вірогідної негативної кореляції між активністю супероксиддисмутази та каталази еритроцитів у тварин усіх вікових підгруп, тоді як у контрольних тварин зафіксовано високу ($r = 0,86$) позитивну кореляцію між активністю цих ферментів. На наш погляд, це може підтвердити думку окремих авторів, які додатковим джерелом молекулярного кисню за гіпоксії вважають процес відновлення перекису водню, що розцінюється як компенсаторно-пристосувальна реакція цілісного організму на гіпоксію та гіпокінезію (Makáry et al., 1987). Оскільки каталаза компенсаторно підвищує коефіцієнт утилізації кисню, то для енергетичної доцільності зменшення концентрації супероксиддисмутази необхідне для часткового повернення в метаболічні реакції того молекулярного кисню, який відновлюється в організмі за одноелектронним шляхом, по-

силюючи при цьому процеси окисного фосфорилювання. Багато авторів (Zorbas et al., 2012) одностайні щодо важливої ролі процесів перекисного окиснення в загальній патогенетичній схемі розвитку гіпокінетичної хвороби. Відомості про зв'язок перекисного окиснення ліпідів із гемостазом (Krause, 2016) і прооксидантні властивості фізичного навантаження (Lutfi, 2016) дозволяють говорити про значну роль депривації фізичного навантаження за тривалої гіпокінезії в розвитку гіперкоагулемії. На думку Tseilikman et al. (2013), вона викликається накопиченням статевих стероїдів (естрогенів) на фоні зменшення концентрації андрогенів, що закономірно спостерігається за тривалої гіпокінезії (Stogov, 2009). Це дозволяє обгрунтувати перспетиви подальших досліджень характеру впливу гіпокінезії на еритроцитарно-тромбоцитарний та біохімічний компоненти гемостазу, фібриноліз, реакцію безперервного внутрішньосудинного згортання крові та оцінити можливість корекції гемостатичних зрушень фізичним навантаженням у перспективі подальших досліджень. Установлені нами підвищення концентрації продуктів перекисного окиснення ліпідів та окисної модифікації білків узгоджуються з даними наукової літератури (Neelamegham, 2012; Juravlyova et al., 2016; Krause, 2016) і свідчать про їх вплив на структурну перебудову клітинного компонента системи гемостазу. При цьому зміна біохімічного складу крові за рахунок підвищення рівня креатиніну свідчить про посилений розпад м'язової тканини в умовах тривалої гіпокінезії (Stogov, 2009) і тісно корелює зі змінами еритроцитарно-тромбоцитарного гемостазу.

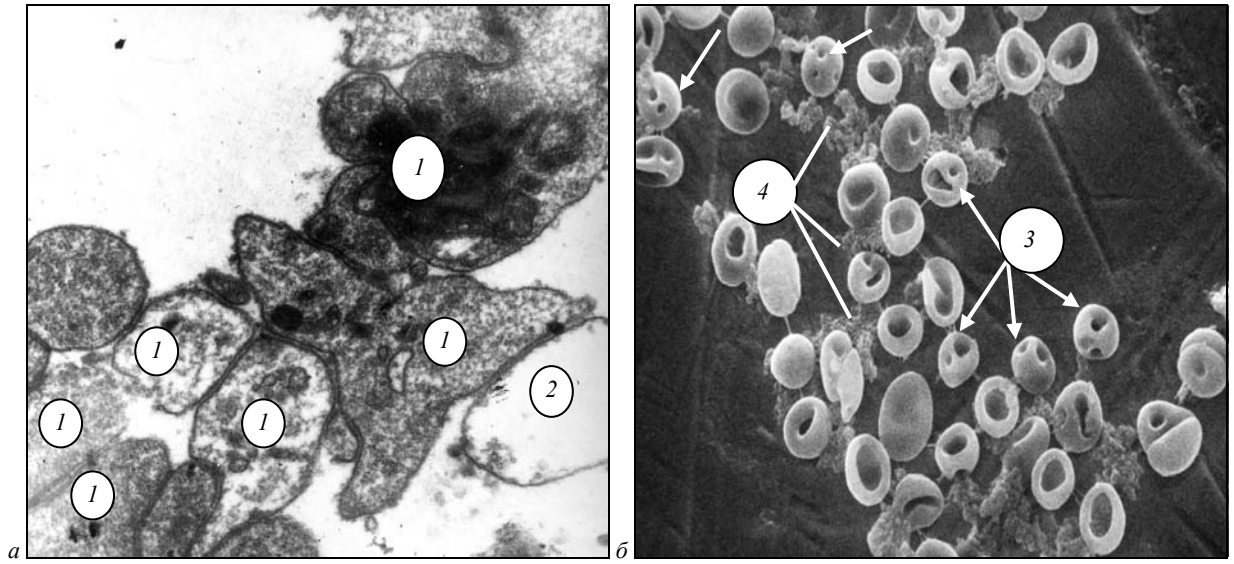


Рис. 9. Ультраструктура тромбоцитів (*а*) та еритроцитів (*б*) периферичної крові щурів III групи через 180 діб із початку моделювання тривалої гіпокінезії: *1* – активований тромбоцит, *2* – «тінь тромбоцита», *3* – дегенеративні форми еритроцитів, *4* – фібрин; стрілками показано «дірчасті» еритроцити; *а* – трансмісійна електронна мікроскопія, *б* – сканувальна електронна мікроскопія; *а* – ˣ15 000, *б* – ˣ2 000

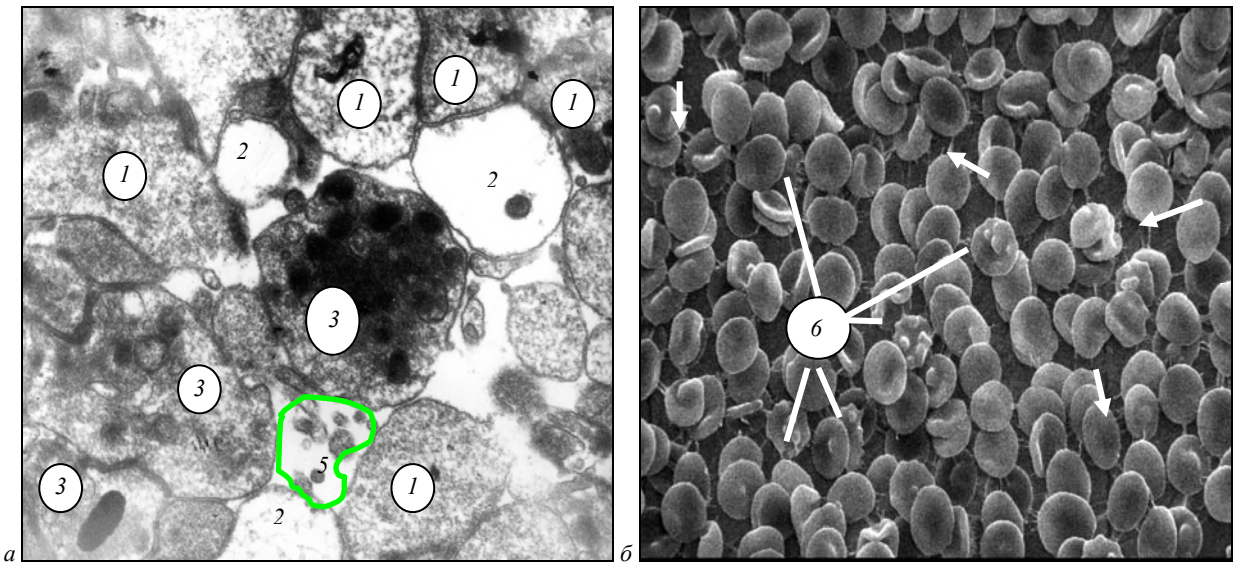


Рис. 10. Ультраструктура тромбоцитів (*а*) та еритроцитів (*б*) периферичної крові щурів III групи через 240 діб від початку моделювання тривалої гіпокінезії: *1* – активований тромбоцит, *2* – «тінь тромбоцита», *3* – тромбоцити у стадії зворотної активації, *4* – неактивний тромбоцит, *5* – секреторні гранули, *6* – дегенеративні форми еритроцитів; стрілками показано «нитки адгезії»; *а* – трансмісійна електронна мікроскопія, *б* – сканувальна електронна мікроскопія; *а* – ˣ15 000, *б* – ˣ2 000

Згідно з нашими даними, за гіпокінезії спостерігається ендотеліальна дисфункція, що є предиктором виникнення багатьох захворювань серцево-судинної системи, а також захворювань інших органів та систем. Тому це може бути причиною багатьох ускладнень за тривалої гіпокінезії (Zorbas et al., 2012). У сучасних дослідженнях вказується на такий механізм розвитку ендотеліальної дисфункції (Gainutdinov et al., 2013): 1) дефіцит оксиду азоту в ендотелії, пов'язаний із підвищенням порушення або зниженням продукції ендотеліального оксиду азоту, 2) порушення структури та функцій ендотеліальної NO-синтетази, 3) зниження чутливості

до NO. У результаті цього порушується метаболізм ендотеліоцитів, з активацією механізмів апоптозу (Leytin, 2012), тому на більшому чи меншому протязі судинної стінки оголяється базальна мембрана. За контакту рецепторів адгезії тромбоцитів із субстратом і дією синтезованого в ділянці пошкодження судинної стінки тромбіну починається активація тромбоцитів (Gainutdinov et al., 2013). Імовірно, основну роль у первинній активації тромбоцитів відіграє сигнал із рецепторів GPIa-IIa, GPIb-V-IX и GPVI, які контактують зі своїми агоністами, у першу чергу з колагеном, фактором Віллебранда та тромбіном (Vitkovsky and Strambovskaya, 2014). Крім колагену, властивістю активувати тромбоцити володіють також інші субендотеліальні структури (Marcus, 2012). На нашу думку, саме ці фактори впливають на конформацію тромбоцитів, оскільки показано, що за тривалої гіпокінезії тромбоцити можуть проходити різні стадії контактної активації, переходячи з неактивної форми у вигляді дискоцита чи пластинки, у зворотну стадію з перетворенням на кулеподібну форму із псевдоподіями та в незворотну стадію адгезії у вигляді розплесканих форм без внутрішньоклітинного вмісту – «тінь тромбоцита» (Michelson, 2013).

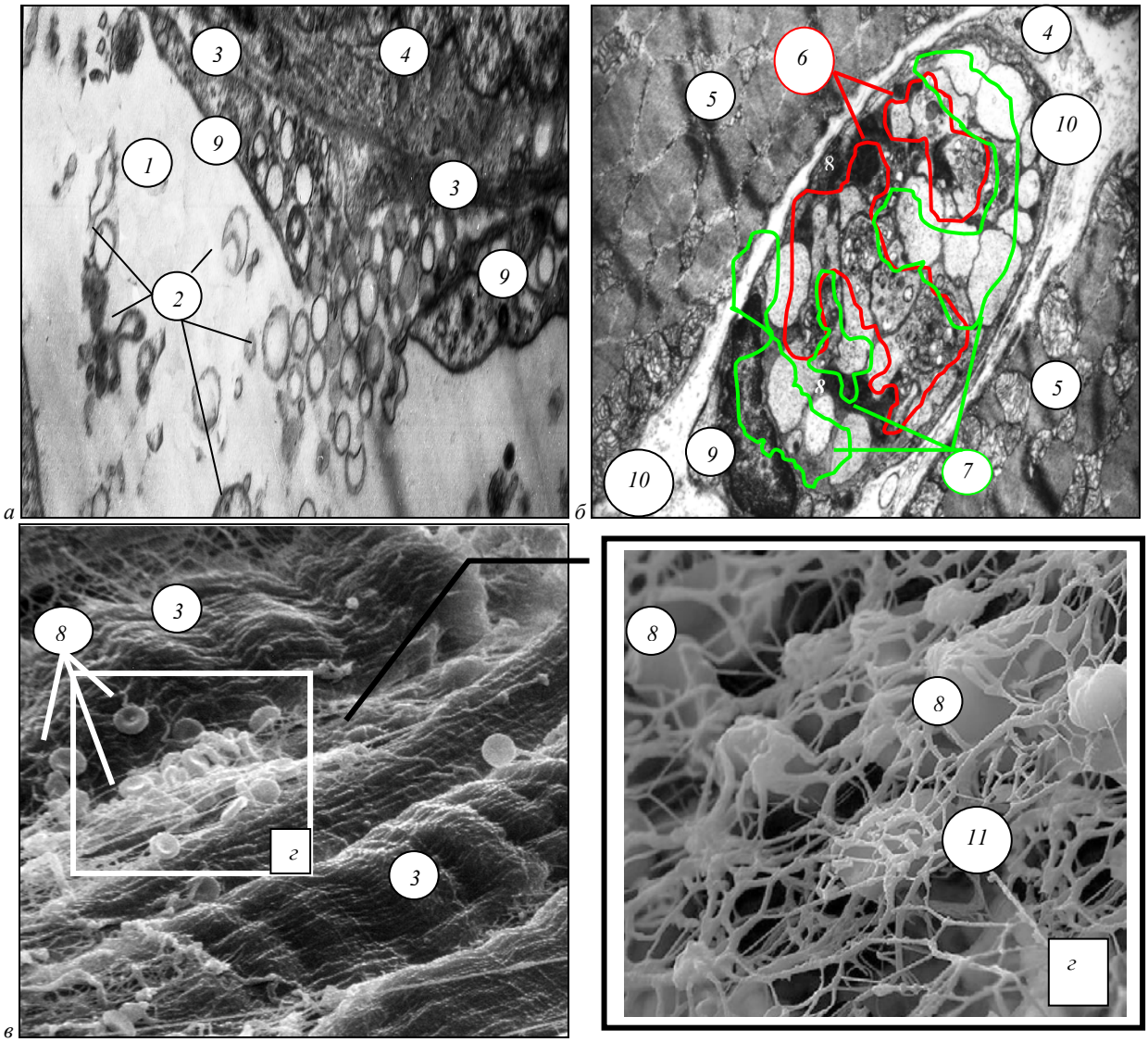


Рис. 11. Ультраструктурна картина апоптозу ендотеліоцита (*а*) та внутрішньосудинного мікротромба в гемокапілярі прямого м'яза стегна (*б*) та в ділянці деендотелізації базальної мембрани (*в*, *г*) у щура III вікової групи через 240 діб із початку моделювання гіпокінезії: *1* – просвіт гемокапіляра, *2* – апоптозні тільця, *3* – базальна мембрана, *4* – перицит, *5* – м'язове волокно, *6* – активовані тромбоцити, *7* – «тіні тромбоцитів», *8* – еритроцит, *9* – ендотеліоцит, *10* – ендомізій, *11* – нитки фібрину; *а*, *б* – трансмісійна електронна мікроскопія, *в*, *г* – сканувальна електронна мікроскопія; *а* – ^{x}15 000, *б* – ^{x}8 000, *в* – ^{x}5 000, *г* – ^{x}10 000

Активація тромбоцитів лежить в основі виконання ними своїх функцій (Peter, 2010; Rao, 2013; Pitchford, 2015). Багато речовин, які входять до списку основних речовин, що активують тромбоцити, можуть синтезуватися за гіпокінезії, особливо тривалої (Stogov, 2009). Майже всі ці речовини взаємодіють із тромбоцитами через специфічні рецептори, описані Lieberman et al. (2014). Незважаючи на різноманіття активаторів і значну кількість рецепторів до них, клітина має обмежену кількість шляхів передачі сигналу та ефекторних механізмів (Vitkovsky and Strambovskaya, 2014). Реакція тромбоцита на активувальний вплив однотипна: спочатку тромбоцит змінює форму, на його поверхні з'являються псевдоподії, він «розплескується» за рахунок відкритої канальцевої системи збільшується площа їх поверхні. Змінюються співвідношення різних фосфоліпідів між зовнішнім і внутрішнім листками клітинної мембрани. Це викликає появу на зовнішній поверхні тромбоцита значної кількості кислих фосфоліпідів із прокоагулянтними властивостями – фактор III тромбоцитів (PF_3). На мембрані тромбоцитів експресуються або підвищують свою афінність інтегрини (Naik et al., 2013; Kasirer-Friede et al., 2014; Zhu et al., 2014). Відбувається секреція вмісту «локусів зберігання» тромбоцитів у зовнішнє середовище (Freedman, 2011). Тромбоцити фіксуються на поверхні (наприклад, на субендотеліальному матриксі) та об'єднуються між собою та ін-

шими клітинами крові, у першу чергу відбувається адгезія та агрегація еритроцитів, що ми виявляли особливо часто у віддалені терміни гіпокінезії.

За даними окремих авторів (Kobro, 2009; Falco et al., 2012), реєстрація агрегатограм за гіпокінезії вказує на те, що в разі стимуляції агрегації адреналіном у дозі 10 мкмоль/л у 83% випадків спостерігається двофазна агрегація тромбоцитів, у 14% – незворотна агрегація та у 3% – після початкової агрегації спостерігається дезагрегація. Активація тромбоцитів може бути зворотною, якщо відбуваються лише часткові конформаційні зміни, нестійке об'єднання з іншими клітинами та часткова секреція гранул. Через невеликий час тромбоцит повертається в інтактний стан і продовжує циркуляцію у загальному потоку крові (Greinacher, 2011).

Після зворотної активації та повернення в неактивний стан тромбоцит знову може активуватися та вступати у взаємодію з іншими клітинами та структурами. Зворотна агрегація виникає за короткочасної дії слабкого за інтенсивністю стимулу. Якщо стимуляція триваліша або сильніша, відбувається незворотна активація тромбоцита (Krause et al., 2016). У цьому випадку тромбоцит міцно фіксується до інших клітин або позаклітинних структур, відбувається повна дегрануляція та секреція вмісту «локусів зберігання». Якщо тромбоцит після незвротної активації надходить у загальний кровообіг, він не може надалі вступати у взаємодію з іншими клітинами та швидко елімінується з кровообігу (Korneychuk et al., 2016). У разі масивного надходження у кровообіг незворотно активованих тромбоцитів відбувається вірогідне зниження агрегації тромбоцитів з усіма індукторами (Leavitt et al., 2007). Мікроскопія в цьому випадку дозволяє виявити велику кількість деформованих тромбоцитів. Стимулятори тромбоцитів можна поділити на слабкі та сильні.

До малоактивних стимуляторів належать АДФ, адреналін, вазопресин, серотонін тощо (Kobro et al., 2009; Bouchard et al., 2012; Arnold et al., 2013; Duan et al., 2014). Передача сигналу від рецепторів цих речовин проходить стадію посилення всередині клітини через додатковий етап утворення продуктів тромбоксанового завершення та секреції активних компонентів, що зберігаються у гранулах (Abrams et al., 2007; Bennett et al., 2014). Під час дослідження агрегації тромбоцитів за присутності слабких стимуляторів на агрегатограмах крива має двоступінчасту форму, що зумовлено посиленням агрегації після видалення вмісту «локусів зберігання» (Blair, 2009).

Сильні стимулятори тромбоцитів – колаген, тромбін, великі дози АДФ – безпосередньо після мембранної стимуляції викликають незворотну активацію (White, 2010; Whiteheart, 2011; Ware, 2012). Частина з найважливіших активаторів тромбоцитів присутня у підпорогових концентраціях в інтактній плазмі та вибірково накопичується в зоні пошкодження судин. Інші з'являються в системі циркуляції під час активації системи згортання крові у фізіологічних або патологічних умовах. Окремі фактори виділяються із самих тромбоцитів: АДФ, серотонін, адреналіноподібні субстанції, чинник Віллебранда (Lazarus, 2010; Hayward, 2011; Lenting and Denis, 2013).

Найважливіші фізіологічні механізми адаптації до гіпокінезії – механізм збудження гіпоталамо-гіпофізарної системи та посилена продукція глюкокортикоїдів і катехоламінів (Tseilikman et al., 2013; Rayes and Watson, 2015; Ruggeri, 2015). Отримані цими авторами результати підтверджують таку модель: протягом перших трьох діб адаптації у плазмі крові щурів рівень кортикостерону та адреналіну підвищується майже утричі, а вміст норадреналіну підвищується у віддалені терміни. Спостерігається вірогідне підвищення концентрації адренокортикотропного гормона через три доби з початку моделювання гіпокінезії. При цьому реалізація такого механізму відбувається за безпосередньої дегрануляції тромбоцитів (Abrams, 2007; Marks, 2012).

Таким чином, морфологічним субстратом пошкодження тромбоцитарно-еритроцитарного гемостазу у щурів різного віку за тривалої гіпокінезії виступає комплекс ультраструктурних змін клітин крові, які виникають через: 1) внутрішньосудинну гіперактивацію тромбоцитів, 2) дисбаланс вмісту всіх типів тромбоцитарних гранул, 3) трансформацію поверхневої цитоархітектоніки еритроцитів з утворенням «ниток адгезії», 4) утворення різних за складом і розміром тромбоцитарних і еритроцитарних агрегатів, 5) біохімічний дисбаланс із поступовим збільшенням концентрації креатиніну та продуктів перекисного окиснення ліпідів у плазмі крові.

Цей комплекс виявляється в усіх без винятку тварин і може враховуватись як ранній предиктор розвитку можливих ускладнень гіпокінетичної хвороби. Найчутливіші кількісні характеристики вказаного комплексу – відносний вміст активованих і агрегованих тромбоцитів, щільність упаковки альфа- та дельта-гранул, рівень зворотно трансформованих еритроцитів, кількість тромбоцитарних агрегатів і «ниток агрегації» між окремими еритроцитами.

Висновки

У двомісячних тварин відбувається вірогідне збільшення відносного вмісту активованих тромбоцитів зі збереженням нормального вмісту агрегованих і дегранульованих форм і появою поодиноких тромбоцитів із дисбалансом альфа- та дельта-гранул.

У 12-місячних тварин порушення тромбоцитарного гемостазу полягають у вірогідному збільшенні відносного вмісту активованих тромбоцитів із підвищенням вмісту агрегованих і дегранульованих форм і появою численних тромбоцитів із дисбалансом альфа- та дельта-гранул, а також редукцією мітохондрій.

У 24-місячних тварин спостерігається різке порушення тромбоцитарного гемостазу за рахунок вірогідного наростання вмісту активованих, дегранульованих і агрегованих тромбоцитів, вивільнення вмісту більшості гранул, розвитку внутрішньосудинної гіперактивації тромбоцитів, збільшення кількості зворотно та незворотно трансформованих еритроцитів, підвищення рівня агрегації, зокрема появи складних клітинних агрегатів та химерних форм еритроцитів.

Незалежно від віку тварин ступінь порушення тромбоцитарно-еритроцитарного гемостазу підвищується у міру зростання терміну гіпокінезії, а також пов'язаний із підвищенням рівня креатиніну сироватки крові.

References

Abrams, C. S. (2007). The yin-yang of platelet granules. Blood, 111(3), 979–979.

Arnold, D. M. (2013). A platelet cover-up. Blood, 122(3), 307–309.

Ali, S. F. (2015) Influence of different methods preparation on platelet activation in stored platelet concentrates. Journal of Blood Disorders and Transfusion, 6(3), 279–285.

Bennett, S. T. (2014). Validation of hemostasis assays, analyzers, and reagents. In: Laboratory Hemostasis. Springer, New York.

Blair, P. (2009). Platelet α-granules: Basic biology and clinical correlates. Blood Reviews, 23(4), 177–189.

Bouchard, B. A., Krudysz-Amblo, J. & Butenas, S. (2012). Platelet tissue factor is not expressed transiently after platelet activation. Blood, 119(18), 4338–4339.

Delano, M. J., Rizoli, S. B., Rhind, S. G., Cuschieri, J., Junger, W., Baker, A. J., Dubick, M. A., Hoyt, D. B., & Bulger, E. M. (2015). Prehospital resuscitation of traumatic hemorrhagic shock with hypertonic solutions worsens hypocoagulation and hyperfibrinolysis. Shock, 44(1), 25–31.

Duan, K., Yu, W., Lin, Z., Tan, S., Bai, X., Xu, L., Dong, Y., & Li, N. (2014). A time course study of acute traumatic coagulopathy prior-resuscitation: From hypercoagulation-hypocoagulation caused by hypoperfusion? Transfusion and Apheresis Science, 50(3), 399–406.

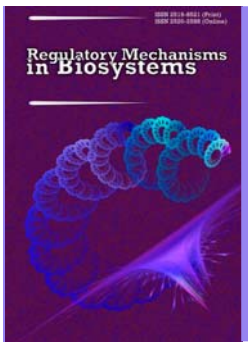
Falco, S., Bruno, B., Maurella, C., Bellino, C., D'Angelo, A., Gianella, P., Tarducci, A., Zanatta, R., & Borrelli, A. (2012). *In vitro* evaluation of canine hemostasis following dilution with hydroxyethyl starch (130/0.4) via thromboelastometry. Journal of Veterinary Emergency and Critical Care, 22(6), 640–645.

Falet, H. (2012). Platelet size: Finding the right balance. Blood, 119(12), 2402–2403.

Freedman, J. E. (2011). A platelet transcriptome revolution. Blood, 118(14), 3760–3761.

Gainutdinov, K. L., Andrianov, V. V., Iyudin, V. S., Yurtaeva, S. V., Jafarova, G. G., Faisullina, R. I., & Sitdikov, F. G. (2013). EPR study of

nitric oxide production in rat tissues under hypokinesia. Biophysics, 58(2), 203–205.
Gainutdinov, K. L., Faisullina, R. I., Andrianov, V. V., Gilmutdinova, R. I., Iyudin, V. S., Jafarova, G. G., & Sitdikov, F. G. (2013). Nitric oxide level in the rat tissues increases after 30-day hypokinesia: Studies by electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy. Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 154(5), 635–637.
Greinacher, A. (2011). Platelet activation by heparin. Blood, 117(18), 4686–4687.
Hayward, C. P. M. (2011). Diagnostic evaluation of platelet function disorders. Blood Reviews, 25(4), 169–173.
Huang, Y., Joshi, S., Xiang, B., Kanaho, Y., Li, Z., Bouchard, B. A., Moncman, C. L., & Whiteheart, S. W. (2016). Arf6 controls platelet spreading and clot retraction via integrin Iib 3 trafficking. Blood, 127(11), 1459–1467.
Jaeger, D. & Jung, R. (2015). Hypokinesia model. In: Encyclopedia of computational neuroscience, 1417–1417. Springer, New York.
Juravlyova, O. A., Markin, A. A., Kuzichkin, D. S., Loginov, V. I., Zabolotskaya, I. V., & Vostrikova, L. V. (2016). Dynamics of oxidation stress markers during long-term antiorthostatic hypokinesia: A retrospective study. Human Physiology, 42(1), 79–83.
Kasirer-Friede, A., Kang, J., Kahner, B., Ye, F., Ginsberg, M. H., & Shattil, S. J. (2014). ADAP interactions with talin and kindlin promote platelet integrin IIb 3 activation and stable fibrinogen binding. Blood, 123(20), 3156–3165.
Kitchen, S., & Makris, M. (2010). Laboratory tests of hemostasis. In: Practical hemostasis and thrombosis. Blackwell Publishing Ltd.
Kobro, M. (2009). Investigations of adrenalin concentration blood. Acta Medica Scandinavica, 125(1), 1–7.
Korneychuk, S., Turner, S., Abakumov, A., & Verbeeck, J. (2016). Determination of the platelet structure in natural diamond by ADF-STEM. European Microscopy Congress, Proceedings, 331–332.
Krause, D. S. (2016). An oxidase road-platelet adhesion. Blood, 127(11), 1386–1386.
Lazarus, A. H. (2010). IVIg conducts DC-platelet nuptials. Blood, 116(23), 4740–4741.
Leavitt, A. D. (2007). What for platelet factor 4? Blood, 110(4), 1090–1090.
Lenting, P. J. & Denis, C. V. (2013). Platelet von Willebrand factor: Sweet resistance. Blood, 122(25), 4006–4007.
Leytin, V. (2012). Apoptosis in the anucleate platelet. Blood Reviews, 26(2), 51–63.
Lieberman, L., Bercovitz, R. S., Sholapur, N. S., Heddle, N. M., Stanworth, S. J., & Arnold, D. M. (2014). Platelet transfusions for critically all patients with thrombocytopenia. Blood, 123(8), 1146–1151.
Lutfi, M. F. (2016). Diagnostic accuracy of resting left ventricular akinesia/ hypokinesia in predicting abnormal coronary angiography. BMC Cardiovascular Disorders, 16(1), 137–140.
Makáry, A., Pataki, M., Tóth, E., & Lusztig, G. (1987). The effect of hypoxia and hypokinesia on prostacyclin (PGI2) production of vessel wall. Experimental pathology, 32(4), 251–253.
Marcus, A. J. (2012). New approaches for measurement of platelet reactivity. Blood, 119(15), 3378–3379.
Marks, M. S. (2012). SNA Ring platelet granule secretion. Blood, 120(12), 2355–2357.
Michelson, A. D. (2013). Gray platelet syndrome. Blood, 121(2), 250–250.
Mio, K., Sato, M., & Sato, C. (2016). Structural biology and electron microscopy. Springer Protocols Handbooks.
Naik, M. U., Caplan, J. L., & Naik, U. P. (2013). Junctional adhesion molecule-A suppresses platelet integrin IIb 3 signaling by recruiting Csk the integrin-c-Src complex. Blood, 123(9), 1393–1402.
Neelamegham, S. (2012). The computing platelet: Integrating environmental cues. Blood, 120(1), 3–4.
Peter, K. (2010). Proteomics unravels platelet function. Blood, 115(20), 4008–4009.
Pitchford, S. C. (2015). The stop clock of platelet activation. Blood, 126(24), 2538–2539.
Rao, A. K. (2013). Spotlight on FLI1, RUNX1, and platelet dysfunction. Blood, 122(25), 4004–4006.
Rayes, J., & Watson, S. P. (2015). Platelet GPVI repairs its own damage. Blood, 126(8), 933–934.
Ruggeri, Z. M. (2015). Platelet GPIb: Sensing force and responding. Blood, 125(3), 423–424.
Stogov, M. V. (2009). Creatine metabolism in skeletal muscles during hypokinesia. Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 148(1), 26–28.
Tseilikman, V. E., Pankov, N. E., Pankova, N. A., Filimonova, T. A., Sinitskii, A. I., Kozochkin, D. A., & Tseilikman, O. B. (2013). Correlation between circulating corticosterone and protein carbonylation in the liver after short-term hypokinesia. Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 156(2), 188–190.
Vitkovsky, Y., & Strambovskaya, N. (2014). Platelet functions in healthy persons with genetic polymorphism of GPIA(C807T), GPIIIA(T1565C), GPIBA(C434T), P2RY12(H1/H2), SELP(G1087A) platelet receptors. Thrombosis Research, 133, 83.
Ware, J. (2012). Fragmenting the platelet-reduce metastasis. Blood, 120(14), 2779–2780.
White, J. G. (2010). Platelet interior imaging technologies. Blood, 116(26), 6150–6151.
Whiteheart, S. W. (2011). Platelet granules: Surprise packages. Blood, 118(5), 1190–1191.
Zhu, J., Zhu, J., Bougie, D. W., Aster, R. H., & Springer, T. A. (2015). Structural basis for quinine-dependent antibody binding-platelet integrin IIb 3. Blood, 126(18), 2138–2145.
Zorbas, Y. G., Deogenov, V. A., Merkov, P. L., & Federenko, Y. F. (2012). Chronic periodic fluid redistribution effect on muscle calcium in healthy subjects during prolonged hypokinesia. The Journal of Physiological Sciences, 62(3), 233–239.



Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(2), 147–151
doi: 10.15421/021723

Hyperhomocysteinemia in patients with chronic kidney disease and its relationship with the functional status of the cardiovascular system

K. P. Postovitenko*, I. A. Iliuk*, S. V. Shevchuk*, G. V. Bezsmertna**, I. O. Bezsmertnyi**, I. V. Kurylenko**

**National Pirogov Memorial Medical University, Vinnytsia, Ukraine*
***Scientific and Research Institute of Invalid Rehabilitation (Educational Scientific Treatment Complex) of National Pirogov Memorial Medical University, Vinnytsia, Ukraine*

Article info

Received 28.03.2017
Received in revised form 22.04.2017
Accepted 27.04.2017

National Pirogov Memorial Medical University, Vinnytsia, Pirogov Str., 56, Vinnytsia, 21018, Ukraine.
Tel.: +38-043-235-05-63.
E-mail: admission@vnmu.edu.ua

Scientific and Research Institute of Invalid Rehabilitation (Educational Scientific Treatment Complex) of National Pirogov Memorial Medical University, Khmelnytske Shoes Str., 104, Vinnytsia, 21029, Ukraine.
Tel.: +38-043-243-80-45.
E-mail: ins_reab_inv@mail.ru

Postovitenko, K. P., Iliuk, I. A., Shevchuk, S. V., Bezsmertna, G. V., Bezsmertnyi, I. O., & Kurylenko, I. V. (2017). Hyperhomocysteinemia in patients with chronic kidney disease and its relationship with the functional status of the cardiovascular system. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(2), 147–151. doi:10.15421/021723

Chronic kidney disease (CKD) is an important medical, social and economic problem nowadays. Patients with CKD are known to have an increased risk of development and progression of cardiovascular diseases. However, the causes and pathogenesis of cardiovascular complications are not well understood. One of the recently recognized "non-traditional" risk factors for the increased development of cardiovascular pathology in severe stages of CKD is hyperhomocysteinemia (HHC). The article presents the results of study of HHC frequency in patients with different stages of CKD as well as the relationship between HHC and endothelial dysfunction and structural-functional status of the heart. The study involved 148 persons with different stages of CKD who underwent immunoenzyme determination of total plasma homocysteine (HC), echocardiography, carotid ultrasonograghy, endothelial function was assessed as well. It was found that among the patients with CKD, 26 (21.1%) had normal and 34 (27.7%) had subnormal HC levels, mild HHC was observed in 30 (24.4%) and moderate HHC – in 33 (26.8%) cases, i.e. the total number of patients with elevated HC level was 88.9%. It should be noted that no patients with normal HC level were found among those with stage four CKD as well as in dialysis patients. The increase of blood plasma HC level was actually proportional to the severity of renal failure, which in its turn led to the shift in the number of cases towards higher rank indices of HHC level. In particular, while there were no patients with HHC among those with CKD-I, more than 50% of such patients were found in the group with CKD-V. Reduced myocardial contractility and echocardiographic markers of left ventricular hypertrophy in patients with CKD were found to be closely associated with HC concentrations in blood plasma. The data presented clearly demonstrate strong inverse correlation between endothelial dysfunction indices and HC level. So, the endothelium-dependent brachial artery vasodilation in patients with CKD-IV was lower by 3.8 and 1.5 times compared with control group and CKD-III group, respectively, and endothelium-independent vasodilation of the brachial artery – by 2.4 and 1.9 times, respectively. Correlation analysis also confirmed that impaired endothelium-dependent and endothelium-independent dilation with high statistical significance inversely correlated with the level of HC in blood plasma. Thus, the population of patients with CKD is characterized by high HHC frequency, which is closely associated with cardiovascular disorders (endothelial dysfunction, structural and functional remodelling of the myocardium) and can be an important risk factor for the development of vascular lesions. We believe that adequate correction of HHC, including administration of folic acid preparations could reduce the progression of vascular lesions in patients with CKD.

Keywords: homocysteine; renal failure; left ventricular hypertrophy; myocardial contractile function; endothelial dysfunction

Introduction

Nowadays chronic kidney disease (CKD) is a significant medical, social and economic problem. Despite current approaches to treatment, the number of patients with severe CKD continues to rise both in Ukraine and worldwide (Kolesnyk et al., 2016). Such renal pathology dramatically increases the risk and progression of cardiovascular diseases. In particular, the presence of renal dysfunction is a strong independent risk factor for cardiovascular complications (Matsushita et al., 2010; Yildiz et al., 2013; Pang et al., 2016). About 60% of patients with end-stage renal disease die within one year of acute myocardial infarction (Amin et al., 2010; Fromot et al., 2016) and the risk of further cardiovascular complications is directly proportional to the progression of renal dysfunction (Mazur et al., 2012; Dayal et al., 2014; Lai et al., 2015; Xie et al., 2015). In spite of inevitable risks, the causes and pathogenesis of cardiovascular complications are not fully understood. One of the recently recognized "non-traditional" risk factors of anincreased development of cardiovascular diseases in severe CKD stagesis is hyperhomocysteinemia (HHC) (Chuang et al., 2013; Qin et al., 2013; Baszczuk et al., 2014; Levi et al., 2014). Although many investigations have been devoted to the problem of HHC in CKD (Kolarz et al., 2012; Kolarz et al., 2013; Neigwekar et al., 2015; Zhang et al., 2015; Hang et al., 2016; Toda and Okamura, 2016; Heilman et al., 2017), a number of questions remain insufficiently clarified. Frequency of HHC depending on CKD stageis still unknown. It hasn't been found yet to what extent HHC is associated with other laboratory manifestations of renal failurein patients with CKD, and how it correlates with cardiovascular system status, including endothelial dysfunction.

In view of this, the aim of the study was to evaluate HHCfrequency in patients with various degrees of CKD and to study its association with endothelial dysfunction and structural-functional status of the heart.

Materials and methods

The observations presented in the work were conducted at Vinnytsia Regional Pirogov Memorial Clinical Hospital, the clinical basis of National Pirogov Memorial Medical University. 148 in-patients and/or outpatients with CKD were examined. All patients gave an informed consent to participate in the study. Chronic glomerulonephritis was diagnosed in 99 (66.9%) and chronic pyelonephritis – in 49 patients (33.1%). There were 77 (52.0%) females and 71 (48.0%) males. All patients were divided into two groups: the first one included 113 patients in whom underlying disease was accompanied by decreased glomerular filtration rate (GFR), and the second group consisted of 35 patients with no GFR impairment (CKD-I). In the group of patients with impaired GFR the following stages of CKD were diagnosed: stage II – in 3, stage III – in 43, stageIV – in 14, stage V (terminal) – in 25 patients. The ages of patients in the group with decreased GFR ranged from 18 to 60 years, the average age being 39.6 ± 1.13 years. The average age of patients was: 40.3 ± 2.33 years in CKD-II group, 45.4 ± 2.0 years in CKD-III group, 45.5 ± 3.38 years in CKD-IV group and 37.8 ± 2.53 yearsin CKD-V group. The average age of patients in CKD-I group was 36.9 ± 2.4 years. 30 apparently healthy individuals (14 men and 16 women) aged 21–57 years (average age 40.6 ± 2.38 years) served as representative control group. The stage of CKD was determined according to the classification adopted by the Second Ukrainian Congress of Nephrologists (2005). Total blood plasma HC level was determined by immunoenzyme method using "Axis-Shield" set (UK) on immunoenzyme analyzer "Santinaile". All subjects underwent echocardiography (EchoCG) studies to determine the carotid intima-media complex (IMC) on ultrasound system "Acuson 128 XP/10" (Japan) with 7.5 MHz linear transducer with phase array according to recommendations of the American Echocardiographic Society. Endothelial dysfunction was determined by D. Celermajer's method, described in 1986. The study was carried out in compliance with the provisions of the Council of Europe Convention on Human Rights and Biomedicine, Declaration of Helsinki and recommendations of the Committee on Bioethics of the Presidium of National Academy of Medical Sciences of Ukraine. Statistical analysis of the obtained data was performed with application package Statistica v6.0 (StatSoft Inc., USA). Nonparametric Mann-Whitney U-test was used to assess the difference between groups, Pearson correlation analysis – to determine the relationships between the indices, Fisher's test – to compare the frequency of changes. $P < 0.05$ was considered to be significant difference.

Results

General information as to HC level in the studied individuals and ranking by HC concentration indices, carried out according to the recommendations of Jacobcen (1998) are given in Table 1. HC concentration below 10 mcmol/l was considered normal and 10–15 mcmol/l – high normal (subnormal). Mild, moderate and severe HHC was diagnosed at HC levels 15–25, 25–50 and above 50 mcmol/l, respectively.

Table 1

Total blood plasma homocysteine levelin patients with different stages of CKD (M ± m) and healthy individuals. Ranking of HCconcentrations

Group No	Examined individuals	Homocysteine level, mcmol/l	Homocysteine level ranking, number of patients (%)			
			normal level <10.0, mcmol/l	subnormal level 10–15, mcmol/l	homocysteine	
					mild 15–25, mcmol/l	moderate and severe > 25 mcmol/l
1	practically healthy, n = 30	9.4 ± 0.57	24 (80.0%)	4 (13.3 %)	2 (6.7%)	0
2	CKD – I, n = 35	10.7 ± 0.72	17 (48.6%)*	10 (28.6%)*	8 (22.8%)*	0
3	CKD – II, n = 31	15.4 ± 1.45*#	6 (19.4%)*#	16 (51.6%)*#	5 (16.1%)*	4 (12.9%)
4	CKD – III, n = 43	21.9 ± 0.43*#$	3 (7.0%)*#	6 (14.0%)#$	14 (32.5%)*#$	20 (46.5%)$
5	CKD – IV, n = 14	26.7 ± 2.10*#$	0	2 (14.3%)#$	3 (21.4%)$^	9 (64.3%)$

Notes: * – significanceof differences with the group of healthy individuals; # – significance of differences with the group of patients with CKD-I; $ – significance of differences with the group of patients with CKD-II; ^ – significance of differences with the group of patients with CKD-III. The mark is indicated only in case of significant differences ($P < 0.05$).

Severe HHC was not detected in any of the studied patients. Similarly no cases of normal HC level were observed in patients with stage four CKD, i.e. elevated HC levels were detected in 100% of patients in this group. It should be noted that even among apparently healthy control individuals 6 out of 30 persons (20%) had elevated HC levels, mild HHC being determined in 2 cases. Increase of blood plasma HC levels was virtually proportional to the severity of CKD, which led to the shift in the number of HHC cases towards higher HC concentrations. Among all patients (123 person) normal and subnormal HC levelwas determined in 26 (21.1%) and 34 (27.7%) cases, respectively; mild and moderate HHC was found in 30 (24.4%) and 33 (26, 8%) cases, respectively.

Baseline values of HC level in dialysis patients, the control group and the patients with no GFR impairment are given in Table 2.

The analysis of received data revealed the total HClevel in patients with terminal CKD to be almost 3 times as higher than in the group of apparently healthy individuals and 2.5 times higher than in the patients without signs of renal failure. At the same time, there was onlyone person among the dialysis patients with subnormal HC level. No cases of moderate and severe HHC were found in the control group and in the patients with CKD-I, whereas there were 13 (52%) such cases among the dialysis patients. In the next phase of our study we evaluated the structural and functional status of the heart in patients with different CKD stages (Table 3). It was found that in CKD there were changes in a number of echocardiographic indices, whereas the patients without impaired renal functioneither had unchanged indices when compared with healthy people or the changes were insignificant. The increase of CKD stage was followed by the progression of changes in heart ultrasound indices.

During the the next phase of the study the correlation of structural and functional heart status with serum HC level was evaluated (Table 4).

Elevated HC levelwas proved to be associated with lower ejection fraction. In the patients with CKD and subnormal HC level ejection fraction was by 8.2% lower and continued to decrease with the increase of HC level – by 14.9% and 17.8%. Paired correlation analysis showed strong correlation of EF value and blood HC concentration: correlation coefficient for these indices was negative ($r = –0.5$). Although no changes of LVPWTd and IVSTd indices insubnormal HC levels were seen, later they increased significantly with the increase of blood HC levels, confirmed by close significant correlative relationships between the markers of left ventricular hypertrophy and HC level ($r = 0.57$ and 0.59, respectively). The changes in LVMMI were evident even in subnormal HC level (by 23.3%), and they continued to increase proportionally to the increase of HC concentration to 64.1% in patients with mild HHC

and 96.1% in those with moderate HHC as compared to people swith normal HC level. There were significant differences in LVMMI value not only in the subjects with normal HC level, but also among those who had HHC of various degrees (in all cases $P < 0.05$ with paired correlation coefficient 0.58). The endothelial function of the patients with different CKD stages (II–V) was determined in the study as well. Functional status of the endothelium was identified in 109 persons, including 20 apparently healthy individuals, 18 patients without signs of renal failure and 71 patients with CKD. The data obtained are presented in Table 5.

Table 2

Total blood plasma homocysteine level in dialysis patients, control group and patients with no GFR impairment(M ± m)

Examined persons	Homocysteine level, mmol/l	Homocysteine level ranking, number of patients, %			
		normal level <10.0 mcmol/l	subnormal level 10-15 mcmol/l	homocysteine mild 15–25 mcmol/l	moderateand severe >25 mcmol/l
Apparently healthy, n = 30	9.4 ± 0.57	24 (80.0%)	4 (13.3%)	2 (6.7 %)	0
CKD – I, n = 35	10.7 ± 0.72	17 (48.6%)*	10 (28.6%)*	8 (22.8%)*	0
CKD – V, n = 25	27.3 ± 1.83*#	0	1 (4.0%)#	11 (44.0%)*	13 (52.0%)

Notes: * – significance of differences with the group of healthy individuals; # – significance of differences with the group of patients with CKD – I. The mark is indicated only in case of significant differences ($P < 0.05$).

Table 3

Echocardiography indices in the group of apparently healthy individuals and in the patients with different stages of CKD (M ± m)

Indices	Groups				
	healthy persons, n = 20	CKD–I, n = 18	CKD–II, n = 25	CKD–III, n = 32	CKD–IV, n = 14
Homocysteine, mcmol/l	9.8 ± 0.77	10.0 ± 0.99	15.8 ± 1.72*#	21.9 ± 1.23*#$	26.8 ± 2.10*#$
EDS, mm	47.7 ± 0.70	47.8 ± 0.70	49.4 ± 0.60	50.9 ± 0.70*#	53.8 ± 2.10*#
ESS, mm	32.2 ± 1.12	32.4 ± 1.03	34.9 ± 1.73	38.6 ± 0.77*#	40.5 ± 2.34*#$
LVPWTd, mm	9.1 ± 0.20	9.3 ± 0.30	10.4 ± 0.40	12.4 ± 0.50*#$	13.5 ± 0.67*#$
IVSTd, mm	9.1 ± 0.30	9.0 ± 0.35	10.1 ± 0.40	12.2 ± 0.48*#$	13.3 ± 0.70*#$
LVMM, g	174 ± 9	176 ± 10	220 ± 14*#	312 ± 22*#$	394 ± 46*#$
EDV, ml	103 ± 4	105 ± 4	129 ± 3*#	136 ± 4*#	164 ± 20*#
ESV, ml	35.2 ± 2.12	35.6 ± 2.01	52.5 ± 2.47*#	60.2 ± 3.66*#	87.4 ± 16.70*#
LVMMI, g/cm^2	101 ± 5	102 ± 6	128 ± 8*#	180 ± 13*#$	229 ± 25*#$
EF, %	66.4 ± 1.10	66.2 ± 1.18	59.2 ± 1.48	56.8 ± 1.79*#	49.2 ± 2.82*#$^
RWT, mm	0.38 ± 0.01	0.38 ± 0.01	0.41 ± 0.01	0.48 ± 0.02*#$	0.50 ± 0.02*#$
SV, ml	68.2 ± 2.24	69.3 ± 3.01	76.3 ± 2.00	76.2 ± 1.82	78.0 ± 4.46

Notes: EDS – end-diastolic size; ESS – end-systolic size; LVPWTd – Left ventricular posterior wall thickness in diastole; IVSTd – interventricular septum thickness in diastole; LVMM – left ventricular muscle mass; EDV – end diastolic volume; ESV – end systolic volume; LVMMI – left ventricular muscle mass index; EF – ejection fraction; RWT – relative wall thickness; SV – stroke volume; * – significance of differences with the group of healthy individuals; # – significance of differences with the group of patients with CKD–I; $ – significance of differences with the group of patients with CKD–II; ^ – significance of differences with the group of patients with CKD–III. The mark is indicated only in case of significant differences ($P < 0.05$).

Table 4

Echocardiography indices depending on homocysteinelevel in studied persons (M ± m)

Indices	Homocysteine, mcmol/l				r
	normal level 7.8 ± 0.23, n = 35	subnormal level 13.2 ± 0.25, n = 25	hyperhomocystenimia mild 18.8 ± 0.72, n = 21	moderate and severe 30.0 ± 0.63, n = 28	
EDS, mm	47.9 ± 0.46	49.6 ± 0.72	49.9 ± 0.95	52.3 ± 1.10#	0.39*
ESS, mm	32.6 ± 0.81	36.3 ± 0.91	35.6 ± 2.11	39.5 ± 1.34#	0.31*
LVPWTd, mm	9.2 ± 0.30	10.2 ± 0.40	12.1 ± 0.58#	12.9 ± 0.51#$	0.57*
IVSTd, mm	9.0 ± 0.30	10.1 ± 0.39	12.0 ± 0.50#	12.7 ± 0.52#$	0.59*
LVMM, g	176 ± 9.8	220 ± 14.6#	295 ± 27.5#	349 ± 28.5#$^	0.58*
EDV, ml	187 ± 3.5	123 ± 2.9#	132 ± 6.1	149 ± 10.7#	0.42*
ESV, ml	37.6 ± 2.08	49.0 ± 2.68#	59.2 ± 4.41#	72.3 ± 9.14#	0.45*
LVMMI, g/cm^2	103 ± 5.5	127 ± 7.9#	169 ± 15.1#	202 ± 16.4#$^	0.58*
EF, %	65.8 ± 0.99	60.4 ± 1.78#	56.0 ± 1.66#	54.1 ± 2.17#$	–0.50*
RWT, mm	0.38 ± 0.010	0.41 ± 0.017	0.48 ± 0.010#$	0.49 ± 0.010#$	0.54*
SV, ml	70.5 ± 1.89	74.0 ± 2.47	73.3 ± 2.25	78.2 ± 2.46	0.21

Notes: # – significance of differences with the group of persons with normal HC level (1); $ – significance of differences with the group of patients with subnormal HC level (2); ^ – significance of differences with the group of patients with mild HHC (3);* – correlation significance. The mark is indicated only in case of significant differences ($P < 0.05$).

There were no differences in the initial flow velocity rate in all studied patients and apparently healthy control group. In the patients with CKD – I only endothelium-dependent dilation index was decreased, indicating the presence of patients in this group with early signs of endothelial dysfunction.

More significant changes of endothelial function were found in the patients with CKD – II. Both the initial diameter of the brachial artery (D_0) and its diameter in 60 seconds after removing the cuff were higher compared to the control. Besides, significantly decreased EDVDBA was observed in those patients. Thus, the patients with CKD – II had more pronounced signs of endothelial dysfunction as compared to the patients with CKD – I. In the patients with CKD – III disturbances of EDVDBA and EIDVBA were detected (in 2.2 and 1.3 times, respectively), indicative of more significant vascular endothelial dysfunction: there was inhibition of both nitric oxide synthesis and the reception of this endothelium-derived relaxing factor. Thus, in the patients with CKD – IV further progression of endothelial dysfunction was observed. In patients with CKD – IV the diameter of the brachial artery proved to be the largest and both types of dilatation were the least amongall studied persons ($P < 0.05$). In comparison with the control group and the CKD-III group, EDVDBA was lower in 3.8 and 1.5 times, respectively, and EIVDB – in 2.4 and 1.9 times, respectively, indicating further inhibition of endothelial nitric oxide

synthesis as well as its vasodilatory activity. Absolute and relative number of patients with the signs of endothelial dysfunction was found to increase with the increase of CKD severity stage. So, the number of these patients reached 78% by EDVDBA index and 64.3% by EIVDBA index from the group with CKD – II to the group with CKD – IV. It is essential to note that there were no cases of decreased endothelium-independent dilation without simultaneous decrease of endothelium-dependent dilation.

Comparison of groups of patients matched byHC level (normal, subnormal and increased – mild and moderate HHC), with endothelial function indices (Table 6), revealed that the initial diameter of the brachial artery in reactive hyperemia phase, initial blood flow velocity and its increase rate were similar in all groups, i.e. they were independent of the HC levels. Only two values – endothelium-dependent and endothelium-independent dilation – decreased inversely proportional to theincrease of blood plasma HC level, suggesting possible pathogenetic relationship between increased blood plasma HC concentration and vascular endothelial dysfunction. The initial diameter of the brachial artery as well as its diameter in the phase of reactive hyperemia correlated with HC level only in CKD–II and CKD – III, and blood flow velocity rate in the reactive hyperemia phase – only in CKD – III. As to the main parameters of endothelial function – endothelium-dependent and endothelium-independent dilation, their decrease inversely correlated with high statistical significance (in all cases $t > 3$) with blood plasma HC level in CKD – II, CKD – III and CKD – IV (for endothelium-dependent dilation) and with CKD – III and CKD – IV (for endothelium-independent dilation).

Table 5
Endothelial dysfunction indices in patients with different stages of CKD (M ± m) and their association with HC level

Indices	Studied groups				
	control, N = 20	CKD – I, n = 18	CKD – II, n = 25	CKD – III, n = 32	CKD – IV, n = 14
D_0, mm	3.61 ± 0.16	4.09 ± 0.20	4.41 ± 0.18*	3.93 ± 0.12	4.44 ± 0.19*^
D_{60}, mm	4.14 ± 0.20	4.52 ± 0.23	4.88 ± 0.24*	4.19 ± 0.13	4.68 ± 0.23
V_0, m/c	0.58 ± 0.02	0.67 ± 0.03	0.64 ± 0.02	0.60 ± 0.01	0.58 ± 0.02#
Endothelium-dependent dilation, %	14.3 ± 1.15	10.3 ± 1.20*	9.8 ± 1.15*	6.6 ± 0.64*#$	4.4 ± 1.08*#$^
Proportion of persons with decreased EDVDBA	–	8 (44.4%)	14 (56.0%)	24 (75.0%)#	11 (78.0%)#
Endothelium-independent dilation, %	19.0 ± 1.25	16.5 ± 1.43	18.9 ± 1.37	14.5 ± 1.09*$	7.8 ± 1.00*#$^
Proportion of persons with decreased EIDVBA	–	3 (16.7%)	4 (16.0%)	9 (28.0%)	9 (64.3%)#
Blood flow velocity rate, %	163 ± 9.9	137 ± 10.4	140 ± 9.7	142 ± 8.7	155 ± 10.3

Notes: D_0 – initial diameter of the brachial artery; D_{60} – the diameter of the brachial artery in 60 seconds after cuff removal; V_0 – initial blood flowrate; EDVDBA – endothelium-dependent vasodilation of brachial artery; EIDVBA – endothelium-independent vasodilation of brachial artery; * – significance of differences with the group of healthy individuals; # – significance of differences with the group of patients with CKD – I; $ – significance of differences with the group of patients with CKD – II, ^ – significance of differences with the group of patients CKD – II. The mark is indicated only in case of significant differences ($P < 0.05$).

Table 6
Endothelial function indicesin different blood plasma HC levels (M ± m)

Indices	Ranking of HC levels			
	normal level <10.0 mcmol/l, n = 37	subnormal level 10–15 mcmol/l, n = 28	hyperhomocysteinemia	
			mild 15–25 mcmol/l, n = 20	moderate and severe >25 mcmol/l, n = 24
Homocysteine, mcmol/l	7.9 ± 0.21	12.9 ± 0.28	19.8 ± 0.70	29.9 ± 0.62
D_0, mm	4.14 ± 0.15	4.32 ± 0.15	3.58 ± 0.14	4.09 ± 0.13
D_{60}, mm	4.72 ± 0.17	4.80 ± 0.19	3.77 ± 0.15	4.24 ± 0.13
V_0, m/c	0.63 ± 0.02	0.66 ± 0.02	0.57 ± 0.02	0.58 ± 0.02
Endothelium-dependent dilation, %	13.7 ± 0.80	10.1 ± 0.77*	5.5 ± 0.76*#	3.8 ± 0.57*#
Endothelium-independent dilation, %	19.3 ± 0.84	18.5 ± 1.06	11.9 ± 1.22*#	10.5 ± 1.42*#
Blood flow velocity rate,%	159 ± 7.5	143 ± 9.2	136 ± 9.8	138 ± 8.9

Notes: * – significance of differences with the group of persons with normal HC level (1); # – significance of differences with the group of persons with subnormal HC levels (2). The mark is indicated only in case of significant differences ($P < 0.05$).

Discussion

Thus, the investigation of blood plasma HC level in the patients with CKD showed normal and subnormal HC levels in 26 (21.1%) and 34 persons (27.7%), respectively; mild and moderate HHCwas found in 30 (24.4%) and 33 (26.8%) cases, respectively, i.e. the total number of patients with elevated HC level was 88.9%. It should be noted that no patients with normal HC level were found in CKD–IV group as well as among dialysis patients.

The increase of blood plasma HC level was virtually proportional to the severity of renal failure, which in its turn led to the shift in the number of cases towards higher rank indices of HHC level. In particular, while no patients with HHC were found among those with CKD – I, there were more than 50% of such cases in the group with CKD – V. HC accumulation in patients with renal damage is quite understandable, because it is the kidneys that play the major role in HC elimination from blood plasma (Long and Nie, 2016). On the other hand, high levels of HC may in their turn aggravate kidney damage as renal vascular endothelium is highly sensitive to the toxic effects of excessive HC.

The data obtained suggest that adverse structural and functional changes in the heart and blood vessels are associated with an increase of serum HC levels. In particular, increased HC levels were associated with lower ejection fraction (EF) indices. Correlation coefficient was –0.5 ($P < 0.05$), indicative of progressive reduction of myocardial contractile function, it depending on the increase of HC levelas well as CKD stage. The indices being actually the markers of left ventricular hypertrophy (LVPWTd, IVSTd and LVMMI) increased significantly with the increase of blood HC levels which was confirmed by strong significant correlation relationships between them.

Tge ability of HC to affect adversely the structural and functional status of the heart was previosly demonstrated in the patients with coronary artery disease (Gangly and Alam, 2015) as well as in patients with CKD in clinical settings and experimental conditions (Tyagi et al., 2005).

The data presented clearly demonstrate that endothelial dysfunction indices exhibit strong inverse correlation with HC level. EDVDBA was lower in 3.8 and 1.5 times, respectively, and EIDVBA – in 2.4 and 1.9 times, respectively, in CKD – IV group compared with the control and CKD – III group. Correlation analy-

sis also confirmed that impaired endothelium-dependent and endothelium-independent dilation inversely correlated with blood plasma HC level with high statistical significance (in all cases $t > 3$). The relationship between endothelium-dependent and endothelium-independent dilation and the degree of renal failure was described in other trials (Rebrov and Zalepukina, 2001; Lai and Kan, 2015) but HHC role as a factor of vascular lesions was not studied.

Thus, the population of patients with CKD is characterized by high frequency of HHC, which is closely associated with diseases of the cardiovascular system (endothelial dysfunction, structural and functional myocardium remodelling) and may be an important risk factor for the development ofvascular lesions. We believe that adequate HHC correction, folic acid administration in particular, couldreduce the progression of vascular lesions in patients with CKD.

Conclusions

In patients with CKD HHC occurs with high frequency. The increase of blood plasma HC level is proportional to the severity of CKD stage. While HHC occurs in 12.9% of cases in CKD – II, it makes up 46.5% in CKD – III, 64.3% – in CKD – IV, 52.5% – in dialysis patients. Decreased myocardial contractility, left ventricular hypertrophy (LVPWTd, IVSTd and LVMMI) as well as endothelial dysfunction (EDVDBA and EIDVBA) in patients with CKD are closely associated with blood plasma HC concentrations. Adequate HHC correction, folic acid administration in particular, couldreduce the progression of vascular lesions in patients with CKD.

References

Amin, A. P., Spertus, J. A., Reid, K. J., Lan, X., Buchanan, D. M., Decker, C., & Masoudi, F. A. (2010). The prognostic importance of worsening renal function during an acute myocardial infarction on long-term mortality. American Heart Journal, 60, 1065–1071.

Baszczuk, A., Kopczynski, Z., & Thielemann, A. (2014). Endothelial dysfunction in patients with primary hypertension and hyperhomocysteinemia. Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczainej, 68, 91–100.

Chuang, C. H., Lee, Y. Y., Sheu, B. F., Hsiao, C. T., Loke, S. S., Chen, J. C., & Li, W. C. (2013). Homocysteine and C-reactive protein as useful surrogate markers for evaluating CKD risk in adults. Kidney Blood Pressure Research, 37, 402–413.

Dayal, S., Blokhin, I. O., Erger, R. A., Jensen, M., Arning, E., Stevens, J. W., Bottiglieri, T., Faraci, F. M., & Lentz, S. R. (2014). Protective vascular and cardiac effects of inducible nitric oxide synthase in mice with hyperhomocysteinemia. PLoS One, 9(9), e107734.

Fromot, J., Deharo, P., Bruzzese, L., Cuisset, T., Bonatti, S., Fenouillet, E., Motolla, G., Ruf, J., Guieu, R., & Can, J. (2016). Adenosine plasma level correlates with homocysteine and uric acid in patients with coronary artery disease. Physiology and Pharmacology, 94(3), 272–277.

Gangly, P., & Alam, S. F. (2015). Role of homocysteine in the development of cardiovascular disease. Nutrition Journal, 14, 6.

Hang, X., Yuling, Z., Yanjie, X., William, Y., Xiaohua, J., Xiaojin, S., Xiaoshu, C., Jingfeng, W., Xuebin, Q., Jun, Y., Yong, J., Xiaofeng, Y., & Hong, W. (2017). Caspase-1 inflammasome activation mediates homocysteine-induced pyrom-apoptosis in endotelial cells. Circulation Research, 118(10), 1525–1539.

Heilmann, R. M., Grutzner, N., Iazbik, M. C., Lopes, R., Bridges, C. S., Suchodolski, J. S., Couto. C. G., & Steiner, J. M. (2017). Hyperhomocystein-emia in Greyhounds and its association whith hypofolatemia and other clinicopatologic variables. Journal of Veterinary Internal Medicine, 31(1), 109–116.

Jacobsen, D. W. (1998). Homocysteine and vitamins in cardiovascular disease. Clinical Chemistry, 44, 1833–1843.

Kolarz, M., Glowacki, R., Stompor, T., Wyroslak, J., & Undas, A. (2012). Elevated levels of Nε-homocysteinyl-lysine isopeptide in patients on long-term hemodialysis. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 50(8), 1373–1378.

Kolarz, M., Malyszko, J., Stompor, T., Calca, A., Undas, A., & Mysliwiec, M. (2013). Antibodies against Nε-homocysteinylated proteins in patients on different methods of renal replacement therapy. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 51(5), 1093–1099.

Kolesnyk, M., Nicolaenko, S., & Snisar, L. (2016) Rating score medical care renal profile in Ukraine 2015. Ukrainian Journal of Nephrology and Dialysis, 4(52), 1–9.

Lai, S., Dimko, M., Galani, A., Coppola, B., Innico, G., Frassetti, N., Mazzei, E. D., & Mariotti, A. (2015). Early markers of cardiovascular risk in chronic kidney disease. Renal Failure, 37(2), 254–261.

Lai, W. K., & Kan, M. Y. (2015). Homocysteine-induced endothelial dysfunction. Annals of Nutrition and Metabolism, 67(1), 1–12.

Levi, A., Cohen, E., Levi, M., Golberg, E., Garty, M., & Krause, I. (2014). Elevated serum homocysteine is a predictor of accelerated decline in renal function and chronic kidney disease: A historical prospective study. European Journal of Internal Medicine, 25(10), 951–955.

Long, Y., & Nie, J. (2016). Homocysteine in renal injury. Kidney Diseases (Basel), 2(2), 80–87.

Matsushita, K., van der Velde, M., Astor, B. C., Woodward, M., Levey, A. S., de Jonq, P. E., Corech, J., & Gansevoort, R. T. (2010). Association of estimated glomerular filtration rate and albuminuria with all-cause and cardiovascular mortality in general population cohorts: A collaborative meta-analysis. Lancet, 375(9731), 2073–2081.

Mazur, P., Kozynacka, A., Duraiski, L., Glowacki, R., Pfitzner, R., Fijorek, K., Sadovski, J., & Undas, A. (2012). Nε-homocysteinyl-lysine isopeptide is associated with progression of peripheral artery disease in patients treated with folic acid. European Journal of Vascular and Endovascular Surgery, 43(5), 588–593.

Neigwekar, S. U., Kang, A., Zoungas, S., Cass, F., Gallagher, M. P., Kulshrestha, S., Navaneethan, S. U., Perkovic, V., Strippoli, G. F., & Jardine, M. J. (2015). Interventions for lowering plasma homocysteine levels in dialysis patients. Cochrane Database of Systematic Reviews, 31(5), CD004683.

Pang, H., Han B., Fu, Q., & Zong, Z. (2016). Association of high homocysteine levels with the risk stratification in hypertensive patients at risk of stroke. Clinical Therapeutics, 38(5), 1184–1192.

Qin, X., Huo, Y., Xie, D., Hou, F., Xu, X., & Wang, H. (2013). Homocysteine-lowering therapy whith folic acid is effective in cardiovascular disease prevention in patients whith kidney disease: A meta-analysis of randomized controlled trials. Clinical Nutrition, 32(5), 722–727.

Rebrov, A. P., & Zelepukina, N. Y. (2001). Disfunction an endoteliya at patients with a chronic glomerulonefrit in various stages of a renal failure. Nephrology and Dialysis, 3(4), 33–36.

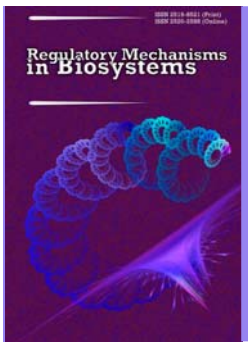
Toda, N., & Okamura, T. (2016). Huperhomocysteinemia impairs regional blood flow: Involvements of endothelial and neuronal nitric oxide. Pfugers Archiv, 468(9), 1517–1525.

Tyagi, N., Sedoris, K. S., Steed, M., Ovechkin, A. V., Moshai, K. S., & Tyagi, S. C. (2005). Mechanisms of homocysteine-induced oxidative stress. American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology, 289(6), 2649–2656.

Xie, D., Yuan, Y., Guo, J., Yang, S., Xu, X., Wang, Q., Li, Y., Qin, X., Tang, G., Huo, Y., Deng, G., Wu, S., Wang, B., Zhang, Q., Wang, X., Fang, P., Wang, H., Xu, X., & Hou, F. (2015). Hyperhomocysteinemia predicts renal function decline: A prospective study in hypertensive adults. Scientific Reports, 5, 16268.

Yildiz, G., Duman, A., Aydin, H., Yilmaz, A., Hur, E., Magden, K., Cetin, G., & Candan, F. (2013). Evaluation of association between atherogenic index of plasma and intima-media thickness of the carotid artery for subclinic atherosclerosis in patients on maintenance hemodialysis. Hemodialysis International, 17(3), 397–405.

Zhang, D., Sun, X., Liu, J., Xie, X., Cui, W., & Zhu, Y. (2015). Homocysteine accelerates senescence of endothelial cells via DNA hypomethylation of human telomerase reverse transcriptase. Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology, 35(1), 71–78.



Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(2), 152–156
doi: 10.15421/021724

Peculiarities of the influence of antihypertensive therapy on endothelial function, oxidative stress and immune activation in obese patients

T. V. Ashcheulova, N. N. Gerasimchuk

Kharkiv National Medical University, Kharkiv, Ukraine

Article info

Received 17.03.2017
Received in revised form 22.04.2017
Accepted 25.04.2017

Kharkiv National Medical University, Nauky Ave., 4, Kharkiv, 61022, Ukraine.
Tel.: +38-096-120-68-72.
E-mail: nino.gerasimchuk@gmail.com

Ashcheulova, T. V., & Gerasimchuk, N. N. (2017). Peculiarities of the influence of antihypertensive therapy on endothelial function, oxidative stress and immune activation in obese patients. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(2), 152–156. doi:10.15421/021724

This article aims to improve the combined antihypertensive therapy on the basis of studying the antioxidant properties of bisoprolol and indapamid, their impact on endothelial dysfunction (ED) and pro-inflammatory cytokines activity in hypertensive patients with overweight and obesity. A combination of a β-blocker (BAB) with a diuretic (D) (bisoprolol 2.5, 5, 10 mg and indapamid 1.5–2.5 mg/day) was prescribed to 102 patients with essential hypertension of 1–3 grades, 30 to 65 years old (mean age – 54.54 ± 0.91 years), who previously had not been receiving regular antihypertensive therapy. The daily dose of bisoprolol was administered by continuous slow titration, starting with low doses of 1.25 mg/day. Of the patients 82 were women and 20 men, the duration of disease averaged 9.0 ± 0.71 years. The control group included 16 healthy subjects matched for age and sex. The level of stable terminal metabolites of nitric oxide NO (nitrite NO_2^- and nitrate NO_3^-), the concentration of S-nitrosothiol and NO-synthases (NOS), SOD, and catalase activity was determined biochemically. The contents of serum 8-iso-PgF2α (8-isoprostane), TNF-alpha and its type I soluble receptor (sTNF-αRI) were determined in all subjects using the "8-isoprostane ELISA" (Usbiological, USA), "ProCon TNFα" (Protein Contour, Russian Federation) and "sTNF-RI EASIA" (BioSource Europe SA, Belgium) ELISA kits, respectively. During the course of combined antihypertensive therapy we observed a significant decrease of S-nitrosothiols levels, i-NOS activity, reduction of TNF-α type I of its soluble receptor (sTNF-αRI), and oxidative stress marker – 8-iso-PgF2α in the examined patients. Nitrites and nitrates serum levels, activity of e-NOS, superoxide dismutase and catalase, by contrast, were increased in patients with hypertension and concomitant obesity. These changes may reflect the fact that against the background of the therapy there was a reduction in tension of oxidative stress, which leads to an improvement in endothelial function. Significant reduction ratio of TNF-α/sTNF-αRI shows suppression of autoimmune and apoptotic activity in patients under treatment. Thus, the improvement of endothelial function, a significant decrease in autoimmune activation due to lower tension of oxidative stress in the examined patients optimizes use of a combination of bisoprolol and indapamid for differentiated therapy in hypertensive patients with obesity.

Keywords: nitric oxide; S-nitrosothiol; endothelial and inducible NO-synthase; tumor necrosis factor-alpha and its soluble receptor type I; 8-isoprostane; superoxide dismutase; catalase

Introduction

Hypertension occupies a leading place among the causes of cardiovascular and cerebrovascular mortality. Meta-analyses of clinical trials have shown a significant reduction in risk of coronary events and stroke in cases of intensive lowering of blood pressure (BP) in comparison to patients with a lesser decrease in blood pressure (Ruilope, 2005), which indicates the expediency of developing new approaches to diagnosis, timely and adequate therapy of this disease.

Published in 1997, a report by the World Health Organization (WHO) emphasizes that the prevalence of obesity is a rapidly progressing social problem of our time which has adverse effects on our health that cannot be neglected. Numerous clinical studies have established the relationship of high blood pressure with increasing body weight. In particular, in the INTERSALT study, carried out in 52 population groups, there was a direct correlation between body mass index (BMI) and elevated blood pressure (Dyer et al., 1994).

In one particularly large-scale study, the Hypertension Control Program found that 50% of surveyed middle-aged overweight subjects suffered from hypertension (EH), and 2/3 cases of the hypertension were associated with obesity (Stamler et al., 1987). According to the Framingham study. 78% of men and 65% of women who are obese suffer from hypertension. Thus, with an increase in body weight of 4.5 kg systolic blood pressure increases by an average of 4 mm Hg (men – 4.4 mm Hg, for women – 4.2 mm Hg), so weight gain of 1 kg is accompanied by an increase in blood pressure by 1 mm Hg (Alisson et al., 1997). These data are confirmed by studies of the Swedish Obesity Study (Sjostrom and Lissner, 1997) that 44–51% of individuals with obesity suffered from essential hypertension. Consequently, the increase in body weight is a potential risk factor for essential hypertension.

Recently the term "obesity induced hypertension" ("hypertension induced by obesity") has been coined. The pathogenesis of the hypertension associated with obesity is a multicomponent process, including an increase in circulating blood volume, vasoconstriction, hyperactivity of the sympathetic and renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS), metabolic disorders. One of the early phases of the pathogenesis of this combined pathology is the development of endothelial dysfunction (ED). Elevated levels of angiotensin

secreted by the adipocytes, is an important link between visceral obesity and ED, as evidenced by the correlation of the ratio of the "circumference of waist/circumference of hips" with the level of mRNA angiotenzinoguena visceral and subcutaneous adipose tissue. The subsequent increase of production of angiotensin II at the tissue level stimulates the secretion of superoxide, a leading factor in the etiology of ED. The subsequent increase of production of angiotensin II at the tissue level stimulates the secretion of superoxide, a leading factor in the etiology of endothelial dysfunction (Lahera et al., 2011; Chow and Allen, 2016; Chaudhary and Chaudhary, 2017). Currently, the leading role of the endothelium, and nitric oxide in the pathogenesis of cardiovascular complications hypertension is being investigated. Endothelial dysfunction (ED) is one of the main links in the pathogenesis of hypertension.

The endothelium is regarded, on one hand, as a target organ that is primarily damaged with an increase in blood pressure, and on the other – as a direct source of its increase. ED may be a consequence of reduction in NO synthesis by endothelial cells, as well as the activation of its degradation in the conditions of oxidative stress (OS).

The leading role in reducing endothelium-dependent vasodilation is taken by to the intracellular OS as free radical oxidation dramatically reduces the production of NO by endothelial cells (Kovaljova et al., 2005; Ashcheulova et al., 2007). Also ED is associated with high risk of cerebrovascular complications of hypertension: encephalopathy, transient ischemic attacks, ischemic stroke (Allison, 2016). Endothelial dysfunction and OS are becoming the new therapeutic targets in the treatment of hypertensive patients. Their manifestations are reduced by the action of endogenous and exogenous antioxidants that restore endothelial function by preventing the interaction of excess nitric oxide produced in pathological conditions with superoxide anions. It should be noted that the analyses of pharmacological properties of antihypertensive drugs pay little attention to this aspect. According to some researchers, OS can be a promotor of activation of the proinflammatory cytokines system. Among the pro-inflammatory cytokines, the tumor necrosis factor-α (TNF-α) deserves particular attention in context of hypertension (Azra and Feely, 2005; Bautista et al., 2005; Ashcheulova et al., 2007; Ambrosova et al., 2009; Kovaljova et al., 2015).

Thus, Zahorska-Markiewiez et al. (2001) was found in the blood of patients with essential hypertension an increased content of C-reactive protein (CRP) and TNF-α. Hemodynamic stress caused by hypertension,is a stimulus of increased release into the blood of proinflammatory cytokines, including TNF-α (Kovaljova and Ashcheulova, 2002; Arroyo-Espliguero et al., 2009), which, in turn, can modulate the structure and function of the cardiovascular system. Thus, TNF-α is able to suppress myocardial contractility through blockade of β-adrenergic signals, increase the content of nitric oxide in the myocardium and cause changes in the homeostasis of intracellular calcium. Insulin resistance (IR) as one of the components of metabolic syndrome X is a link between ED and abdominal obesity, presumably through the system of nitric oxide, namely: endothelial NO increases glucose uptake by muscle cells (Li et al., 2012; Kovaljova et al., 2015).

The most important precondition for the maximum reduction in cardiovascular risk in hypertension is achieving the target BP, which may be a problem in presence of overweight and obesity. In many cases there is a need for combination of two antihypertensive drugs that should be metabolically neutral (Kovaljova et al., 2005; Neutel, 2011).

Thus, the scientific justification of treatment regimens for hypertensive patients with overweight and obesity, the study of the antioxidant efficacy of combined antihypertensive therapy is extremely relevant and important for today's practical healthcare. Despite the large number of antihypertensive drugs and the scientific study of the principles of treatment of patients with hypertension, it would be a mistake to assume that the problem is completely solved.

The research presented in this article aims o improve the combined antihypertensive therapy on the basis of studying the antioxidant properties of β-adrenoblocker (bisoprolol) and diuretic (indapamid), their impact on endothelial dysfunction and pro-inflammatory cytokines activity in hypertensive patients with overweight and obesity.

Materials and methods

A combination of a β-adrenoblocker (BAB) and diuretic (D) (bisoprolol 2.5–10.0 mg/day, and indapamid 1.5–2.5 mg/day) was prescribed to 102 patients with essential hypertension of 1–3 grades, from 30 to 65 years old (mean age – 54.5 years), who previously had not been receiving regular antihypertensive therapy. The daily dose of bisoprolol was administered by continuous slow titration, starting with low doses of 1.25 mg/day. Gradually the dose was increased to the maximum tolerated or target under the control of clinical parameters, especially blood pressure and heart rate (HR). Of these, 82 of the patients were women and 20 were men, the duration of the disease was on average 9.0 ± 0.71 years. The control group included 16 healthy subjects matched for age and sex.

Fasting blood was taken for research the day after the patient's admission to hospital, 12–18 hours after eating. In a part of this group (48 persons) the study was conducted after 12–14 days of in-patient treatment on the background of antihypertensive therapy and 2 months after the start of treatment. Blood sampling was performed from the cubital vein. All patients were similar in terms of physical activity, did not take any nitro-containing drugs, and did not eat foods rich in nitrates and nitrites.

On the basis of a complex clinical and instrumental examination, verification of the diagnosis and estimation of the hypertension grade was performed according to the criteria recommended by the European Society of Hypertension (ESH) / European Society of Cardiology (ESC) (2013). Exclusion criteria, in addition to secondary hypertension, included associated inflammatory and endocrine disorders as well as other conditions that could have an impact on the activity of oxidative processes.Thus18 patients were diagnosed with essential hypertension of 1 degree, 29 patients with 2 degree and 55 patients with 3 degree hypertension.

In addition to the standard examination protocol, anthropometric measurements (height, weight, waist and hips circumference) were taken with the calculation of body mass index (BMI), waist to hips ratio (W/H) in order to determine the presence of excess body weight and degree of obesity as well as type of fat distribution.

The surveyed patients had overweight or obesity of 1, 2 and 3 degrees. Overweight occurred in 55 patients and obesity in 47 patients where obesity of 1 degree was observed in 16 patients, 2nd degree with 22 and 3rd degree in 9 patients.

Some patients were diagnosed with concomitant diseases such as coronary heart disease (CHD) angina pectoris I (n = 2), II (n = 8) and III (n = 11) functional class, and diffuse cardiosclerosis (n = 62). With 9 patients their anamnesis recorded an ischemic stroke, 7 – myocardial infarction. In the study of the fundus of eye hypertensive angiopathy of the retina was found in 68 patients. Neurological examination showed the presence of dyscirculatory encephalopathy with asthenic-neurotic (n = 44), vestibular-ataxic syndromes (n = 22) and liquor hypertension (n = 34). In 90 patients hypertension was complicated by heart failure (HF). HF I stage occurred in 20 patients, HF II–A stage was in 67 patients and 3 cases were with HF II–B stage. In 12 patients the signs of HF were not observed.

The endothelial functional state on the background of combined therapy was studied by evaluating the activity of endothelial and inducible NO-synthase, level of nitrites, nitrates and S-nitrosothiol (n = 48).

Determining the state of pro-oxidant and antioxidant systems in the dynamics of treatment in this group of patients was based on the analysis of 8-isoprostane level (n = 10, control group n = 10), superoxide dismutase (SOD), and catalase (n = 48). According to the current data, 8-isoprostane (8-IP) is considered one of the most specific markers allowing assessment of the level of free radicals production with a sufficient degree of accuracy, reliability and reproducibility of the results. 8-IP is a product of metabolism in

peroxidation of arachidonic acid which is isomerical to prostaglandin F2α (Kovaljova et al., 2015).

Immune activation during therapy with bisoprolol and indapamid was assessed by evaluating the serum levels of TNF-α and its type I soluble receptor (sTNF-αRI) in all subjects. These indices may be used as the criteria for treatment efficacy in hypertensive patients with overweight and obesity.

The level of stable terminal metabolites of nitric oxide NO (nitrite NO_2^- and nitrate NO_3^-), the concentration of S-nitrosothiol and NO-synthases (NOS), SOD, and catalase activity was determined biochemically. The general NOS activity was assessed according to L. Green's method by evaluation of nitrite anion formed after incubation.

The contents of serum 8-iso-PgF2α (8-isoprostane), TNF-alpha and its type I soluble receptor (sTNF-αRI) were determined in all subjects using the "8-isoprostane ELISA" (Usbiological, USA), "ProCon TNFα" (Protein contour, Russian Federation) and "sTNF-RI EASIA" (BioSource Europe SA, Belgium) ELISA kits, respectively.

Statistical analysis of the study results was performed using Statistica v. 6.0 (Statsoft Inc., USA). The obtained results are presented as mean value (Mean) ± standard deviation (SD). Compliance the normal distribution of data Gause during visual analysis of categorized histograms and using the Kolmogorov-Smirnov test, Shapiro-Wilk and Lilieforsa. Hypotheses about the equality of general average were evaluated using Student's test.

Results and discussion

As a result of research, we have found a significant increase in the S-nitrosothiol, i-NOS, pro-inflammatory cytokines (TNF-α, sTNF-RI) levels, as well as markers of oxidative stress – 8-iso-PgF2α in the observed patients. Levels of nitrites and nitrates, e-NOS and SOD activity, on the contrary, were decreased in the serum of patients with essential hypertension and associated obesity. The tendency to reduction of the latter parameters in the observed patients vs control group was also revealed. When determining catalase activity, there were no significant differences compared with the control group (Table 1).

Table 1
Levels of S-nitrosothiol, NO_2^-, NO_3^-, i-NOS, e-NOS, TNF-α, sTNF-αRI, 8-isoprostane, SOD and catalase activity in hypertensive patients with obesity vs control group

Parameter	Control group	The examinees patients
S-nitrosothiol, mmol/l	0.220 ± 0.039	0.440 ± 0.163*
NO_2^-, μmol/l	14.2 ± 1.8	13.9 ± 6.3**
NO_3^-, μmol/l	24.1 ± 2.5	20.2 ± 8.2**
i-NOS, pmol/min. x mg of protein	0.208 ± 0.089	0.591 ± 0.093*
e-NOS, pmol/min. x mg of protein	0.782 ± 0.045	0.739 ± 0.100**
TNF-α, pg/ml	13.2 ± 3.4	115.2 ± 19.6*
sTNF-αRI, ng/ml	1.20 ± 0.60	2.17 ± 0.12*
8-isoprostan, ng/ml	1.41 ± 0.25	17.15 ± 3.12*
SOD, μcatal/l	0.54 ± 0.05	0.46 ± 0.14**
Catalase, μcatal/l	3.34 ± 0.39	3.39 ± 1.54**

Note: * – P < 0.05 vs control group; ** – P > 0.05 vs control group.

There was an increase in S-nitrosothiol serum levels and reduction of nitrites levels and nitrates levels of most persons with hypertension of the 3rd degree and obesity of the 3rd degree, which can serve as an important pathophysiological mechanism of endothelial dysfunction in conditions of oxidative stress.

In the group of patients with hypertension of the 3rd degree S-nitrosothiol serum levels increased by 2 times (0.46 ± 0.16 vs 0.22 ± 0.04) compared to control group (P < 0.05). In the group of patients with hypertension and obesity of III degree S-nitrosothiol serum levels increased by 2.5 times (0.55 ± 0.11 vs. 0.22 ± 0.04) compared to control group (P < 0.05) and by 1.3 times compared to patients overweight (0.41 ± 0.14; P < 0.05).

In the group of patients with hypertension of the 3rd degree nitrites levels (13.6 ± 6.2 vs 14.2 ± 1.8; P > 0.05) and nitrates levels (19.7 ± 7.6 vs 24.1 ± 2.5; P < 0.05) decreased by 1.04 times and by 1.2 times, respectively, compared to the control group. In the group of patients with hypertension and obesity of III degree nitrites serum levels (9.7 ± 3.5 vs 14.2 ± 1.8; P < 0.05) and nitrates serum levels (13.8 ± 5.2 vs 24.1 ± 2.5; P < 0.05) decreased by 1.5 times and by 1.7 times, respectively, compared to the control group (Gerasimchuk, 2008). The increase of S-nitrosothiol serum levels in patients with hypertension and overweight or obesity may be associated with increased activity of inducible NO-synthase.

Thus, the obtained results of the study confirm that one of the leading mechanism of the pathogenesis of essential hypertension associated with obesity is endothelial dysfunction, a manifestation of which is the decrease in the level of nitric oxide as an important factor of relaxation of the endothelium of blood vessels, increased activity of iNO-synthase and a decrease in the activity of eNO-synthase (Privalova, 2013). The development of endothelial dysfunction plays an important role in immunocompetent activation mediated by proinflammatory cytokines, particularly tumor necrosis factor-α, and OS.

Under the influence of bisoprolol and indapamid, we observed changes in S-nitrosothiol, stable NO metabolites and NOS activity. This drug combination alters the activity of SOD, catalase, and 8-isoprostane level. The dynamics of mean values,of the assessed parameters during the combined antihypertensive therapy are presented in Table 2.

Analyzing the data obtained both after 14 days from the start of treatment and after 2 months of therapy, S-nitrosothiol serum levels decreased by 21.3% and 32.2% respectively (0.34 ± 0.13 vs 0.50 ± 0.17) compared to baseline (P < 0.05). These changes may reflect the fact that the reduction of oxidative stress was taking place on the background of therapy. The latter is also proved by a significant increase of nitrites levels by 21.1% and 34.6% (19.0 ± 7.1 vs 14.1 ± 7.7), as well as nitrates levels by 21.8% and 31.2% (27.2 ± 7.6 vs 20.7 ± 9.9 from baseline) (P < 0.05) after the period of hospital treatment and after 2 months of therapy, respectively.

In the group of patients with hypertension, a change in the ratio of NOS isoforms activity was observed during the course of bisoprolol/indapamid treatment. The activity of i-NOS was signify-cantly reduced by 10.6% and 11.3% (0.55 ± 0.07 vs 0.62 ± 0.06 vs the group prior to treatment) after the period of hospital treatment and after 2 months of therapy, respectively, P < 0.05.

Table 2
Endothelial functional state and oxidative stress dynamics during the combined therapy with bisoprolol and indapamid in hypertensive patients with obesity

Parameter	Before treatment, n = 48	The period of inpatient treatment, n = 48	After 2 months of treatment, n = 10
S-nitrosothiol, mmol/l	0.46 ± 0.15	0.36 ± 0.12*	0.34 ± 0.13*
NO_2^-, μmol/l	13.0 ± 5.9	15.8 ± 5.3*	19.0 ± 7.1*
NO_3^-, μmol/l	18.8 ± 7.8	22.9 ± 6.7*	27.2 ± 7.6*
i-NOS, pmol/min. x mg of protein	0.61 ± 0.07	0.54 ± 0.09*	0.55 ± 0.07*
e-NOS, pmol/min. x mg of protein	0.77 ± 0.07	0.81 ± 0.09*	0.85 ± 0.08*
8-isoprostan, ng/ml	20.5 ± 17.4	14.7 ± 13.4*	12.3 ± 7.3*
SOD, μcatal/l	0.48 ± 0.17	0.60 ± 0.20*	0.60 ± 0.11*
Catalase, μcatal/l	3.31 ± 1.57	4.48 ± 1.35*	4.14 ± 1.29*

Note:* – P < 0.05 vs levels before treatment.

The activity of e-NOS, on the contrary, showed a significant increase by 5.6% and 8.1% (0.85 ± 0.08 vs 0.79 ± 0.06 compared to the level before treatment) after 10–14 days and 2 months of therapy, $P < 0.05$. From the above it can be concluded that the treatment of hypertensive patients with overweight and obesity with β-adrenoblocker (BAB) and diuretic (D) (bisoprolol in combination with indapamid) leads to positive dynamics of NO pool increase throughout the treatment period, indicating the restoration of vasodilatory capacity.

Thus, the changes observed during the course of the above scheme of combined antihypertensive therapy may indicate the improvement of the functional state of endothelium.

During the treatment in hypertensive patients with overweight and obesity using a combination of bisoprolol with indapamid, we also observed a change in the SOD and catalase activity. The obtained data indicates that the SOD activity in the period of hospital treatment significantly increased by 26.7% after in-patient period and by 47.0% after 2 months of treatment (0.60 ± 0.11 vs 0.41 ± 0.11) compared to a group of patients before treatment, $P < 0.05$. A significant increase in the catalase activity was also prominent both during the hospital treatment period, by 35.3% (4.48 ± 1.35 vs 3.31 ± 1.57, $P < 0.05$) and 2 months after the start of treatment – by 48.4% (4.14 ± 1.29 vs 2.49 ± 1.04, $P < 0.05$).

Analysing the level of 8-isoprostane as the main marker of oxidative stress, a decrease of its serum level by 28.1% (14.7 ± 13.4 vs 20.5 ± 17.4, $P < 0.05$) was observed during 10–14 days of treatment in a hospital. After 2 months of treatment, 8-isoprostane levels had decreased by 58.4% (down to 12.3 ± 7.3) compared to baseline and 2.4 times, respectively, was below. These facts testify to the beneficial effects of the studied scheme of antihypertensive therapy on the level of 8-isoprostane.

Analysis of the pro-inflammatory cytokines activity showed that a 2-months treatment with a bisoprolol/indapamid led to 61.2% decrease of mean TNF-α levels by 70.5 pg/ml (44.8 ± 8.2 vs 115.2 ± 19.6, $P < 0.05$) compared to baseline prior to treatment. sTNF-αRI showed the opposite trend, increasing its mean levels on 0.24 ng/ml (11.1%) (2.41 ± 0.03 vs 2.17 ± 0.12) during the course of treatment. A significant decrease of the ratio TNF-α/sTNF-αRI by 34.5 (65.0%) (18.6 vs 53.1) indicates a preferential increase in the level of sTNF-αRI, along with a reduction of TNF-α. Since the sTNF-αRI is a natural antagonist of TNF-α, a decrease in this ratio shows the suppression of autoimmune and apoptotic activity in patients as a result of treatment.

During the treatment the patients experienced an improvement of general well being, the reduction of intensity and frequency of headaches, dizziness, pain in the heart region, fatigue, increase in the exercise tolerance. All patients who had been receiving this treatment were discharged from the hospital in satisfactory general condition. The treatment contributed to a significant reduction in blood pressure levels as well as heart rate (HR). The features of these changes on the background of bisoprolol/indapamid treatment are presented in Table 3.

In the group of patients treated with bisoprolol and indapamid, a reduction in the mean values of office systolic blood pressure by 38.8 mmHg and office diastolic blood pressure by 25.3 mm Hg was observed during the hospital treatment period. The average mean blood pressure level decreased by 29.8 mm Hg, pulse blood pressure – by 13.5mm Hg, which corresponded to 23.1%, 25.1%, 24.2%, and 20.0% reduction, respectively, compared with the levels before the onset of treatment $p < 0.05$ for all parameters.

There was also a statistically significant decrease in average heart rate 8 beats (by 9.6%).

The results obtained in the course of treatment with bisoprolol (2.5, 5, 10 mg) combined with indapamid (2.5 mg) can be explained by their mechanism of action. In experimental studies it was found that a diet with high fat levels leads to the development of hypertension as a result of increased education of the free radicals of oxygen (superoxide anion) that inactivate NO (Roberts et al., 2000). Studies examining the relationship between diet, activity of the sympatho-adrenal system (SAS) and the pathogenesis of hypertension in combination with obesity, confirmed the participation of the sympathetic nervous system (SNS), which dictates the necessity of taking ß-blockers in the treatment of hypertension in these patients.

Table 3
Blood pressure and heart rate dynamics
during the course of bisoprolol/indapamid treatment (Mean ± SD)

Parameters	Values
Systolic blood pressure prior to treatment	168.3 ± 26.6
Systolic blood pressure after 10–14 days of in-patient treatment	129.5 ± 11.9*
Diastolic blood pressure prior to treatment	100.8 ± 12.7
Diastolic blood pressure after 10–14 days of in-patient treatment	75.5 ± 6.3*
Mean blood pressure prior to treatment	123.3 ± 16.0
Mean blood pressure after 10–14 days of in-patient treatment	93.4 ± 6.5*
Pulse blood pressure prior to treatment	67.5 ± 19.9
Pulse blood pressure after 10–14 days of in-patient treatment	54.0 ± 11.8*
HR prior to treatment	83.4 ± 11.9
HR after 10–14 days of in-patient treatment	75.3 ± 6.2*

Note:* – $P < 0.05$ vs levels before treatment.

The sympathetic nervous system is a target of ß-blockers. It is proved that early sympathetic activation is an important predictor of morbidity and mortality. Noradrenaline is a neurohumoral transmitter SNS, it causes a lot of adverse effects, which can be neutralized by ß-blockers. An important effect is the suppression of direct cardiotoxic effects of catecholamines by reducing their release from neurons by blockade presynaptic ß-adrenergic recaptors. There is evidence that the activation of ß-adrenergic receptors in the myocardium can cause dysfunction and death of cardiomyocytes due to prolonged decrease in intracellular calcium levels. Catecholamines have direct effects on growth factor in cardiomyocytes, stimulate the process of hypertrophy and are trigger oxidative stress in the apoptosis program (Buemui et al., 2000).

Numerous epidemiological studies have shown a relationship between tachycardia and hypertension. Increasing heart rate is associated with many risk factors, including dyslipidemia, hyperinsulinemia, obesity, and elevated hematocrit. Tachycardia is a marker of increased activity of the sympathetic nervous system. It is known that the decrease in heart rate correlates with longer life in mammals.

Moreover, ß-blockers affect the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS), inhibiting the release of renin by blockade of $ß_1$-receptors in juxtaglomerular apparatus of the kidneys.

Bisoprolol is a β-blocker with a high degree of cardioselectivity, from which this value is 1:75. Bisoprolol does not effect the level of atherogenic fractions of lipids (triglycerides, cholesterol, low-density lipoproteins) in the long reception (Ostroumova and Maksimov, 2012; Knjaz'kova, 2013).

A 13-month study in hypertensive patients taking bisoprolol at a dose of 5–10 mg, did not register statistically significant changes in cholesterol, cholesterol of low-density lipoproteins and cholesterol of high-density lipoproteins (Neutel, 2011).

Thus, the combination of bisoprolol with indapamid is able to improve endothelial function due to the presence of its antioxidant properties. An important role in this combination is played by indapamid, which, unlike other diuretics has a direct vasodilator action. We assume the following mechanisms of vasodilating effect of indapamid:

1) indapamid accumulates in the vascular wall and inhibits the entry of calcium ions in to the vascular smooth muscle cells, which leads to reduction in them of intracellular calcium and the decrease of vascular resistance (the effect of similar to calcium channel blockers);

2) stimulation of the synthesis of prostaglandin I_2 (prostacyclin) and prostaglandin E_2 that have a vasodilating effect;

3) reduction of the sensitivity of the arterial wall to catecholamines and angiotensin II (London, 2004).

The main negative effects of diuretics – hypokalemia and adverse effect on metabolism of glucose, lipids and purines. The least impact on carbohydrate and lipid metabolism is produces by indapamid (Svishhenko, 2000).

Thus, the assessment of endothelial function and pro-inflammatory cytokines activity allows one to optimize the scheme of differentiated prescription of therapy in hypertensive patients.

Conclusions

A positive result in the treatment of hypertensive patients with overweight and obesity using the combination of antihypertensive drugs (bisoprolol at a dose of 2.5, 5, 10 mg with indapamid at a dose of 1.5, 2.5 mg) is associated with improved endothelial function. The latter is manifested by an increase in the level of nitrites and nitrates, enhanced activity of endothelial NO-synthase activity and a simultaneous decrease of inducible NO-synthase.

This combination of antihypertensive drugs reduces oxidative stress, which is expressed in decrease in the 8-isoprostane levels as well as decrease in SOD and catalase activity. At the same time, the conditions for preservation of functionally active NO pool are created by inhibiting the toxic peroxynitrite.

Thus, possessing pronounced antioxidant properties, reducing the symptoms of endothelial dysfunction, a combination of bisoprolol with indapamid significantly reduces the autoimmune activation level, which is manifested in the reduction of TNF-α ratio to its type I soluble receptor (sTNF-αRI).

References

Alisson, D. B., Gallagher, D., & Heo, M. (1997). Body mass index and all-cause mortality among people age 70 and over the longitudinal study of aging. International Journal of Obesity, 21, 424–431.

Allison, S. J. (2016). Oxidative stress and immune activation in hypertension. Nature Reviews Nephrology, 12, 4.

Ambrosova, T. N., Kovaljova, O. N., & Ashcheulova, T. V. (2009). Vzaimosvjaz' aktivnosti FNO-α s razvitiem insulinorezistentnosti u bol'nyh s arterial'noj gipertenziej, associirovannoj s ozhireniem [Interrelation of activity ФНО-α with development of an insulinorezistentnost in patients with the arterial hypertension associated with obesity]. Liki Ukrajiny, 127, 120–123 (in Russian).

Arroyo-Espliguero, R., Avanzas, P., Quiles, J., & Kaski, J. (2009). C-reactive protein predicts functional status and correlates with left ventricular ejection fraction in patients with chronic stable angina. Atherosclerosis, 205(1), 319–324.

Ashcheulova, T. V., Zaika, M. V., & Gerasimchuk, N. N. (2007). Vzaimosvjaz' immunnoj aktivacii i oksidativnogo stressa pri progressirovanii arterial'noj gipertenzii [Relationships between immune activation and oxidative stress in arterial hypertension progression]. Ukrainskij Terapevticheskij Zhurnal, 2, 12–15 (in Russian).

Azra, M., & Feely, J. (2005). Arterial stiffness is related to systemic inflammation in essential hypertension. Hypertension, 46, 1118–1122.

Bautista, L. E., Veram, L. M., & Arenas, I. A. (2005). Independent association between inflammatory markers (C-reactive protein, interleukin 6 and TNF-alpha) and essential hypertension. Journal of Human Hypertension, 19, 149–154.

Buemui, M., Corica, F., & Marino, D. (2000). Cardiovascnlar remodeling, apoptosis and drugs. American Journal of Hypertension, 13, 450–454.

Chaudhary, M., & Chaudhary, S. (2017). Unravelling the lesser known facets of angiotensin II type 1 receptor. Current Hypertension Reports, 19, 1.

Chow, B. S. M., & Allen, T. J. (2016). Angiotensin II type 2 receptor (AT2R) in renal and cardiovascular disease. Clinical Science, 130(15), 1307–1326.

Dyer, A. R., Elliott, P., & Shipley, M. (1994). Body mass index and association of sodium and potassium with blood pressure in intersalt. Hypertension, 23, 729–736.

Gerasimchuk, N. N. (2008). Vazoaktivnyj pul oksida azota u bol'nyh s arterial'noj gipertenziej i izbytochnoj massoj tela [Vasoactive nitric oxide pool at overweight patient with arterial hypertension]. Circulation and Haemostasis, 3, 21–26 (in Russian).

Knjaz'kova, I. I. (2013). Terapevticheskaja jeffektivnost' bisoprolola u bol'nyh so stabil'noj stenokardiej. Zdorov'ja Ukrajiny, 17, 13–15 (in Russian).

Kovaljova, O. N., Ashcheulova, T. V. (2002). Faktor nekroza opuholej-α. Klinicheskoe issledovanie aktivnosti pri arterial'noj gipertenzii [Tumor necrosis factor-α. Clinical trial of activity at arterial hypertension]. Imunologija ta Alergologija, 4, 64–66 (in Russian).

Kovaljova, O. N., Ashcheulova, T. V., & Gerasimchuk, N. N. (2015). Vzaimosvjaz' immunnoj aktivacii i oksidativnogo stressa u bol'nyh gipertonicheskoj bolezn'ju i ih korrekcija kombinirovannoj antigipertenzivnoj terapiej [Relationship of immune activation and oxidative stress in patients with hypertension and their correction combined antihypertensive therapy]. Nauchnye Vedomosti Belgorodskogo Gosudarstvennogo Universiteta Medicina Farmacija, 213, 52–59 (in Russian).

Kovaljova, O. N., Ashcheulova, T. V., Gerasimchuk, N. N., & Safargalina-Kornilova, N. A. (2015). Rol' oksidativnogo stressa v stanovlenii i progressirovanii gipertonicheskoj bolezni [Role of oxidative stress in the formation and progression of hypertensive disease]. Nauchnye Vedomosti Belgorodskogo Gosudarstvennogo Universiteta Medicina Farmacija, 201, 5–10 (in Russian).

Kovaljova, O. N., Belovol, A. N., & Zaika, M. V. (2005). Rol' oksidativnogo stressa v kardiovaskuljarnoj patologii [Role of an oxidative stress in cardiovascular pathology]. AMN Ukrajiny, 11(4), 660–670 (in Russian).

Kovaljova, O. N., Shapovalova, S. A., & Gerasimchuk, N. N. (2005). Kombinirovannaja terapija arterial'noj gipertenzii [Combination therapy of hypertension]. Plejada, Harkiv (in Russian).

Lahera, V., Cachofeiro, V., & Heras, N. (2011). Interplay of hypertension, inflammation, and angiotensin II. American Journal of Hypertension, 24, 1059–1059.

Li, H., Zhu, X., Wang, A., & Wang, G. (2012). Co effect of insulin resistance and biomarkers of inflammation and endothelial dysfunction on hypertension. Hypertension Research, 35(5), 513–517.

London, G. M. (2004). Efficacy of indapamide 1.5 mg, sustained release, in the lowering of systolic blood pressure. Journal of Human Hypertension, 18, 9–14.

Neutel, J., 2011. Combination therapy in hypertension. Springer Healthcare, California, USA.

Ostroumova, O. D., & Maksimov, M. L. (2012). Bezopasnost' primenenija bisoprolola u bol'nyh s sochetannoj patologiej: Klinicheskaja jeffektivnost' i jekonomicheskaja celesoobraznost' [Safety in usage of bisoprololo in patients with complex pathology: Clinical effectiveness and economic rationale]. Consilium Medicum, 14(1), 64–66 (in Russian).

Privalova, E. V. (2013). Arterial'naja gipertenzija: Zashhita organov-mishenej vs prognoz. Al'ternativnyj vybor ili zven'ja odnoj cepi? [Arterial hypertension. Protection of target organs versus prognosis. Alternative choice or links in a single chain?]. Consilium Medicum, 15(5), 14–18 (in Russian).

Roberts, C., Vaziri, N., & Wang, X. (2000). Enhanced NO inactivation and hypertension induced by a high-fat, refined-carbohydrate diet. Hypertension, 36(3), 423–429.

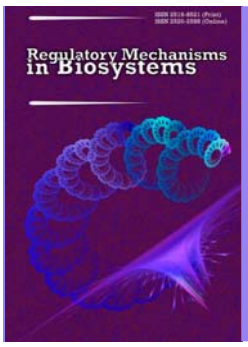
Ruilope, L. M. (2005). Renal function and cardiovascular risk in hypertensive patients. Journal of Hypertension, 23, 1787–1788.

Sjostrom, C. D., & Lissner, L. (1997). Relationships between changes in body composition and changes in cardiovascular risk factors: The SOS International Study. Obesity Research, 5(6), 519–530.

Stamler, R., Stamler, J., & Griim. R. (1987). Nutritional therapy for high blood pressure: Final repot of a four-year randomized controlled trial – the Hypertension Control Program. American Medical Association, 257(11), 1484–1491.

Svishhenko, E. P. (2000). Vlijanie indopresa (indapamida) na sutochnyj profil' arterial'nogo davlenija i nejrogumoral'nye faktory ego reguljacii [Influence of indapamid on daily profile of arterial tension and neurohumoral factors of its regulation]. Doktor, 4, 46–47 (in Russian).

Zahorska-Markiewicz, B., Janowska, J., Olszanecka-Glinianowicz, M., & Zurakowski, A. (2000). Serum concentrations of TNF-α and soluble TNF-α receptors in obesity. International Journal of Obesity, 24(11), 1392–1395.



Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(2), 157–161
doi: 10.15421/021725

Glutathione content in sperm cells of infertile men

R. V. Fafula, O. K. Onufrovych, U. P. Iefremova, O. V. Melnyk, I. A. Nakonechnyi, D. Z. Vorobets, Z. D. Vorobets

Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Lviv, Ukraine

Article info

Received 27.03.2017
Received in revised form 19.04.2017
Accepted 22.04.2017

Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Pekarska Str., 69, Lviv, 79010, Ukraine.
Tel.: +38-097-29-680-69.
E-mail: roman_fafula@ukr.net

Fafula, R. V., Onufrovych, O. K., Iefremova, U. P., Melnyk, O. V., Nakonechnyi, I. A., Vorobets, D. Z., & Vorobets, Z. D. (2017). Glutathione content in sperm cells of infertile men. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(2), 157–161. doi:10.15421/021725

Hyperproduction of reactive oxygen species can damage sperm cells and is considered to be one of the mechanisms of male infertility. Cell protection from the damaging effects of free radicals and lipid peroxidation products is generally determined by the degree of antioxidant protection. Glutathione is non-enzymatic antioxidant which plays an important protective role against oxidative damages and lipid peroxidation. The aim of the present work is to determine the content of reduced and oxidized glutathione in sperm cells of infertile men. Semen samples from 20 fertile men (normozoospermics) and 72 infertile patients (12 oligozoospermics, 17 asthenozoospermics, 10 oligoasthenozoospermics and 33 leucocytospermic) were used. The total, oxidized (GSSG) and reduced (GSH) glutathione levels were measured spectrophotometrically. The levels of total glutathione were significantly lower in the spermatozoa of patients with oligozoo-, asthenozoo- and oligoasthenozoospermia than in the control. Infertile groups showed significantly decreased values of reduced glutathione in sperm cells vs. fertile men, indicating an alteration of oxidative status. The oxidized glutathione levels in sperm cells of infertile men did not differ from those of normozoospermic men with proven fertility. The GSH/GSSG ratio was significantly decreased in the oligo-, astheno- and oligoasthenozoospermic groups compared to the normozoospermic group. In patients with leucocytospermia the GSH/GSSG ratio was lowered, but these changes were not significant. In addition, the glutathione peroxidase activity in sperm cells was decreased in patients with oligozoo-, astenozoo-, oligoastenozoospermia and with leucocytospermia. The most significant changes in glutathione peroxidase activity were observed in infertile men with leucocytospermia. Decreased GSH/GSSG ratio indicates a decline in redox-potential of the glutathione system in sperm cells of men with decreased fertilizing potential. Redistribution between oxidized and reduced forms of glutathione can be caused by depletion of intracellular stores of glutathione and intensification of lipid peroxidation processes. This leads to increased production of reactive oxygen species, further depletion of antioxidant pools and disturbances of structure and function of spermatozoa. Our results indicate that the evaluation of reduced glutathione level and GSH/GSSG ratio in sperm cells of infertile men can be helpful in fertility assessment.

Keywords: glutathione; glutathione peroxidase; spermatozoa; pathospermia; male infertility

Introduction

It is well known that the processes of lipid peroxidation are universal mechanisms of cell damage. However, the physiological levels of lipid peroxidation are necessary for normal functioning of almost all cells. Cell protection from the damaging effects of free radicals and lipid peroxidation products is generally determined by the degree of antioxidant protection. Under physiological norm a balance between the rate (intensity) of free radical processes and the activity of antioxidant systems is maintained.

Reduced glutathione (GSH) and associated enzymes that form the glutathione antioxidant system are of particular importance in maintaining cell viability in antiradical and antiperoxide protection. The glutathione antioxidant system plays a leading role in antioxidant protection under pathological processes. Depletion of the glutathione system leads to cytotoxic and destructive lesions (Kalinina et al., 2014). Reduced glutathione exists in cells in equilibrium with oxidized glutathione (GSSH) and the GSH/GSSH ratio characterizes the redox state of the system in different physiological states (Kurilova et al., 2008). GSH is present in the cell at high concentrations and is a major low molecular weight thiol under physiological conditions. It is known that GSH is the main component that quickly mobilizes at higher peroxide concentrations and restores them in the reaction leading to the formation of cytotoxic GSSG (Koval et al., 2008). The GSH content in cell depends on the balance of opposing processes such as de novo synthesis by gamma-glutamylcysteine synthetase, regeneration of GSSG by glutathionreductase and usage in neutralizing of H_2O_2 and secondary lipid peroxidation products (Iskra, 2011).

Determination of the glutathione level in sperm cells of infertile men and its relation to changes in the spermatogram index have been carried out in several studies published before. However, the in vast majority of studies the glutathione level was determined in seminal plasma, but not in spermatozoa, and the results of these studies were controversial (Lewis et al., 1997; Ochsendorf et al., 1998; Garrido et al., 2004; Ebisch et al., 2006; Aydemir et al., 2007).

The aim of present work is to determine the content of reduced and oxidized glutathione in sperm cells of infertile men with different forms of pathospermia.

Materials and methods

Patients. This study involved 72 infertile men with different forms of pathospermia. They were recruited between 2014 and 2016.

A detailed medical history was performed for all studied cases. Exclusion criteria: subjects currently on any medication or antioxidant supplementation were not included. In addition, subjects with infertility lasting over 10 years, azoospermia, testicular varicocele, genital infection, chronic illness and serious systemic diseases, smokers and alcoholic men were excluded from the study because of their well-known high seminal reactive oxygen species (ROS) levels and decreased antioxidant activity (Atig et al., 2012).

Ejaculates from a total of 72 infertile and 20 fertile healthy individuals were obtained. The control group consisted of 20 healthy men with somatic fertility, normozoospermia and confirmed parenthood (married for 3–10 years and had healthy 1–3 children). Semen samples were obtained by masturbation and collected into sterile containers, following 3–5 days' abstinence from sexual activity. After liquefaction at 37 ºC with 5% CO_2 in air, semen samples were examined for volume, sperm concentration, pH, morphology and motility according to the World Health Organization guidelines. Before becoming involved in the study, all the men were familiarized with patient information leaflets and gave informed consent to participate in research. Terms of sample selection meet the requirements of the principles of the Helsinki Declaration on Protection of Human Rights, Convention of Europe Council on human rights and biomedicine and the provisions of laws of Ukraine. Approval for the study was taken from the ethics committe of Danylo Halytsky Lviv National Medical University.

According to semen analysis, oligozoospermia was found in 12 patients (16.7%), asthenozoospermia was detected in 17 patients (23.6%), oligoasthenozoospermia was observed in 10 patients (13.9%). Thirty-nine (54.2%) infertile men had leukocytes content in the semen lower than $1.0 \cdot 10^6$ ml^{-1}, only in 33 patients (45.8%) was leukocytospermia noted (the leukocytes content ranged from $1.0 \cdot 10^6$ ml^{-1} to $3.0 \cdot 10^6$ ml^{-1}) which indicates inflammation in this group of men.

Cell preparation. Sperm cells were washed from semen plasma by 3 times centrifugation at 3,000 g for 10 min in media which contained (mM): 120 NaCl, 30 KCl, 30 Hepes (pH 7.4). The content of total protein in the samples was determined by Lowry method using a kit to determine its concentration ("Simko Ltd"). The detergent saponin in a final concentration of 0.5% was added to sperm suspension for permeabilization of sperm membranes.

Assay of glutathione content and glutathione peroxidase activity. The content of total glutathione was determined in saponin-permiabilized spermatozoa after complete reduction of glutathione through the use of glutathione reductase by means of Ellman's reagent (Anderson, 1985). The level of 5-trinitrobenzoic acid was monitored with a spectrophotometer at 412 nm. To determine the content of oxidized glutathione (GSSG), 2-vinylpyridine was added to the incubation mixture to a final concentration of 2% 60 min before the determination (Griffith, 1980). The content of reduced glutathione (GSH) was calculated as the difference of contents between total glutathione and its oxidized form. Glutathione peroxidase activity was determined by the oxidation of glutathione.

Statistical analysis. Experimental data were processed by methods of variation statistics using software MS Office. The results are presented as the mean ± standard deviation of the mean. Analysis of variance (ANOVA) was used to compare the difference in the means between infertile and healthy men. Differences were considered statistically significant at $P < 0.05$ for all analyses.

Results

We found that in patients with normozoospermia the GSHt content in sperm cells was 36.5±4.1 pmol of GSH/106 cells (Fig. 1). Patients with oligozoospermia showed 1.9-fold lower GSHt content (19.2 ± 2.1 pmol of GSH/10^6 cells) than did control subjects, whereas patients with asthenozoospermia showed 1.8-fold lower GSHt content (20.8 ± 1.9 pmol of GSH/10^6 cells) than control subjects. In patients with oligoasthenozoospermia GSHt content was 21.7 ± 2.7 pmol of GSH/10^6 cells which was 1.7-fold lower than in normozoospermic men with proven fertility. The GSHt content was 1.2-fold lower (29.8 ± 2.3 pmol GSH/10^6 cells) in leucocytospermic patients vs men with normozoospermia, but these changes were not significant.

The content of GSH in sperm cells of fertile men was 34.0 ± 4.0 pmol/10^6 cells (Fig. 2). We found the decreased GSH level in sperm cells of infertile men with different forms of pathospermia. However, the most expressed changes in the GSH content were observed in patients with oligozoospermia.

The GSH content decreased to 16.8 ± 1.9 pmol of GSH/10^6 cells, which was twice lower than in normozoospermic men with proven fertility. In patients with asthenozoospermia and oligoasthenozoospermia the GSH level was 17.5 ± 1.8 and 18.3 ± 2.6 pmol of GSH/10^6 cells that was 1.9-fold lower than control group. In leucocytospermic patients the GSH level was 27.1 ± 2.2 pmol of GSH/10^6 cells which was 1.3-fold lower than in patients with normozoospermia, but these changes were not significant.

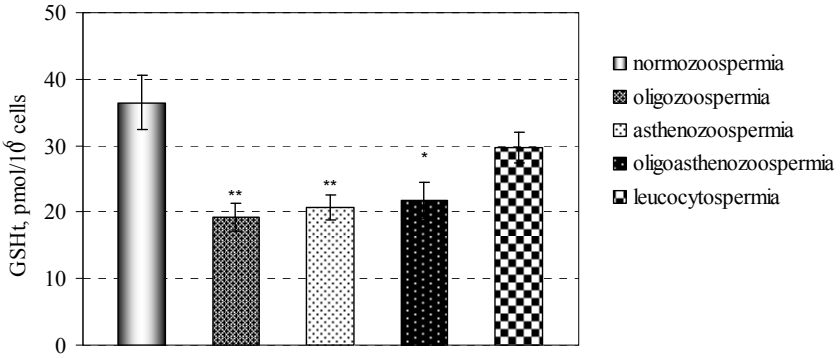


Fig. 1. The content of total glutathione in the sperm cells of infertile men with different forms of pathospermia: the results are presented as the mean ± standard deviation of the mean, n = 10–33; ANOVA was used; asterisks indicate the values that are significantly different from control group (normozoospermia); * – $P < 0.05$, ** – $P < 0.01$, *** – $P < 0.001$ relative to the control group

The GSSG content in sperm cells of normozoospermic and oligozoospermic men was 2.5 ± 0.3 pmol GSSG/10^6 cells (Fig. 3). The content of oxidized forms of glutathione in spermatozoa in infertile men of other studied groups was increased, but these changes were not statistically significant. Patients with astheno-, oligoasthenozoospermia and leucocytospermia showed 1.3-, 1.4- and 1.1-fold higher GSSH content (3.3 ± 0.4, 3.4 ± 0.5 and 2.7 ± 0.3 pmol of GSSG /10^6 cells correspondingly) than did control subjects.

In addition to determination of GSHt, GSH and GSSG, the ratio of reduced to oxidized glutathione (GSH/GSSG ratio) was calculated from these measurements (Fig. 4). It is a more sensitive indicator of pro- and antioxidant status. The GSH/GSSG ratio in patients with normozoopermia was 15.2 ± 1.9. The ratio of the reduced to oxidized form of glutathione in the spermatozoa of men with oligo-, astheno- and oligoasthenozoospermia was much lower than in men with normozoospermia (7.2 ± 0.9, 6.1 ± 0.9 and 6.4 ±

1.2 respectively). The GSH/GSSG ratio is somewhat lower in patients with leukocytospermia (12.1 ± 0.9). The ratio of the reduced to oxidized form of glutathione indicates a decrease in total capacity of the glutathione system in sperm cells of men with decreased fertilizing potential. The glutathione peroxidase activity was significantly decreased in patients with all forms of pathospermia compared with healthy men with proven fertility (Fig. 5). The enzyme activity in patients with oligozoospermia was 44% and in patients with astenozoo- and oligoastenozoospermia 35% of that in normozoospermic men. The most significant changes in glutathione peroxidase activity were observed in infertile men with leucocytospermia (26% of activity in normozoospermic men).

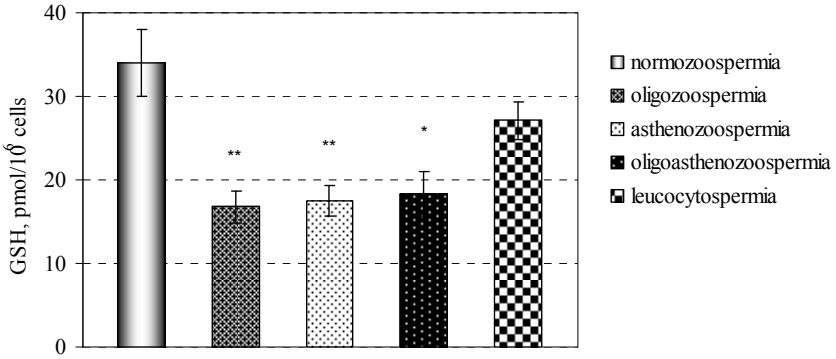


Fig. 2. The content of reduced glutathione in sperm cells of infertile men with different forms of pathospermia: see Fig. 1 description

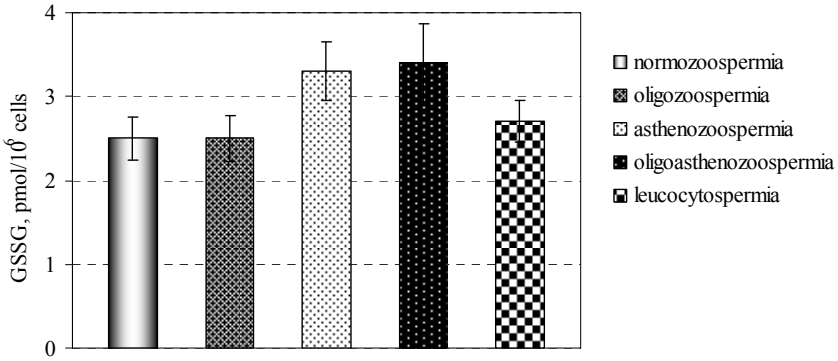


Fig. 3. The content of oxidized glutathione in sperm cells of infertile men with different forms of pathospermia: see Fig. 1 description

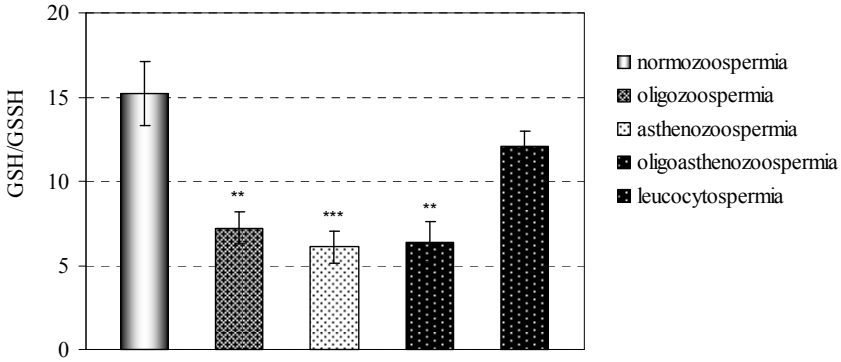


Fig. 4. The GSH/GSSG ratio in sperm cells of infertile men with different forms of pathospermia: see Fig. 1 description

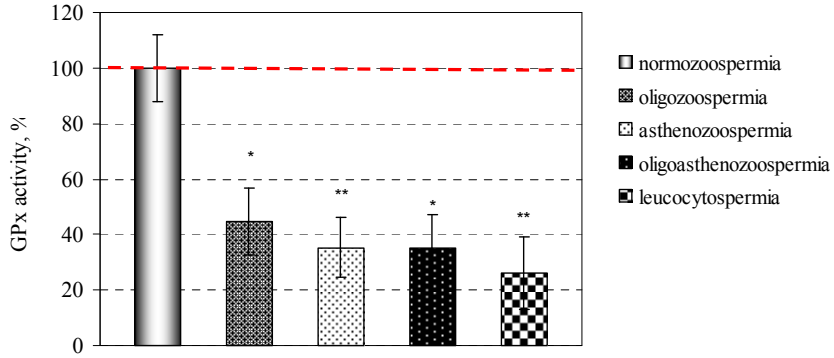


Fig. 5. Glutathione peroxidase activity in sperm cells of infertile men with different forms of pathospermia: see Fig. 1 description

Discussion

Other findings about GSH level in sperm cells are controversial. Overall, our results are consistent with several other studies. In particular, it was shown that GSH content in sperm cells of patients with oligozoospermia was significantly lower than in control group (Ochsendorf et al., 1998). Reduced intracellular GSH was observed in sperm of infertile men, but these differences were not statistically

significant (Garrido et al., 2004). However, the same study found the presence of a moderate direct correlation between the GSH content and disturbance of sperm morphology. In addition, it was shown that intracellular GSH content in sperm cells of in smokers was lower compared with nonsmokers (Viloria et al., 2010).

However, conflicting data have been obtained in other studies. Ebisch et al. (2007) revealed high GSH content in spermatozoa of subfertile men compared to fertile men. Lewis et al. (1997) showed that the content of sulfhydryl compounds was significantly higher in spermatozoa from men with asthenozoospermia than in men with normozoospermia. According to the researchers the increased synthesis of thiol compounds is a compensatory mechanism to protect cell from oxidative damage. Aydemir et al. (2007) found no statistically significant differences in the values of intracellular GSH between patients with idiopathic infertility and healthy men.

Conflicting data have also been obtained about GSH content in seminal plasma of men with infertility. A large number of studies have found no statistically significant differences between GSH content in seminal plasma of fertile and infertile men (Aydemir et al., 2007; Wong et al., 2001; Ebisch et al., 2006). Hesham et al. (2008) established a significant reduction of GSH in seminal plasma of men with azoospermia and oligozoospermia. A decrease in GSHt and GSH content was found in seminal plasma of men with asthenozoospermia. However, the same study showed a slight increase in GSH level in patients with combined form of pathospermia (oligoasthenozoospermia) with simultaneous decrease of oxidized form (GSSG) (Atig et al., 2012). In men with violations of spermatogenesis by oligozoospermia, the GSH content was decreased, but these differences were not statistically significant (Atig et al., 2012). A reduction of GSH was found in seminal plasma in men with azoospermia and oligozoospermia (Bhardwaj et al., 2000). The GSH/GSSG ratio was lower in seminal plasma of men with idiopathic infertility and varicocele than in healthy men (Micheli et al., 2016). On the contrary, other studies found an increase in GSH content in seminal plasma of men with azoospermia (Ochsendorf et al., 1998). Also, Raijmakers et al. (2003) showed that GSH content was higher in seminal plasma of fertile than in subfertile men.

These differences can be explained by the controversial inclusion and exclusion criteria for patients in the studied groups, different analytical approaches (techniques), patients' lifestyle, their habitats, health, diet, origin etc.

Taking into account that GSH not only protects cells from toxic free radicals, but in general determines oxidation-reduction characteristics of intracellular environment, reduction in GSH content indicates a decrease in antioxidant capacity. This leads to increased ROS production, further depletion of the pool of bioantioxidants and increased lipid peroxidation, which causes violations of the structure and functions of spermatozoa.

Reduced glutathione plays a leading role in the antioxidant defense (Korzhov and Zhadan, 2007). Its antioxidative properties are due to a direct interaction with ROS and functioning of glutathione-dependent enzymes such as glutathione peroxidase and glutathione transferase. Glutathione peroxidase catalyzes the reduction of H_2O_2 or organic hydroperoxide, using reduced glutathione. As it is well known, glutathione peroxidase is a key antioxidant enzyme which regulates ROS levels and protects sperm cells from lipid peroxidation and oxidative stress. In fact, we showed that glutathione peroxidase activity was significantly decreased in patients with all forms of pathospermia compared with healthy men with normozoospermia.

The intensity of free radical reactions and processes depends on the concentration of oxygen and the functioning of the enzymatic and nonenzymatic antioxidant systems. In our previous studies (Onufrovych et al., 2016; Fafula et al., 2017) we found depletion of antioxidant systems in particular inhibition of glutathione peroxidase, glutathione reductase and glutathione transferase in spermatozoa of infertile men. Despite the fact that the enzymatic component of the antioxidant protection system is more sensitive to changes in prooxidant-antioxidant balance than nonenzymatic, both systems are closely related. On the one hand, nonenzymatic antioxidants are substrates of reactions catalyzed by antioxidant enzymes. On the other hand, as a result of enzymes work the number nonenzymatic factors constantly increases and their level depends on physiological needs of the cell. Therefore, it the dynamic balance between content of nonenzyme components and activity enzymatic systems is essential.

In addition, the reduction of GSH in sperm cells of infertile men may be due to low activity of glutathione reductase, which indicates the inactivation of GSH regeneration. It is well known that glutathione reductase uses NADPH as a restored equivalent, the content of which is reduced under conditions of oxidative stress (De Minicis and Brenner, 2008). It is also known that GSH/GSSG ratio decreases rapidly under oxidative stress, leading to structural defects and functional changes unless NADPH-dependent of GSH regeneration occurs (Mendez et al., 2016).

It should be noted that GSH/GSSG ratio is significantly higher in leucocytospermic patients than in other pathologies. According to other researchers (Micheli et al., 2016) who found similar results in infertile men with infectious factor, a slight decrease in GSH level and maintaining GSH/GSSG balance is "sparing effect" caused by another nonenzymatic antioxidant – ascorbic acid (vitamin C). However, this effect is not a sufficiently powerful mechanism to neutralize ROS hyperproduction and development of oxidative stress which is evidenced by extremely high content of thiobarbituric acid reactive substances in sperm cells of patients with leucocytospermia (Fafula et al., 2017). The consequence of reduction of GSH can be H_2O_2 accumulation enhanced with subsequent production of hydroxile radical and damage of macromolecular structures. In particular, it was shown that prolonged intensification of lipid peroxidation is accompanied by the accumulation of malondialdehyde and 4-hydroxynonenal that can bind to DNA and proteins, modifying their structure and disrupting the function (Hubskyi, 2015; Spickett, 2013). GSSH reacts with thiol groups of proteins with production of mixed disulfides that can alter the catalytic properties of enzymes which is manifested by their ability to maintain adaptive response to stress (Smirnov and Suhovskaya, 2014).

Thus, the changes in GSH content and activities of enzymes of its metabolism found in sperm cells (Onufrovych et al., 2016; Fafula et al., 2017) in patients with pathospermia may be interpreted as a response to development of oxidative stress. Decrease in intracellular GSH level and inhibition of glutathione peroxidase leads to overproduction of ROS which results in oxidative stress and injury in sperm cells.

Inhibition of antioxidant enzymes activities, a decrease in GSH and enhanced lipid peroxidation indicate an irreversible destructive changes (Mishchuk and Stolyar, 2008). Thus, the destabilization of the glutathione system promotes even greater intensification of lipid peroxidation processes and destruction of spermatozoa. Sperm motility is associated with excessive oxidation of sulfhydryl groups that are part of GSH (Atig et al., 2012). GSH is localized mainly in the middle part and tail of spermatozoon, which ensure its mobility (Eskiocak et al., 2005).

Determination of GSH and the GSH/GSSG ratio can be used as an additional biochemical indicator for the assessment of men's potential to father children. Disturbance in the glutathione system in spermatozoa is a one of the pathogenetic mechanisms leading to infertlity that must be considered when using antioxidants in the treatment of male infertility.

Conclusions

Under conditions of pathospermia the reduced glutathione content in spermatozoa decreased, which led to depletion of reduction potential of the glutathione antioxidant system. Redistribution between oxidized and reduced forms of glutathione can be caused by depletion of intracellular GSH stores and intensification of lipid peroxidation processes.

Support and acknowledgements

The publication contains the results of studies conducted under the President's of Ukraine grant for competitive projects (project No Ф63/97-2016 from 10.08.2016 "Molecular biological regulatory mechanisms of disturbance of fertilizing ability spermatozoa and the development of new immuno-biochemical diagnostic methods of fertility in men" (scientific supervisor – Doc. Sci. D. Vorobets) of the State Fund for Fundamental Research (The President's Order No 97/2016-рп dated: April 13, 2016).

References

Anderson, M. E. (1985). Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. Methods in Enzymology, 113, 548–555.

Atig, F., Raffa, M., Habib, B.-A., Kerkeni, A., Saad, A., & Ajina, M. (2012). Altered antioxidant status and increased lipid perxidation in seminal plasma of Tunisian infertile men. International Journal of Biological Sciences, 8(1), 139–149.

Atig, F., Raffa, M., Habib, B.-A., Kerkeni, A., Saad, A., & Ajina, M. (2012). Impact of seminal trace element and glutathione levels on semen quality of Tunisian infertile men. BMC Urology, 12, 6.

Aydemir, B., Onaran, I., Kiziler, A. R., Alici, B., & Akyolcu, M. C. (2007). Increased oxidative damage of sperm and seminal plasma in men with idiopathic infertility is higher in patients with glutathione S-transferase Mu-1 null genotype. Asian Journal of Andrology, 9(1), 108–115.

Bhardwaj, A., Verma, A., Majumdar, S., & Khanduja, K. L. (2000). Status of vitamin E and reduced glutathione in semen of oligozoospermic and azoospermic patients. Asian Journal of Andrology, 2(3), 225–228.

De Minicis, S., & Brenner, D. A. (2008). Oxidative stress in alcoholic liver disease: Role of NADPH oxidase complex. Journal of Gastroenterology and Hepatology, 1, 98–103.

Ebisch, I. M. W., Peters, W. H. M., Thomas, C. M. G., Wetzels, A. M., Peer, P. G., & Steegers-Theunissen, R. P. (2006). Homocysteine, glutathione and related thiols affect fertility parameters in the subfertile couple. Human Reproduction, 21, 1725–1733.

Eskiocak, S., Gozen, A. S., Yapar, S. B., Tavas, F., Kilic, A. S., & Eskiocak, M. (2005). Glutathione and free sulphydryl content of seminal plasma in healthy medical students during and after exam stress. Human Reproduction, 9, 2595–6000.

Fafula, R. V., Onufrovych, O. K., Vorobets, D. Z., Iefremova, U. P., & Vorobets, Z. D. (2017). Glutathione antioxidant protection system in ejaculated spermatozoa of infertile men with different forms of pathospermia. Studia Biologica, 11(1), 17–24.

Garrido, N., Meseguer, M., Alvarez, J., Simón, C., Pellicer, A., & Remohí, J. (2004). Relationship among standard semen parameters, glutathione peroxidase / glutathione reductase activity, and mRNA expression and reduced glutathione content in ejaculated spermatozoa from fertile and infertile men. Fertility and Sterility, 82(3), 1059–1066.

Griffith, O. W. (1980). Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. Analytical Biochemistry, 106, 207–212.

Hesham, N., Moemen, L. A., & Abu Elela, M. H. (2008). Studing the levels of malondialdehyde and antioxidant parameters in normal and abnormal human seminal plasma. Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 2(3), 773–778.

Hubskyi, Y. I. (2015). Smert kletki: Svobodnie radically, necros, apoptos [Cell death: Free radicals, necrosis, apoptosis]. Nova Knyga, Vynnyca (in Russian).

Iskra, R. J. (2011). Stan glutationovoi lanky antioxidantnoi systemy v riznyh organah i tkanynah szuriv za dii nanoacqucytratu chromu [State of glutathione component of the antioxidant system in different organs and tissues of rats under the influence of chromium nanoaquarcitate]. Experimental and Clinical Physiology and Biochemistry, 3, 28–33 (in Ukrainian).

Iskra, R. J. (2011). State of glutathione component of the antioxidant system in different organs and tissues of rats under the influence of chromium nanoaquarcitate. Experimental and Clinical Physiology and Biochemistry, 3, 28–33.

Kalinina, E. V., Chernov, N. N., & Novichkova, M. D. (2014). Role of glutathione, glutathione transferase and glutaredoxin in regulation of redox-dependent processes. Biochemistry, 79(13), 1562–1583.

Korzhov, V. I., & Zhadan, V. N. (2007). Rol systemy glutationa v processah detoxikacii i antioxidantnoi zaszyty [Role of the glutathione system in the processes of detoxification and antioxidant protection]. Journal of Academy of Medical Sciences of Ukraine, 13, 3–19 (in Russian).

Koval, T. V., Nazarova, O. O., & Matyshevska, O. P. (2008). Zmina vmistu glutationu v timocytah szuriv za indukcii apoptosu pid vplyvom H_2O_2 abo radiacii [Change in glutathione content in rat thymocytes under apoptosis induced by H_2O_2 or X irradiation]. Ukrainian Biochemical Journal, 80(2), 114–119 (in Ukrainian).

Kurilova, L. C., Krutetskaya, Z. I., Lebedev, O. E., & Antonov, V. H. (2008). Vliyanie okislennogo glutationa i ego farmokologicheskogo analoga prepara-ta glutoksim na vnitrikletochnuyu koncentraciu Ca^{2+} v macrofagah [The effect of oxidized glutathione and its pharmacological analogue, glutoxim, on intracellular Ca^{2+} concentration in macrophages]. Cytology, 50(5), 452–461 (in Russian).

Lewis, S. E., Sterling, E. S., Young, I. S., & Thompson, W. (1997). Comparison of individual antioxidants of sperm and seminal plasma in fertile and infertile men. Fertility and Sterility, 67(1), 142–147.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenolreagent. Journal of Biological Chemistry, 193, 265–275.

Mendez, I., Vázquez-Martínez, O., Hernández-Muñoz, R., Valente-Godínez, H., & Díaz-Muñoz, M. (2016). Redox regulation and pro-oxidant reactions in the physiology of circadian systems. Biochemie, 124, 178–186.

Micheli, L., Cerretani, D., Collodel, G., Menchiari, A., Moltoni, L., Fiaschi, A. I., & Moretti, E. (2016). Evaluation of enzymatic and non-enzymatic antioxidants in seminal plasma of men with genitourinary infections, varicocele and idiopathic infertility. Andrology, 4(3), 456–464.

Mishchuk, O. V., & Stolyar, O. B. (2008). Vpliv pesticidu acetamipridu na biochimichni pokaznyky u tkanynah prisnovodnogo dvostulkovogo moluska *Anodonta cygnea* L. (Unionidae) [The effect of the pesticide acetamiprid on the status of biochemical markers in tissues of freshwater bivalve mussels *Anodonta cygnea* L. (Unionidae)]. Ukrainian Biochemical Journal, 80(5), 117–124 (in Ukrainian).

Ochsendorf, F. R., Buhl, R., Bästlein, A., & Beschmann, H. (1998). Glutathione in spermatozoa and seminal plasma of infertile men. Human Reproduction, 13(2), 353–359.

Onufrovych, O. K., Fafula, R. V., Nakonechnyi, I. A., Vorobets, D. Z., Iefremova, U. P., & Vorobets, Z. D. (2016). Activnist glutation-zalezhyh enzymiv spermatozoidiv za umov patospermii [Activity of glutathione-dependent enzymes in spermatozoa in patients with pathospermia]. Medical and Clinacal Chemistry, 18(4), 5–10 (in Ukrainian).

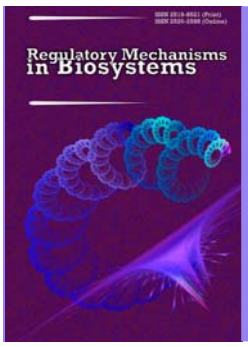
Raijmakers, M. T., Roelofs, H. M., Steegers, E. A., Steegers-Theunissen, R. R., Mulder, T. P., Knapen, M. F., Wong, W. Y, & Peters, W. H. (2003). Glutathione and glutathione S-transferases A1-1 and P1-1 in seminal plasma may play a role in protecting against oxidative damage to spermatozoa. Fertility and Sterility, 79(1), 169–172.

Smirnov, L. P., & Suhovskaya, I. V. (2014). Rol glutationa v funkcionirovanii system antioxidantnoi zaszyty i biotransformacii (Obzor) [Role of glutathione in antioxidant protection and biotransformation (Review)]. The Scientists Notes of Petrozavodsk State University. Biological Science, 143, 34–40 (in Russian).

Spickett, C. M. (2013). The lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal: advances in chemistry and analysis. Redox Biology, 1(1), 145–152.

Viloria, T., Meseguer, M., Martínez-Conejero, J. A., O'Connor, J. E., Remohí, J., Pellicer, A., & Garrido, N. (2010). Cigarette smoking affects specific sperm oxidative defenses but does not cause oxidative DNA damage ininfertile men. Fertility and Sterility, 94(2), 631–637.

Wong, W. Y., Flik, G., Groenen, P. M., Swinkels, D. W., Thomas, C. M., Copius-Peereboom, J. H., Merkus, H. M., & Steegers-Theunissen, R. P. (2001). The impact of calcium, magnesium, zinc, and copper in blood and seminal plasma on semen parameter in men. Reproductive Toxicology, 15(2), 131–136.



Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(2), 162–168
doi: 10.15421/021726

Impact of gibberelic acid and tebuconazole on formation of the leaf system and functioning of donor – acceptor plant system of solanaceae vegetable crops

V. H. Kuryata, V. V. Rogach, O. I. Buina, O. V. Kushnir, O. V. Buinyi

Mykhailo Kotsiubynskyi Vinnytsia State Pedagogical University, Vinnytsia, Ukraine

Article info

Received 21.03.2017
Received in revised form 25.04.2017
Accepted 29.04.2017

Mykhailo Kotsyubynskiy Vinnitsya State Pedagogical University, Ostrozhskogo Str., 32, Vinnitsa, 21000, Ukraine.
Tel.: +38-098-59-44-832.
E-mail: rogachv@ukr.net

Kuryata, V. H., Rogach, V. V., Buina, O. I., Kushnir, O. V., & Buinyi, O. V. (2017). Impact of gibberelic acid and tebuconazole on formation of the leaf system and functioning of donor – acceptor plant system of solanaceae vegetable crops. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(2), 162–168. doi:10.15421/021726

We studied the comparable effect of gibberelic acid and tebuconazole on morphogenesis, mesostructure formation and redistribution of flows in sweet peppers and tomatoes. It has been found that the use of gibberelic acid and tebuconazole retardant during budding leads to increased plant productivity due to optimization of the structure and operation of the plants' leaf apparatus. It was established that both gibberelic and antigibberelic tebuconazole drug stimulated the formation and functioning of the photosynthetic apparatus of peppers and tomatoes, but the mechanisms of this regulation were different. Increased photosynthetic activity of plants under the influence of gibberellin was determined primarily by the formation of more leaves and total leaf surface. When using tebuconazole retardant there was a significant restructuring of the organization of leaf mezostructure: the leaves were thickened by chlorenchyma proliferation, there was an increase in the volume of columnar parenchyma cells and linear dimensions of spongy parenchyma leaf cells. The surface density of leaves significantly increased, the chlorophyll content and nitrogen content (especially protein) also increased, compared with control variants and variants using gibberelin. Such a profound restructuring of the photosynthetic apparatus in plants under the actions of tebuconazole led to a significant increase in donor leaves function of peppers and tomatoes, which is an indicator of the growth of net productivity of photosynthesis – the highest among all the variants of the experiment. The results also show that increasing the chlorophyll phytocenotic index was more significant than the increase of leaf index: the tomatoes under the actions of tebuconazole had a lower leaf index than in control options, but due to a higher chlorophyll index the crop productivity increased.Since during the fruiting period the costs of assimilates to the growth of vegetative organs are greatly reduced, optimization of photosynthetic apparatus in pepper and tomato plants led to the laying of more fruit per plant and increasing crop yield. The analysis of the mass ratio of the researched vegetative and fruit plants shows that the mass fraction of fruit (an acceptor sphere of plants during fruiting) under the action of both drugs increased. Thus in both variants of the experiment both the mass fraction and donor assimilates of leaves was higher. Apart from the main source of assimilates – the processes of photosynthesis, which intensified due to the formation of a larger area of leaf surface (variant with gibberelin) or optimization of mesostructure (variant with tebuconazole) it is probable that the formation and growth of the embryo occurred in part due to reutilization of carbohydrates from the vegetative plant organs in carpogenesis processes.

Keywords: donor – acceptor system; gibberellins; retardants; photosynthesis; *Capsicum annuum* L.; *Lycopersicum esculentum* L.

Вплив гіберелової кислоти та тебуконазолу на формування листкового апарату та функціонування донорно-акцепторної системи рослин овочевих пасльонових культур

В. Г. Кур'ята, В. В. Рогач, О. І. Буйна, О. В. Кушнір, О. В. Буйний

Вінницький державний педагогічний університет імені Михайла Коцюбинського, Вінниця, Україна

Оцінено вплив гіберелової кислоти та тебуконазолу на морфогенез, формування мезоструктури та перерозподіл потоків асимілятів у рослинах перцю солодкого та томату їстівного. Застосування у період бутонізації гіберелової кислоти та тебуконазолу викликає підвищення продуктивності культур внаслідок оптимізації структури та функціонування їх листкового апарату. Як гіберелін, так і антигібереліновий препарат тебуконазол стимулювали формування та функціонування фотосинтетичного апарату перцю та томатів, однак шляхи цієї регуляції різні. Посилення фотосинтетичної активності рослин за впливу гібереліну визначалося в першу чергу формуванням більшої кількості листків і загальної площі листкової поверхні. Застосування тебуконазолу зумовлювало суттєву перебудову мезоструктури листків, їх потовщення за

рахунок розростання хлоренхіми, збільшення об'єму клітин стовпчастої паренхіми та лінійних розмірів клітин губчастої паренхіми листків. При цьому підвищувалася питома поверхнева щільність листків, суттєво зростав уміст хлорофілів та вміст азоту (у першу чергу білкового) порівняно з контролем і варіантом із застосуванням гібереліну. Така глибока перебудова фотосинтетичного апарату рослини за дії тебуконазолу спричинювала суттєве зростання донорної функції листків перцю та томатів, показником чого є зростання чистої продуктивності фотосинтезу – найвищої серед усіх варіантів досліду. Отримані результати свідчать також про те, що збільшення хлорофільного індексу виявилося вагомішим фактором, ніж збільшення листкового індексу: у томатів за дії тебуконазолу листковий індекс був нижчим, ніж у контролі, однак завдяки вищому хлорофільному індексу урожайність насаджень збільшилася. Оскільки у період плодоношення витрати асимілятів на ріст вегетативних органів суттєво зменшуються, оптимізація фотосинтетичного апарату рослин перцю та томатів сприяла закладанню більшої кількості плодів на рослині та підвищенню урожайності культур. Аналіз співвідношення мас вегетативних органів і плодів дослідних рослин свідчить, що масова частка плодів (акцепторна сфера рослини під час плодоношення) за дії обох препаратів зросла. При цьому в обох варіантах досліду вищою була також масова частка донорів асимілятів – листків. Крім основного джерела асимілятів – процесів фотосинтезу, які посилювалися внаслідок формування більшої площі листкової поверхні (варіант із гібереліном), або оптимізації мезоструктури (варіант із тебуконазолом), формування та ріст плодів відбувалися, імовірно, частково за рахунок реутилізації вуглеводів із вегетативних органів рослини на процеси карпогенезу.

Ключові слова: донорно-акцепторна система; гіберелін; ретардант; фотосинтетичний апарат; *Capsicum annuum* L.; *Lycopersicum esculentum* L.

Вступ

Важливе завдання сучасної фітофізіології – розроблення методів і технологій, які б забезпечили повніше використання рослиною енергії світла для інтенсифікації синтезу асимілятів та спрямування їх до господарсько цінних тканин і органів. Один із ключових підходів до вирішення питання оптимізації продукційного процесу сільськогосподарських рослин – регуляція донорно-акцепторних відносин, зокрема, шляхом перерозподілу потоків асимілятів до господарсько важливих органів (плодів, коренеплодів тощо). Основні закономірності функціонування донорно-акцепторних відносин (концепції "source-sink") вивчаються під час аналізу співвідношення інтенсивності росту та фотосинтезу, де процеси росту виступають як основний акцептор, а фотосинтез – як донор асимілятів (Rogach and Rogach, 2015; Yu et al., 2015; Kuryata et al., 2016; Rogach et al., 2016). Регуляція ростових процесів – один із дієвих засобів підвищення урожайності сільськогосподарських культур шляхом змін донорно-акцепторних відносин у рослині (Poprotska and Kuryata, 2017), поліпшення якості аграрної продукції (Kuryata and Hodanic'ka, 2012) та підвищення стійкості культурних рослин до несприятливих абіотичних та біотичних чинників середовища завдяки мобілізації потенційних можливостей рослинного організму (Khan et al., 2012; Tae-Yun and Jung-Hee, 2012; Matysiak and Kaczmarek, 2013; Muhammad and Muhammad, 2013; Saeidi-Sar et al., 2013; Yang et al., 2016).

Перспективний напрям регуляції ростових процесів – застосування нативних фітогормонів та синтетичних регуляторів росту – аналогів або модифікаторів дії фітогормонів. Із практичною метою широко застосовують ріст стимулювальні гіберелінові препарати (Ribeiro et al., 2012; Wang et al., 2013; Poprotska and Kuryata, 2017), а також їх антагоністи – ретарданти, які блокують синтез або утворення гормон-рецепторного комплексу, внаслідок чого зменшується інтенсивність лінійного росту рослин (Ribeiro et al., 2012; Rogach et al., 2016). У літературі міститься інформація про застосування гібереліну та антигібереліновых препаратів із метою оптимізації продукційного процесу шляхом анатомо-морфологічних та фізіолого-біохічіних змін у зерново-круп'яних (Muhammad and Muhammad, 2013; Wang et al., 2016; Yang et al., 2016), зернобобових (Saeidi-Sar et al., 2013; Yan et al., 2013; Golunova, 2015; Yan et al., 2015), олійних (Kuryata and Hodanic'ka, 2012; Kumar et al., 2013; Matysiak and Kaczmarek, 2013; Kuryata and Polyvanyj, 2015), овочевих (Khan et al., 2012; Tae-Yun and Jung-Hee, 2012; Pavlista, 2013; Tkachuk, 2015), технічних (Mohammad and Mohammad, 2013), лікарських і декоративних (Zhang et al., 2013; Sardoei et al., 2014; Sugiura et al., 2015) культур.

Нативні гормони-стимулятори та їх синтетичні аналоги застосовують у рослинництві з метою інтенсифікації гісто- та морфогенезу, прискорення проліферації та диференціації клітин, внаслідок чого формується розгалужена коренева система, змінюються анатомо-морфологічні, мезоструктурні та фізіолого-біохімічні особливості листка. Такі зміни зумовлюють формування потужного асиміляційного апарату, здатного забезпечити активний синтез пластичних сполук, потік яких у більшій кількості буде спрямований до генеративних органів (Kuryata and Poproc'ka, 2016; Poprotska and Kuryata, 2017). Дія гібереліновпов'язана з підвищенням активності різних груп меристематичних тканин і формуванням потужнішого рослинного організму, внаслідок посилення поділу та розтягування клітин (Rogach and Rogach, 2015). Крім цього гібереліни затримують старіння листків та індукують закладання більшої кількості квіток на рослині.

Sugiura et al. (2015) показали, що гіберелова кислота збільшує біомасу листя та активізує фотосинтетичні процеси у *Polygonum cuspidatum*. Гіберелова кислота сприяє накопиченню сухої речовини рослинами льону, зростанню чистої продуктивності фотосинтезу, збільшенню урожайності насіння, підвищенню його олійності та виходу волокон (Mohammad and Mohammad, 2013). Цей самий препарат підвищує стійкість проростків звичайних бобів (Saeidi-Sar et al., 2013), пшениці (Muhammad and Muhammad, 2013), рису (Khan et al., 2012; Wang et al., 2013) та огірка (Khan et al., 2012) до засолення, підвищує їх продуктивність.

Перебудова гормонального комплексу за впливу ретардантів та відповідне інгібування апікального домінування спричиняли важливе з погляду регулювання продуктивності рослин посилення галуження стебла. Завдяки посилення галуження стебла цих культур закладається більша кількість листків, квітів і плодів. Застосування хлормекватхлориду на рослинах сої зумовило гальмування ростових процесів, що спричинило закладання більшості кількості плодів, підвищення вмісту олії та поліпшення її якості (Golunova, 2015). Yan et al. (2013) встановили, що уніконазол одночасно з гальмуванням лінійних розмірів рослин зумовлює посилення розвитку кореневої системи. Обробка насіння сої цим препаратом окрім гальмування росту зумовила затримання процесів старіння листків, збільшення маси сухої речовини рослин і показника чистої продуктивності фотосинтезу. Одночасно препарат збільшує вміст хлорофілу в листках, зменшує площу листя та підвищує урожайність культури (Yan et al., 2015). Оптимізацію фотосинтетичних процесів під час гальмування росту рослин вігни спостерігали за впливу ССС та ГМК (Sukul et al., 2014). Тебуконазол гальмує ріст рослин кукурудзи, але підвищує схожість та стійкість рослин до холодового стресу. За дії препарату зростає вміст фотосинтетичних пігментів у листках культури (Yang et al., 2016). Суміш етиленпродуценту DCPTA та четвертинної амонієвої солі ССС зменшує висоту рослин за рахунок зменшення довжини міжвузлів. Суміш антигібереліновых препаратів збільшує також площу листя та масу сухої речовини листків, вміст у них хлорофілу. Такі зміни сприяли підвищенню продуктивності культури (Wang et al., 2016).

Інгібітори гібереліну також широко застосовують на олійних культурах. Для озимого ріпаку негативним є надмірний розвиток вегетативної маси восени, що погіршує перезимівлю культури та зменшує її продуктивність на наступний рік. Обробка культури озимого ріпаку тебуконазолом і флуцілазолом зменшує швидкість ростових процесів та приріст вегетативної маси з одночасним збільшенням урожайності насіння,

причому вміст олії в насінні та її якісні характеристики не змінюються (Matysiak and Kaczmarek, 2013). Застосування паклобутразолу зменшує висоту рослин, площу їх листя, але збільшує вміст хлорофілу в листках і врожайність насіння за рахунок посилення галуження стебла та збільшення кількості стручків (Kumar et al., 2012). Обробка маку олійного фолікуром на фоні зменшення лінійних розмірів рослин позитивно впливає на показники листкового апарату рослин. Автори встановили зростання кількості листків на рослині, їх маси та площі листкової поверхні. За дії ретарданту зростає вміст хлорофілу в листках, підвищується чиста продуктивність фотосинтезу, одночасно поліпшуються ценотичні показники посівів (листковий і хлорофільний індекси). Зміни листкового апарату стали передумовою підвищення урожайності культури (Kuryata and Polyvanyj, 2015). Подібні зміни листкового апарату зафіксовано в льону олійного у разі застосування хлормекватхлориду. Ретардант зменшував лінійні розміри рослин, потовщував стебло, збільшував кількість листків, масу їх сухої речовини та площу листя. Хлормекватхлорид збільшував об'єм клітин стовпчастої паренхіми листка та розміри клітин губчастої паренхіми, а також збільшував кількість і об'єм хлоропластів обох тканин хлоренхіми. За дії препарату зростала чиста продуктивність фотосинтезу, збільшувалася урожайність насіння та вихід олії із нього, поліпшувалися якісні характеристики олії (Kuryata and Hodanic'ka, 2012). Аналогічні зміни зафіксовані у разі застосування інгібіторів росту ретардантнтного типу також на інших олійних сільськогосподарських культурах (Kuryata and Poproc'ka, 2016).

Літературні джерела містять інформацію про вплив ретардантів на листковий апарат і продуктивність лікарських і декоративних рослин. Зокрема, хлорхолінхлорид збільшував фотосинтетичну активність листків гінкго дволопатевого за рахунок зростання вмісту хлорофілу у листках; також зростав вміст розчинних цукрів і амінокислот, що поліпшувало якість сировини, її лікувальні властивості (Zhang et al., 2013). Цей самий препарат змінював активність накопичення вуглеводів листками рослин коноплі (Sardoei et al., 2014). У рослин пуансетії флурпірамідол зменшував лінійні розміри та збільшував вміст хлорофілу в листках (Pobudkiewicz, 2014). Інший триазолпохідний препарат – уніконазол – на фоні зменшення біомаси листків рослин *Polygonum cuspidatum* збільшував відношення біомаси до площі листкової поверхні (Sugiura et al., 2015).

Овочеві культури мають велике господарське значення, тому вивчення процесів регуляції їх росту та розвитку за допомогою антигібереліновых препаратів та гібереліну – актуальне питання сучасної фізіології рослин. Дані літератури свідчать, що обробка картоплі паклобутразолом зменшує лінійні розміри пагона та потовщує його. Препарат зменшує площу листя, але збільшує товщину листків та масу їх сирої та сухої речовини. За дії паклобутразолу поліпшується мезоструктурні показники листка – об'єм клітин стовпчастої паренхіми та розміри клітин губчастої паренхіми. Застосування препарату зумовило зростання чистої продуктивності фотосинтезу та урожайності культури (Tkachuk, 2015). Урожайність картоплі також зростає після обробки ССС (Pavlista, 2013). В іншої бульбової культури – маніоки їстівної – паклобутразол зменшує висоту рослин та листковий індекс, але збільшує масу сухої речовини цілої рослини за рахунок зростання маси бульб. За дії препарату у цієї тропічної культури зростає вміст крохмалю у бульбах (Panyapruek et al., 2016). В огірків інший триазолпохідний ретардант – гексаконазол – зменшує довжину стебла, масу його сирої та сухої речовини, площу листя, але збільшує товщину листкових пластинок, вміст хлорофілу в них та підвищує стійкість культури до дії ультрафіолетового опромінення за рахунок активізації антиоксидантних ферментів та збільшення вмісту аскорбінової кислоти у листках (Tae-Yun and Jung-Hee, 2012).

Ми встановили підвищення врожайності за дії різнонаправлених регуляторів росту в овочевих культур роду *Solanum*. Зокрема, обробка гібереловою кислотою та антигібереліновими препаратами тебуконазолом і хлормекватхлоридом позитивно впливає на листковий апарат рослин картоплі та баклажанів, що оптимізує продуктивність цих культур (Rogach and Rogach, 2015; Kuryata et al., 2016; Rogach et al., 2016).

Отже, численні дані літератури свідчать, що екзогенно застосовані гібереліни та їх антагоністи (ретарданти) достатньо часто викликають один і той самий результат – оптимізацію продукційного процесу сільськогосподарських культур і підвищення їх урожайності. Разом із цим, у літературі практично відсутні системні дослідження регуляції швидкості росту, морфогенезу, формування фотосинтетичного апарату за дії гібереліну та антигібереліновых препаратів, залишаються невстановленими складові системи регуляції донорно-акцепторних відносин у рослинах за дії цих різнонаправлених препаратів.

У зв'язку з викладеним, мета цього дослідження – встановити роль морфологічної та мезоструктурної складових у регуляції донорно-акцепторних відносин рослин томатів і перців за дії гіберелової кислоти та антигібереліновых препарату тебуконазолу.

Матеріал і методи досліджень

Польові дрібноділянкові досліди закладали на землях СФГ «Бержан П. Г.» (с. Горбанівка Вінницького району Вінницької області) у вегетаційні періоди 2013–2015 років. Розсаду перців сорту Антей висаджували стрічковим способом за формулою 80 + 50 + 50 × 25, а томатів сорту Бобкат – 80 + 50 + 50 × 50. Вносили мінеральні добрива $N_{50}P_{40}K_{30}$. Площа ділянок – 33 м^2, повторність – п'ятикратна. Рослини обробляли вранці за допомогою ранцевого оприскувача ОП-2 до повного змочування листків 0,025% розчином тебуконазолу (EW-250) та 0,005% розчином гіберелової кислоти ($ГК_3$) у фазу бутонізації 17.07.2013, 10.07.2014 і 19.07.2015 р. – перців, 14.06.2013, 17.06.2014 і 19.06.2015 р. – томатів. Контрольні рослини обприскували водопровідною водою. Фітометричні показники (висота рослин, маса сухої та сирої речовини рослини та листя, площа листків) визначали на 20 рослинах. Матеріали для вивчення мезоструктурної будови листка відбирали у фазу утворення плодів. Мезоструктуру листків дослідних рослин вивчали на фіксованому матеріалі. Для його консервації застосовували суміш рівних частин етилового спирту, гліцерину, води з додаванням 1% формаліну. Визначення розмірів клітин хлоренхіми та її товщину здійснювали за допомогою мікроскопа Микмед-1 та окулярного мікрометра МОБ-1-15х у 35-кратній повторності. Для мезоструктурного аналізу відбирали листки середнього ярусу. У фазу плодоношення визначали вміст суми хлорофілів у свіжому матеріалі спектрофотометричним методом на спектрофотометрі СФ-16, вміст цукрів і крохмалю, вміст різних форм азоту у фіксованому та висушеному матеріалі у п'ятикратній аналітичній повторності (Bala et al., 2013). Протягом вегетації визначали чисту продуктивність фотосинтезу (ЧПФ) як приріст маси сухої речовини за одиницю часу на одиницю площі листків, індекс листкової поверхні (ЛІ) як відношення сумарної площі листків до одиниці площі насаджень і хлорофільний індекс (ХІ) як добуток площі листків рослини та вмісту сумарного хлорофілу в них.

У таблицях і на графіках наведено середні дані за три роки досліджень. Результати обробляли статистично за допомогою комп'ютерної програми Statistica 6.0 (StatSoft Inc., USA). Застосовували однофакторний дисперсійний аналіз, відмінності між середніми значеннями вважали вірогідними за $P < 0,05$ (Van Emden, 2008). У таблицях наведено середні арифметичні значення та їх стандартні похибки (SE).

Результати

Антигібереліновi препарати тебуконазол гіберелова кислота зумовили зміни морфогенезу та продуктивності рослин тома-

тів сорту Бобкат і перців сорту Антей. Зокрема, застосування ретарданту зумовило зменшення лінійних розмірів рослин перців і томатів у фазу формування плодів (відповідно на 18% та 16% протягом різних років досліджень). За дії гіберелової кислоти ріст відбувався активніше, висота рослин перевищувала контрольний показник на 12% та 16% відповідно (табл. 1).

Зміна темпів ростових процесів за впливу регуляторів росту супроводжувалася змінами будови, розмірів і функціонування вегетативних і генеративних органів. Установлено зміни листкового апарату дослідних рослин. За обробки гібереловою кислотою рослин томатів і перцю зростала кількість листків на рослині, середня маса сухої та сирої речовини листків. Обробка тебуконазолом зумовила достовірне зростання маси сирої та сухої речовини у рослин перців за зменшення загальної кількості листків. У томатів за дії ретарданту збільшилася маса сирої та сухої речовини листків, збільшилась кількість листків.

Площа листя – один з основних морфологічних показників, що суттєво впливає на продуктивність сільськогосподарських культур. Обробка гібереловою кислотою достовірно збільшує цей показник у рослин перців і томатів. Антигібереліновий препарат тебуконазол збільшує площу листя рослин перців і практично не змінює у томатів. Збільшення площі листкової поверхні у перців відбувається за рахунок збільшення площі окремих листків, оскільки загальна їх кількість за дії препарату зменшилася.

Кількісна характеристика фотосинтетичних процесів – питома поверхнева щільність листка. Тебуконазол суттєво збільшує цей показник у рослин перців (на 61%) і томатів (на 23%). Аналогічні результати отримано для інших культур (Kuryata and Poproc'ka, 2016). За дії гіберелової кислоти цей показник порівняно з контролем достовірно не змінюється.

Отримані результати свідчать про суттєву перебудову листкового апрарату за впливу гібереліну та ретарданту. У зв'язку із цим доцільно проаналізувати зміни мезоструктури листків дослідних рослин за дії регуляторів росту різного напрямку дії. Тебуконазол суттєво потовщував листкові пластинки рослин перців і томатів за рахунок розростання клітин основної фотосинтетичної тканини – хлоренхіми, зміни товщини верхнього та нижнього епідермісу були незначними (табл. 2). Потовщення асиміляційної тканини відбувалося як за рахунок зростання об'єму клітин стовпчастої паренхіми, так і розмірів клітин губчастої. Гіберелова кислота також впливала на розвиток фотосинтетичної тканини, але не так відчутно. Вказані зміни мезоструктури листкових пластинок пасльонових культур можуть створювати передумови для підвищення їх фотосинтетичної активності.

Один з основних показників, що впливає на продуктивність рослин, – вміст хлорофілів у листках. Протягом вегетаційного періоду інгібітори росту збільшували концентрацію хлорофілів (a + b) у листках перців і томатів, що відмічалося раніше для інших культур (Kuryata and Polyvanyj, 2015). За дії гіберелової кислоти вміст хлорофілів зменшувався. Про позитивний вплив обох препаратів на формування фотосинтетичних структур листка свідчить підвищений вміст азоту в листках обох культур, причому дія тебуконазолу більш виражена. Важливі ценотичні показники насаджень – листковий та хлорофільний індекси. Гіберелова кислота збільшувала листковий індекс у рослин перців і томатів у фазу активного формування плодів і зменшувала хлорофільний індекс. Тебуконазол збільшував як листковий, так і хлорофільний індекси у рослин перців і хлорофільний індекс у рослин томатів.

З погляду ефективності біологічної продуктивності дослідних рослин важливе вивчення динаміки накопичення маси сухої речовини рослинами. Обидва регулятори росту стимулюють накопичення маси сухої речовини рослинами овочевих (табл. 1). Триазолпохідний ретардант тебуконазол суттєво збільшує показник ЧПФ у період плодоношення в обох культур. При цьому за дії гібереліну зростання цього показника було значно меншим (перці), або різниця була недостовірною (томати).

Таблиця 1

Морфофізіологічні показники перців сорту Антей та томатів сорту Бобкат за дії регуляторів росту (фаза плодоношення, середні дані за 2013–2015 роки, n = 20)

Показник	Перці			Томати		
	К	$ГК_3$	EW-250	К	$ГК_3$	EW-250
Висота рослини, см	42,4 ± 1,08	47,5 ± 1,12*	34,6 ± 1,02*	64,3 ± 1,57	74,9 ± 1,89*	54,1 ± 1,32*
Кількість листків, шт.	96,5 ± 2,44	97,7 ± 2,68	86,4 ± 2,12*	72,1 ± 1,74	89,4 ± 2,21*	80,2 ± 1,98*
Маса сирої речовини листків, г	36,3 ± 0,97	47,6 ± 1,11*	48,4 ± 1,32*	286,8 ± 7,71	471,3 ± 9,93*	295,2 ± 8,12
Маса сухої речовини листків, г	12,6 ± 0,55	18,2 ± 0,81*	23,1 ± 0,97*	55,5 ± 2,14	91,7 ± 4,27*	58,2 ± 2,02
Площа листків, $см^2$	1 434 ± 69,9	1 962 ± 89,7*	2 172 ± 98,9*	10 937 ± 414,4	19 177 ± 832,1*	9 494 ± 404,3
Питома поверхнева щільність листка, $мг/см^2$	6,66 ± 0,21	7,05 ± 0,28	10,74 ± 0,41*	4,82 ± 0,18	4,57 ± 0,14	5,92 ± 0,22*
Вміст суми хлорофілів (*a* + *b*), % на масу сирої речовини	0,58 ± 0,02	0,54 ± 0,02	0,68 ± 0,03*	0,58 ± 0,03	0,55 ± 0,03	0,70 ± 0,04*
Загальний азот, % на масу сухої речовини	3,32 ± 0,07	3,59 ± 0,08	3,68 ± 0,09	2,92 ± 0,06	2,82 ± 0,06	3,05 ± 0,07
Білковий азот, % на масу сухої речовини	2,71 ± 0,05	3,01 ± 0,06	3,14 ± 0,07	2,37 ± 0,05	2,40 ± 0,05	2,58 ± 0,06
Маса сухої речовини рослини, г	51,3 ± 2,28	66,4 ± 3,32*	77,1 ± 3,54*	201,8 ± 9,19	299,1 ± 11,17*	218,4 ± 10,11
ЧПФ, $г/(м^2 \cdot доба)$	11,0 ± 0,51	13,8 ± 0,58*	19,9 ± 0,98*	8,81 ± 0,38	8,72 ± 0,42	12,7 ± 0,55*
ЛІ, $м^2/м^2$	1,49 ± 0,061	1,89 ± 0,082*	1,91 ± 0,084*	3,64 ± 0,173	6,39 ± 0,280*	3,16 ± 0,142
ХІ, $г/м^2$	1,92 ± 0,08	1,30 ± 0,05*	2,01 ± 0,09	1,31 ± 0,07	1,17 ± 0,05	1,87 ± 0,08*

Примітка: К – контроль, $ГК_3$ – гіберелова кислота, EW-250 – тебуконазол; * – різниця порівняно з контролем достовірна за $P < 0,05$.

Таблиця 2

Вплив регуляторів росту на мозоструктурні показники листків перців і томатів (фаза утворення плодів, n = 35)

Показник	Перці			Томати		
	К	$ГК_3$	EW-250	К	$ГК_3$	EW-250
Товщина листка, мкм	264 ± 5,8	298 ± 6,5*	337 ± 8,5*	239 ± 3,2	289 ± 8,8*	296 ± 9,6*
Товщина хлоренхіми, мкм	217 ± 4,7	237 ± 5,8*	283 ± 7,1*	186 ± 1,6	242 ± 7,7*	243 ± 8,3*
Товщина верхнього епідермісу, мкм	23,3 ± 0,62	31,1 ± 0,21*	26,2 ± 0,84*	29,2 ± 0,81	28,0 ± 0,76	31,0 ± 0,79
Товщина нижнього епідермісу, мкм	23,9 ± 0,49	29,6 ± 0,53*	27,8 ± 0,51*	24,1 ± 0,80	18,8 ± 0,41*	22,0 ± 0,54*
Об'єм клітин стовпчастої паренхіми, $мкм^3$	19 857 ± 896	26 689 ± 1 117*	28 366 ± 788*	6 228 ± 301	10 057 ± 495*	9 949 ± 332*
Довжина клітин губчастої паренхіми, мкм	33,3 ± 0,95	39,8 ± 0,78*	40,2 ± 0,57*	30,3 ± 1,46	36,1 ± 1,25*	41,6 ± 2,14*
Ширина клітин губчастої паренхіми, мкм	24,9 ± 0,75	32,4 ± 0,89*	31,9 ± 0,57*	23,6 ± 1,46	25,5 ± 0,59	26,4 ± 1,37

Примітка: позначення див. табл. 1.

Аналіз отриманих результатів свідчить про суттєві зміни співвідношення мас вегетативних і генеративних органів обох культур за дії препаратів (рис.). В обох культур відмічене зростання частки плодів у загальній масі рослини, у першу чергу за рахунок зменшення частки сухої речовини стебла, що свідчить про зміни характеру донорно-акцепторних відносин і

перерозподіл асимілятів у рослині у бік плодів. При цьому масова частка листків не лише не зменшувалась, а навіть збільшувалась, – важливий показник оптимізації продукційного процесу. Аналіз отриманих даних свідчить, що протягом вегетаційного періоду в цілому відбувалося зменшення вмісту суми вуглеводів (цукри + крохмаль) у вегетативних органах рослин, причому найсуттєвіші зміни відбувалися у стеблі рослин перців і томатів (табл. 3). Дія тебуконазолу сильніша саме в цьому варіанті: в обох культур вміст вуглеводів у стеблі був мінімальним. Отже, у період плодоношення за впливу застосованих регуляторів росту посилений ріст плодів визначається інтенсивним перерозподілом асимілятів на процеси карпогенезу.

Зміна швидкості ростових процесів у рослин перців і томатів і зумовлена цим зміна співвідношення мас між вегетативними та генеративними органами, характеру донорно-акцепторних відносин у рослинах вплинули на продуктивність культур. Гіберелова кислота збільшує кількість плодів у рослин перців і томатів на 33% та 26%, що збільшує урожайність культур відповідно на 28% та 30%. Тебуконазол збільшує кількість плодів у перців і томатів на 14% і 21%, що сприяло збільшенню урожайності відповідно на 22% та 12% (табл. 4).

Таблиця 3

Вплив регуляторів росту на вміст суми вуглеводів (цукри + крохмаль)
у вегетативних органах рослин перців і томатів у фазу плодоношення (% на суху речовину, середні дані за 2013–2014 роки, n = 5)

Показники	Перці			Томати		
	К	$ГК_3$	EW-250	К	$ГК_3$	EW-250
Коріння	5,96 ± 0,12	5,76 ± 0,11	5,25 ± 0,12*	4,51 ± 0,09	4,54 ± 0,10	6,84 ± 0,15*
Стебло	11,89 ± 0,29	11,31 ± 0,26	11,15 ± 0,27*	6,65 ± 0,17	6,65 ± 0,17	6,03 ± 0,14*
Листя	13,37 ± 0,32	12,81 ± 0,28	12,39 ± 0,33	10,08 ± 0,27	9,58 ± 0,24	10,20 ± 0,28

Примітка: позначення див. табл. 1.

Таблиця 4

Вплив регуляторів росту на урожайність рослин перців і томатів (середні дані за 2013–2015 роки, n = 5)

Показник	Перці			Томати		
	К	$ГК_3$	EW-250	К	$ГК_3$	EW-250
Кількість плодів на рослині, шт.	5,89 ± 0,232	7,85 ± 0,381*	6,73 ± 0,320*	10,01 ± 0,483	12,60 ± 0,611*	12,14 ± 0,572*
Середня маса одного плоду, г	88,1 ± 4,24	83,4 ± 3,98	90,2 ± 4,44	152,6 ± 7,14	159,5 ± 7,47	161,1 ± 7,92
Урожайність плодів, т/га	32,9 ± 1,57	42,2 ± 2,04*	40,0 ± 1,89*	53,4 ± 2,54	69,6 ± 3,44*	67,8 ± 3,35*

Примітка: позначення див. табл. 1.

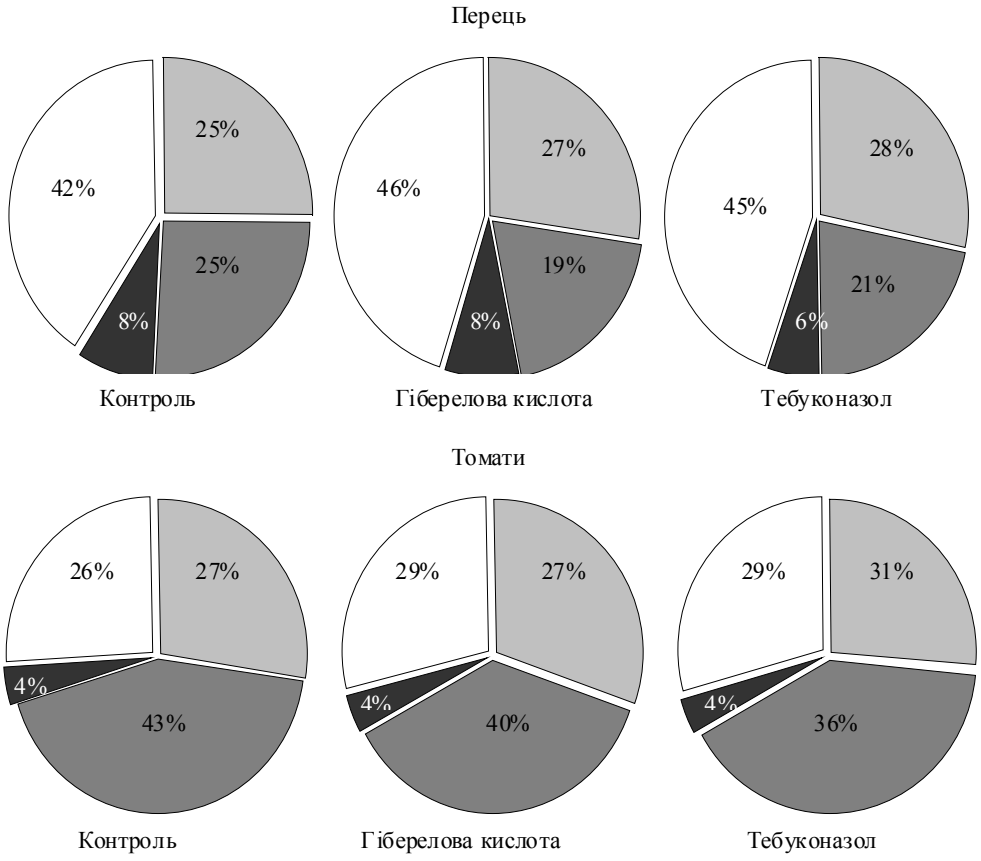


Рис. Вплив гіберелової кислоти та тебуконазолу на співвідношення маси сухої речовини органів перців і томатів (фаза утворення плодів): біле – плоди; світло-сіре – листки; темно-сіре – стебло; чорне – коріння; * – різниця за $P < 0,05$

Обговорення

Ключову роль у продуктивності рослин відіграє фотосинтетична активність, яка великою мірою визначається площею листкової поверхні, кількістю та тривалістю життя листків, мезоструктурою листка. Дослідження останніх років свідчать, що регуляція ростових процесів рослин за допомогою фітогормонів і ретардантів різних класів супроводжується суттєвими

змінами морфогенезу, які стосуються формування різних рівнів організації фотосинтетичного апарату рослин (Kuryata and Polyvanyj, 2015; Kuryata and Poproc'ka, 2016). Зважаючи на суттєві морфологічні аспекти дії стимуляторів та інгібіторів росту рослин, застосування цих груп препаратів дозволяє з'ясувати значення анатомо-морфологічної та мезоструктурної складових у реалізації донорно-акцепторних відносин рослини та оптимізації продукційного процесу.

Отримані нами результати свідчать, що як гібберелін, так і антигібереліновий препарат тебуконазол стимулювали формування та функціонування фотосинтетичного апарату перцю солодкого та томатів їстівних, однак шляхи цієї регуляції різні. Посилення фотосинтетичної активності рослин за дії гібереліну визначалося у першу чергу формуванням більшої кількості листків і загальної площі листкової поверхні. Застосування ретарданту тебуконазолу зумовлювало суттєву перебудову мезоструктури листків: листки потовщувалися за рахунок розростання ключової фотосинтетичної тканини – хлоренхіми. Відбувалося збільшення об'єму клітин стовпчастої асиміляційної паренхіми та лінійних розмірів клітин губчастої паренхіми листків. При цьому підвищується питома поверхнева щільність листків, суттєво зростає вміст хлорофілів та вміст азоту (у першу чергу білкового) порівняно з контролем і варіантом із застосуванням гібереліну. Така глибока перебудова фотосинтетичного апарату рослини викликала суттєве зростання донорної функції листків перцю та томатів за дії тебуконазолу. Показник цього – зростання чистої продуктивності фотосинтезу (найвищої серед усіх варіантів досліду). Отримані результати свідчать також про те, що збільшення хлорофільного індексу фітоценозу виявилося вагомішим фактором, ніж збільшення листкового індексу. Зокрема, у томатів за дії тебуконазолу листковий індекс нижчий, ніж у контролі, однак завдяки високому показнику хлорофільного індексу урожайність насаджень збільшувалася. Зростання листкового індексу в агроценозі – не завжди позитивний фактор біопродуктивності, оскільки загущення посівів, формування надмірної листкової поверхні може спричинити затінення сусідніх рослин, і, як наслідок, зумовити зменшення урожайності культури. Результати нашого дослідження свідчать, що застосування гібереліну та тебуконазолу не викликало таких негативних наслідків. Навпаки, відбувалося зростання урожайності культур у дослідних варіантах.

Один із найпотужніших акцепторів асимілятів – процеси вегетативного росту та ріст плодів (карпогенез). Оскільки у період плодоношення витрати асимілятів на процеси росту вегетативних органів суттєво зменшуються, оптимізація фотосинтетичного апарату рослин перцю та томатів викликала закладання більшої кількості плодів на рослині та підвищення урожайності культур. Аналіз співвідношення мас вегетативних органів і плодів дослідних рослин свідчить, що масова частка плодів (акцепторна сфера рослини у період плодоношення) за дії обох препаратів зросла. При цьому в обох варіантах досліду вищою була також масова частка донорів асимілятів – листків. Крім основного джерела асимілятів – процесів фотосинтезу, які посилюються внаслідок формування більшої площі листкової поверхні (варіант із гібереліном), або оптимізації мезоструктури (варіант із тебуконазолом), ймовірно формування та ріст плодів відбуваються частково за рахунок реутилізації вуглеводів із вегетативних органів рослини на процеси карпогенезу. Зокрема, у перцю солодкого у період росту плодів відбувалося зменшення вмісту суми вуглеводів у всіх вегетативних органах. У томатів достовірне зменшення вмісту вуглеводів відмічалося лише в стеблі.

Отже, застосування у період бутонізації гіберелової кислоти та ретарданту тебуконазолу сприяє підвищенню продуктивності рослин перцю солодкого та томатів унаслідок оптимізації структури та функціонування листкового апарату рослин.

Висновки

Оптимізація продукційного процесу рослин перцю солодкого та томату їстівного за дії гіберелової кислоти і тебуконазолу реалізується через посилення донорного потенціалу рослин унаслідок морфологічних і мезоструктурних змін листкового апарату. За дії гіберелової кислоти зростає кількість листків та їх сумарна площа на рослині, а за дії тебуконазолу відбувається перебудова мезоструктури листків, формування потужнішої хлоренхіми, збільшення вмісту хлорофілів, сумарного та білкового азоту в них, що є важливою передумовою інтенсифікації фотосинтетичних процесів.

References

Bala, M., Gupta, S., Gupta, N. K., & Sangha, M. K. (2013). Practicals in plant physiology and biochemistry. Scientific Publishers, Jodhpur.

Khan, A. L., Hamayun, M., Kang, S. M., Kim, Y. H., Jung, H. Y., Lee, J. H., & Lee, I. J. (2012). Endophytic fungal association via gibberellins and indole acetic acid can improve plant growth under abiotic stress: An example of *Paecilomyces formosus* LHL10. BMC Microbiology, 12(1), 3.

Kumar, S., Ghatty, S., Satyanarayana, J., & Guha, A. (2012). Paclobutrazol treatment as a potential strategy for higher seed and oil yield in field-grown *Camelina sativa* L. Crantz. BSK Research Notes, 5, 1–13.

Kuryata, V. G., Rohach, V. V., Rohach, T. I., & Khranovska, T. V. (2016). The use of antigibberelins with different mechanisms of action on morphogenesis and production process regulation in the plant *Solanum melongena* (Solanaceae). Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology, Ecology, 24(1), 230–234.

Matysiak, K., & Kaczmarek, S. (2013). Effect of chlorocholine chloride and triazoles – tebuconazole and flusilazole on winter oilseed rape (*Brassica napus* var. *oleifera* L.) in response to the application term and sowing density. Journal of Plant Protection Research, 53(1) 79–88.

Mohammad, N. K., & Mohammad, F. (2013). Effect of GA3, N and P ameliorate growth, seed and fibre yield by enhancing photosynthetic capacity and carbonic anhydrase activity of linseed. Integrative Agriculture, 12(7), 1183–1194.

Muhammad, I., & Muhammad, A. (2013). Gibberellic acid mediated induction of salt tolerance in wheat plants: Growth, ionic partitioning, photosynthesis, yield and hormonal homeostasis. Environmental and Experimental Botany, 86, 76–85.

Panyapruek, S., Sinsiri, W., Sinsiri, N., Arimatsu, P., & Polthanee, A. (2016) Effect of paclobutrazol growth regulator on tuber production and starch quality of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). Asian Journal of Plant Sciences, 15(1-2), 1–7.

Pavlista, A. D. (2013). Influence of foliar-applied growth retardants on russet burbank potato tuber production. American Journal of Potato Research, 90, 395–401.

Pobudkiewicz, A. (2014). Influence of growth retardant on growth and development of *Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch. Acta Agrobotanica, 67(3), 65–74.

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

Ribeiro, D. M., Araújo, W. L., Fernie, A. R., Schippers, J. H. M., & Mueller-Roeber, B. (2012). Translatome and metabolome effects triggered by gibberellins during rosette growth in *Arabidopsis*. Journal of Experimental Botany, 63(7), 2769–2786.

Rogach, V. V., & Rogach, T. I., 2015. Vplyv syntetychnyh stymuljatoriv rostu na morfofiziologichni harakterystyky ta biologichnu produktyvnist' kul'tury kartopli. Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology, Ecology, 23(2), 221–224 (in Ukrainian).

Rogach, V. V., Poprotska, I. V., & Kuryata, V. G. (2016). Diya giberelinu ta retardantiv na morfogenez, fotosyntetychnyj aparat i produktyvnist' kartopli [Effect of gibberellin and retardants on morphogenesis, photosynthetic apparatus and productivity of the potato]. Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology, Ecology, 24(2), 416–419 (in Ukrainian).

Saeidi-Sar, S., Abbaspour, H., Afshari, H., & Yaghoobi, S. R. (2013). Effects of ascorbic acid and gibberellin A3 on alleviation of salt stress in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings. Acta Physiologiae Plantarum, 35(3), 667–677.

Sardoei, A. S., Yazdi, M. R., & Shshdadneghad, M. (2014). Effect of cycocel on growth retardant cycocel on reducing sugar, malondialdehyde and other aldehydes of *Cannabis sativa* L. International Journal of Biosciences, 4(6), 127–133.

Sugiura, D., Sawakami, K., Kojim, M., Sakakibara, H., Terashima, I., & Tateno, M. (2015). Roles of gibberellins and cytokinins in regulation of morphological and physiological traits in *Polygonum cuspidatum* responding to light and nitrogen availabilities. Functional Plant Biology, 42(4), 397–409.

Sukul, A., Sukul, N. C., Sen, P., Bhattacharya, A., & Sukul, S. (2014). Homeopathic potencies alter photosynthesis of cowpea. Homeopathy, 103(1), 91–92.

Tae-Yun, K., & Jung-Hee, H. (2012). Effects of hexaconazole on growth and antioxidant potential of cucumber seedlings under UV-B radiation. Journal of Environmental Science International, 21(12), 1435–1447.

Van Emden, H. F. (2008). Statistics for terrified biologists. Blackwell, Oxford.

Wang, X., Han, F., Yang, M., Yang, P., & Shen, S. (2013). Exploring the response of rice (*Oryza sativa*) leaf to gibberellins: A proteomic strategy. Rice, 6(1), 17.

Wang, Y., Gu, W., Xie, T., Li, L., Sun, Y., Zhang, H., Li, J., & Wei, S. (2016). Mixed compound of DCPTA and CCC increases maize yield by improving plant morphology and up-regulating photosynthetic capacity and antioxidants. Plos One, 11(2), e0149404.

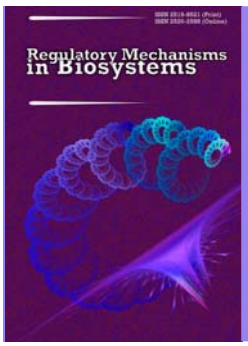
Yan, W., Yanhong, Y., Wenyu, Y., Taiwen, Y., Weiguo, L., & Wang, X. (2013). Responses of root growth and nitrogen transfer metabolism to uniconazole, a growth retardant, during the seedling stage of soybean under relay strip. Communications in Soil Science and Plant Analysis Intercropping System, 44(22), 3267–3280.

Yan, Y., Wan, Y., Liu, W., Wang, X., Yong, T., & Yang, W. (2015). Influence of seed treatment with uniconazole powder on soybean growth, photosynthesis, dry matter accumulation after flowering and yield in relay strip intercropping system. Plant Production Science, 18(3), 295–301.

Yang, L., Yang, D., Yan, X., Cui, L., Wang, Z., & Yuan, H. (2016). The role of gibberellins in improving the resistance of tebuconazole-coated maize seeds to chilling stress by microencapsulation. Scientific Reports, 60, 1–12.

Yu, S. M., Lo, S. F., & Ho, T. D. (2015) Source-sink communication: Regulated by hormone, nutrient, and stress cross-signaling. Trends in Plant Science, 20(12), 844–857.

Zhang, W., Xu, F., Hua, C., & Cheng, S. (2013). Effect of chlorocholine chloride on chlorophyll, photosynthesis, soluble sugar and flavonoids of *Ginkgo biloba*. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, 41(1), 97–103.



Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(2), 169–178
doi: 10.15421/021727

The compartments of the parenchyma of the lymph nodes in the newborn bull calves of domestic cattle (*Bos taurus*)

P. N. Gavrilin, O. G. Gavrilina, M. V. Kravtsova

Dnipro State Agrarian-Economic University, Dnipro, Ukraine

Article info

Received 29.03.2017
Received in revised form 22.04.2017
Accepted 29.04.2017

Dnipro State Agrarian-Economic University, Sergey Efremov Str., 25, Dnipro, 49600, Ukraine.
Tel.:+38-099-545-33-31.
E-mail: morfologagro@gmail.com

Gavrilin, P. N., Gavrilina, O. G., & Kravtsova, M. V. (2017). The compartments of the parenchyma of the lymph nodes in the newborn bull calves of domestic cattle (Bos taurus). Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(2), 169–178. doi:10.15421/021727

The article analyzes the features of the structure of the lymphoid lobules of the parenchyma of the superficial somatic (*Limphonodi subiliaci*, *L. cervicales superficiales*), profund somatic (*L. axillares proprii L. poplitei*), somatovisceral (*L. iliaci mediales*, *L. retropharyngei mediales*) and visceral (*L. mediastinales caudales*, *L. ileocolici*) lymph nodes of newborn bull calves of domestic cattle. To visualize clearly the boundaries of the structural components of lymphoid lobules we used the author's modification of the impregnation of total median frozen histological sections with silver nitrate. We have established a high level of tissue differentiation of the lymph nodes, a significant development of the lymphoid parenchyma, the division of the parenchyma into lymphoid lobules, the presence in the lobules of all the main structural components that are represented by two morphotypes. The first morphotype is ribbon-like perisinusoidal cords (interfollicular zone, paracortical and medullary cords). The second morphotype is rounded lymphoid formations (central zones of deep cortex units, lymphatic nodules). Lymphoid lobules are located along the marginal sinus in one row, they are better developed and differentiated in the visceral lymph nodes. In all the lymph nodes, the lymphoid lobules have a similar histoarchitectonics, and each structural component of the lymphoid lobules has a specific architectonics of the reticular meshwork and the density of the location of the fibroblastic reticulocytes. We determined that the structures of the first morphotype which provide the migration of lymphocytes, the detection of antigens and the accumulation of plasmocytes are more developed. We have established that the relative volume of structures of the first morphotype is 4.5–8.0 times larger than the volume of the structures of the second morphotype, which provide clonal proliferation of T and B lymphocytes, especially in deep somatic lymph nodes. Among the zones of the second morphotype, predominate T-dependent zones, the relative volume of which considerably exceeds the volume of B-dependent zones (lymphoid nodules): in the superficial somatic lymph nodes by 14–30 times, profound somatic by 12–14 times, somatovisceral by 6–7 times and visceral by 4.5–5.5 times. We determined that lymphatic nodules can form in different parts of compartments: in the interfollicular zone and paracortical cords of all lymph nodes and in the medullary cords of the visceral lymph nodes. The study shows that the parenchyma of the lymph nodes of newborn bull calves has a high degree of maturity, contains a full set of structural markers of immunocompetence, among which predominate the components that support lymphocyte migration, antigen detection and accumulation of plasma cells.

Keywords: lymphoid lobules; deep cortex units; paracortical and medullary cords; lymphoid nodules

Компартменты паренхимы лимфатических узлов у новорожденных особей быка домашнего (*Bos taurus*)

П. Н. Гаврилин, Е. Г. Гаврилина, М. В. Кравцова

Днепровский государственный аграрно-экономический университет, Днепр, Украина

Проанализированы особенности строения компартментов (лимфоидных долек) в паренхиме различных групп лимфатических узлов у новорожденных особей быка домашнего. Для одновременной визуализации структурных компонентов лимфоидных долек использовали авторскую модификацию импрегнации тотальных срединных замороженных срезов азотнокислым серебром. Лимфоидная паренхима всех групп лимфатических узлов имеет выраженную дольчатую структуру. Компоненты лимфоидных долек подразделяются на два основных морфотипа. Первый морфотип представлен лентообразными перисинусоидальными тяжами (интерфолликулярная зона, паракортикальные и мозговые тяжи), которые обеспечивают миграцию лимфоцитов, детекцию антигенов и аккумуляцию плазмоцитов. Второй морфотип представлен округлыми образованиями (центральные зоны единиц глубокой коры или Т-зависимые зоны, лимфатические узелки или В-зависимые зоны), отвечающие за клональную пролиферацию лимфоцитов. Относительный объем структур первого морфотипа в 4,5–8,0 раз превышает объем структур второго морфотипа. Структуры первого морфотипа развиты относительно равномерно, а среди зон второго морфотипа преобладают Т-зависимые зоны (в 4,5–30,0 раз больше объема В-зависимых зон). Лимфатические узелки являются

топографически нестабильными компонентами лимфоидных долек, формируются на основе всех видов тяжей лимфоидной паренхимы, и, в том числе, мозговых тяжей висцеральных лимфатических узлов.

Ключевые слова: лимфоидные дольки; единицы глубокой коры; паракортикальные и мозговые тяжи; лимфоидные узелки

Введение

Лимфатические узлы у млекопитающих являются универсальными биологическими фильтрами, которые обеспечивают антигенный контроль тканевой жидкости и лимфы, формируют в различных частях организма скопления или лимфоцентры, специализированные и адаптированные к особенностям потенциального регионального антигенного прессинга (Ikomi et al., 2012; Jafarnejad et al., 2015; Houston et al., 2016). Помимо региональной специализации, для лимфатических узлов характерна внутриорганная дифференциация паренхимы, что морфологически выражается в ее дольчатой или дискретной структуре. На сегодня не существует универсального термина для обозначения структурных единиц паренхимы лимфатических узлов. Ряд авторов называет структурно-функциоанльные единицы паренхимы компартментами (Belisle and Sainte-Marie, 1981; Sainte-Marie, 2010), другие обозначают их как лимфоидные дольки (Kelly, 1975; Gretz et al., 1997; Willard-Mack, 2006). Необходимо отметить, что термин «лимфоидная долька» является более предпочтительным и используется не только в морфологии, но и в области патологии и онкологии (Elmore, 2006; Chandrasekaran and King, 2014; Shipman et al., 2017). Лимфоидные дольки в лимфатических узлах относятся к основным структурно-функциональным единицам, аналогично нефронам в почках или долькам в печени, а изменения данных единиц в зависимости от возраста или локализации узлов, в эксперименте, а также при воздействии различных антигенов наиболее точно и адекватно отражают суть и характер развивающихся в узлах процессов от нормы реакции до патологических состояний (Elmore, 2000; Willard-Mack, 2006; Margaris and Black, 2012).

Основным объектом при разработке современной гистологической терминологии лимфатического узла (Kowala and Schoefi, 1986; Konenkov et al., 2008; Ohtani and Ohtani, 2008), а также исследовании функциональных изменений в лимфатических узлах, в том числе при различных болезнях, являются соответствующие органы лабораторных животных (белые мыши, крысы) и приматов (Iwasaki et al., 2016; Palm et al., 2016; Lee et al., 2017). В результате установлено, что лимфоидные дольки в лимфатических узлах располагаются в один ряд и ограничиваются друг от друга поперечными лимфатическими синусами. Субъединицы паренхимы лимфатических узлов или лимфоидные дольки имеют форму неправильного овала, расширенная вершина которого обращена в сторону краевого синуса, а суженная, образованная мозговыми тяжами с сосудистой ножкой – в сторону воротного синуса и, соответственно, ворот узлов в целом (Willard-Mack, 2006). Количество долек в паренхиме того или иного узла определяется числом впадающих в краевой синус приносящих лимфатических сосудов по принципу: один лимфатический сосуд – одна лимфоидная долька (Belisle and Sainte-Marie, 1981; Sainte-Marie, 2010). Структурно-функциональная единица паренхимы лимфатических узлов млекопитающих или лимфоидная долька имеет целый ряд принципиальных отличий от субъединиц других органов. В структурно-функциональном отношении лимфоидная долька относительно стабильна, ее развитие и структурная перестройка имеют реактивный характер и определяются, прежде всего, интенсивностью антигенного воздействия на соответствующий регион или особенностями патогенеза иммунопатологических процессов (Olson et al., 2012; Azzi et al., 2016). Лимфоидная составляющая паренхимы в лимфоидной дольке лабильна вследствие активной рециркуляции лимфоцитов и антигенпрезентирующих клеток (Jia et al., 2012; Platt and Randolph, 2013; Butler et al., 2016).

Структура и цитоархитектоника стабильной компоненты лимфоидной дольки представлена скоплениями фибробластических ретикулярных клеток и сетей, образуемых ими ретикулярных волокон различной плотности. Ретикулярная строма лимфоидной дольки чрезвычайно разнообразна и формирует вместе с сосудами микроциркуляторного русла ряд специализированных зон, которые обеспечивают расселение, взаимодействие с антигенпрезентирующими клетками и клональную пролиферацию лимфоцитов (Kaldjian et al., 2001; Andrian and Mempel, 2003; Sixt et al., 2005).

В лимфоидной дольке паренхимы лимфатического узла млекопитающих принято выделять такие структурно-функциональные зоны: единицы глубокой коры (центральные зоны единиц), которые сверху и с боков окружены, соответственно, интерфолликулярной зоной (корковое плато) и паракортикальными тяжами (периферические зоны единиц) (Kelly, 1975). В направлении ворот лимфатических узлов единицы глубокой коры без явных границ переходят в мозговые тяжи. Периферия единиц глубокой коры или «транзитная зона» содержит венулы с высоким эндотелием и обеспечивает процессы миграции лимфоцитов в паренхиму узлов (De Bruyn and Cho, 1990; Ruddle, 2016; Ager, 2017). На основе интерфолликулярной зоны вдоль краевого синуса формируются первичные и вторичные лимфатические узелки (зоны локализации и клональной пролиферации В-лимфоцитов), тогда как центр единиц глубокой коры относится к участкам локализации и клональной пролиферации Т-лимфоцитов (Rouse et al., 1984; Katakai et al., 2004; Capece and Kim, 2016). Мозговые тяжи, расположенные в области ножки лимфоидной дольки, являются основной зоной локализации плазматических клеток и, соответственно, образования иммуноглобулинов (Andrian and Mempel, 2003).

Концепция о лимфоидной дольке лимфатических узлов млекопитающих как их базовой структурной единицы до настоящего времени не является общепризнанной и общепринятой. Существенным препятствием для ее окончательного утверждения в биологии и медицине является всестороннее обоснование данного представления, базирующегося на результатах исследования разных аспектов структуры паренхимы лимфатических узлов у разных видов млекопитающих. Имеющиеся на сегодняшний день в научной литературе сведения о строении лимфатических узлов парнокопытных млекопитающих, таких как домашние бык и свинья (Hoshi et al., 1986; Nicander et al., 1991; Gavrilin et al., 2013), верблюд одногорбый (Zidan and Pabst, 2012), часто не согласуются с вышеуказанной концепцией строения данных органов у приматов и лабораторных животных.

Исходя из того, что положение о лимфоидной дольке было разработано при исследовании лимфатических узлов у представителей млекопитающих с менее совершенной с эволюционной точки зрения морфофункциональной организацией, изучение структуры паренхимы лимфатических узлов парнокопытных имеет особый интерес. Исследование лимфатических узлов копытных млекопитающих, имеющих более совершенные интегрирующие системы, также составляет определенный практический интерес, так как многие из парнокопытных являются продуктивными животными, испытывающими действие неблагоприятных антропогенных факторов, подверженными ряду инфекционных болезней и различным видам иммунопатологии. Кроме того парнокопытные характеризуются зрелорождаемостью, что, безусловно, отражается на статусе органов кроветворения и иммунной защиты новорожденных особей, а также имеют особый тип строения плаценты (десмохориальная плацента), которая в норме практически непроницаема для материнских антигенов. Это, соответственно, исключает возможность формирования полноценного материнского иммунитета I типа (Geptner et al., 1961; Koliakov, 1986).

Цель первого этапа нашей работы – определить особенности строения компартментов (лимфоидных долек) паренхимы интактных (не контактировавших с антигенами внешней среды) лимфатических узлов различной локализации новорожденных особей (телят) быка домашнего на макро-микроскопическом и тканевом уровне.

Материал и методы исследований

Материал для исследований отбирали от 6 новорожденных телят быка домашнего (*Bos taurus*), погибших во время родов по причинам, не связанным с инфекционными, инвазионными и незаразними болезнями (асфиксия вследствие ущемления пупочного канатика, аспирация плодных вод, асфиксия вследствие слабой родовой деятельности и т. д.). Материал для исследований – лимфатические узлы различной локализации: поверхностные соматические: подподвздошные (*Limphonodi subiliaci*), поверхностные шейные (*L. cervicales superficiales*); глубокие соматические: подмышечные (*L. axillares proprii*), подколенные (*L. poplitei*); висцеральные: каудальные средостенные (*L. mediastinales caudales*), подвздошноободочные (*L. ileocolici*); смешанные или сомато-висцеральные: медиальные заглоточные (*L. retropharyngei mediales*), медиальные подвздошные (*L. iliaci mediales*) (Zelenevsky, 2013). Учитывая, что все лимфатические узлы, за искючением висцеральных, являются парными органами, всего исследовано 84 органа.

Материал исследовали в Днепровском государственном аграрно-экономическом университете. Отобранные целые органы фиксировали в 5% охлажденном растворе формалина (+4 °С) в холодильной камере в течение 48 часов. Дальнейшую фиксацию проводили при комнатной температуре в 10% растворе формалина в течение 10–14 суток. Учитывая, что исследуемые лимфатические узлы новорожденных телят быка домашнего имеют значительную массу и, соответственно, линейные размеры (длина – 20–50, ширина – 11–18 мм) (Gavrilin, 2000) для изготовления тотальних гистопрепаратов от каждого лимфатического узла после фиксации отбирали срединные сегменты в плоскости, перпендикулярной их воротам. Отобранные сегменты органов промывали в проточной воде в течение 2–3 суток для максимального удаления формалина. Тотальные срединные срезы лимфатических узлов толщиной 10–20 мкм изготавливали на микротоме-криостате с применением глицерин-желатиновых смесей. Из каждого сегмента получали 10 тотальных серийных срезов. Срезы импрегнировали нитратом серебра (5 срезов) и окрашивали гематоксилином и эозином (5 срезов). При изготовлении и окраске срезов за основу брали традиционные гистологические методики в авторской модификации (Gavrilin, 1999). Использование авторской модификации изготовления, окраски и импрегнации тотальних срезов лимфатических узлов позволило получить гистопрепараты с высокой степенью сохранности стромы и лимфоидной паренхимы, а также четкой и одновременной визуализацией структур лимфоидных долек по характерным особенностям строения сетей ретикулярных волокон.

Гистопрепараты исследовали на световых микроскопах Olympus CX-41 и Leica DM1000 (окуляр ^{x}10, объективы ^{x}10, ^{x}40). В гистопрепаратах, окрашенных гематоксилином и эозином, определяли комплекс качественных характеристик исследуемых органов: степень развития и дифференцировки паренхимы узлов, особенности гистоархитектоники лимфоидных долек и характер взаимоотношений отдельных компонентов в их пределах. В этих же гистопрепаратах проводили измерения абсолютних размеров (максимальный диаметр) лимфатических узелков на микроскопе биологическом стереоскопическом (МБС-10), используя окуляр ^{x}8 со шкалой, объективы ^{x}4 и ^{x}7.

В гистопрепаратах, импрегнированных нитратом серебра, определяли количество лимфоидных долек на всей площади тотальных срезов, а также процентную объемную потность или относительный объем (V, %) лимфоидной ткани в лимфатических узлах в целом и совокупный относительный объем отдельных компонентов лимфоидных долек: интерфолликулярные зоны (корковое плато), единицы глубокой коры: паракортикальные тяжи (периферические зоны единиц глубокой коры), центральные зоны единиц глубокой коры, лимфатические узелки с центрами и без центров размножения, мозговые тяжи. Количественно вышеуказанные компоненты анализировали методом «точечного счета» (Avtandilov, 1990) с использованием окулярных тестовых систем и нанесенными равноудаленными точками (100 точек) на всей площади гистопрепарата. Относительный объем компонентов лимфоидной паренхимы лимфатических узелков вычисляли по формуле:

$$V = P_i/P_t \cdot 100\%,$$

где V – относительный объем компонента, P_i – число точек, попавших на структурный компонент, P_t – общее число точек тестовой системы, попавших на гистопрепарат.

Необходимое для получения достоверных данных число точек $\tilde{n}$ (минимальный размер выборки, при котором выборочные наблюдения отклоняются от значений для генеральной совокупности не больше чем на 5%), определяли по формуле:

$$\tilde{n} = 400\,(100 - n)\,/\,n,$$

где n – число точек, приходящихся на анализируемый компонент при предварительном подсчете 100 точек (Avtandilov, 1990).

Микрофотографии изготавливали с использованием микроскопа Leica DM1000 (окуляр ^{x}4, объектив ^{x}10/0,25, ^{x}40/0,65), интегрированного с персональным компьютером.

Результаты исследований статистически обработаны и представлены с помощью Statistica 12.0 (StatSoft Inc., USA). Вероятность разницы значений в различных группах лимфатических узлов оценивали при помощи t-критерия Стьюдента ($P < 0,05$) после проверки нормальности распределения выборок.

Результаты и их обсуждение

Для лимфатических узлов новорожденных телят быка домашнего характерна высокая степень тканевой дифференциации с четким подразделением на строму (капсула, трабекулы, воротное утолщение капсулы), лимфатические синусы и лимфоидную паренхиму. Относительный объем лимфоидной паренхимы в различных лимфатических узлах значительно варьирует: менее всего ее содержится в глубоких соматических лимфатических узлах, затем следуют поверхностные соматические и соматовисцеральные узлы. В висцеральных лимфатических узлах количество лимфоидной паренхимы максимально (табл.). Полученные результаты свидетельствуют, что уже в плодном периоде пренатального онтогенеза паренхима лимфатических узлов у плодов быка домашнего развивается неравномерно. Изменение количественных характеристик лимфоидной паренхимы периферических лимфоидных органов имеет реактивный характер (Gretz et al., 1997; Vyrenkov et al., 1996). Степень увеличения объема лимфоидной ткани в периферических лимфоидных органах млекопитающих зависит от силы и интенсивности антигенного воздействия. Необходимо отметить, что у копытных млекопитающих с десмохориальным типом плаценты основными антигенными стимулами развития периферических лимфоидных органов являются аутоантигены. Можно предположить, что у плодов быка домашнего, как и особей в постнатальном онтогенезе, основным «поставщиком» антигенов являются слизистые оболочки и кожный покров. Источники и механизмы антителообразования у млекопитающих в пренатальном онтогенезе еще окончательно не установлены, а данная проблема является перспективным направлением исследований в иммунологии и иммуноморфологии.

Лимфоидная паренхима всех групп лимфатических узлов имеет выраженную дискретную или дольчатую структуру и состоит из относительно обособленных лимфоидных долек. Все лимфатические узлы представлены несколькими лимфоидными дольками, то есть являются поликомпартментными. Максимальное количество лимфоидных долек установлено в

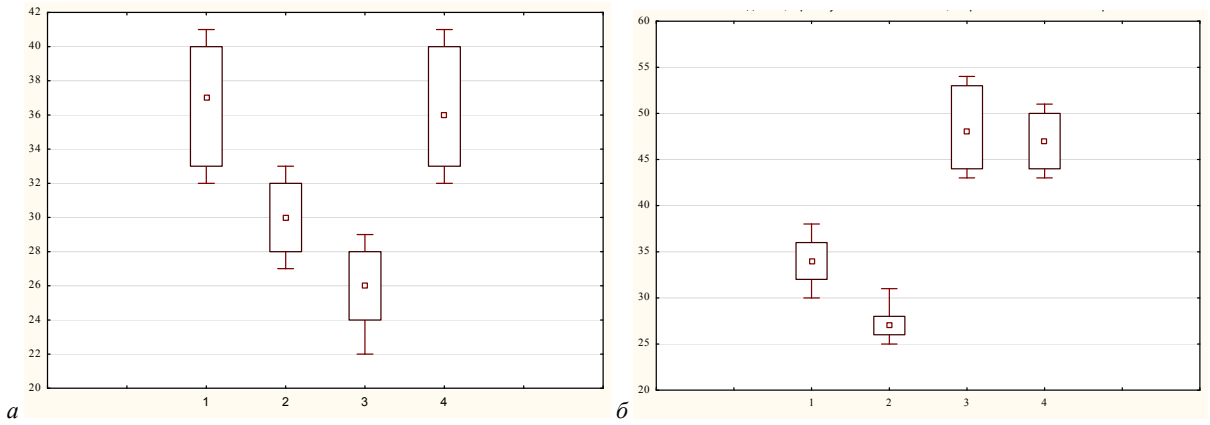
тотальных срезах соматовисцеральных лимфатических узлов. Минимальное количество данных структур характерно для подподвздошного и подмышечного лимфатических узлов, которые также имеют и минимальную абсолютную массу (Gavrilin, 2000). Количество лимфоидных долек в поверхностном шейном, подколенном и каудальном средостенном лимфатическом узлах практически равнозначно (рис. 1).

Таблица

Относительный объем (%) лимфоидной паренхимы и ее отдельных компонентов в лимфатических узлах различной локализации у новорожденных телят быка домашнего (V ± m, n = 6)

Лимфатический узел		Лимфоидная паренхима	Лимфоидные дольки (компартменты): центральные зоны единиц глубокой коры	интерфолликулярная зона	паракортикальные тяжи	лимфатические узелки: с центром размножения	лимфатические узелки: без центра размножения	мозговые тяжи
		I	II	III	IV	V	VI	VII
Поверхностный шейный	*a*	51,7 ± 3,2 ^{c,d,f}	7,25 ± 0,15 $^{b\text{-}f,h}$	9,34 ± 0,15 $^{b\text{-}d,f\text{-}h}$	13,62 ± 0,72 $^{c,d,e\text{-}h}$	0,12 ± 0,004 $^{b\text{-}h}$	0,12 ± 0,06 $^{b,c,e\text{-}h}$	21,30 ± 1,2 $^{c,d,f\text{-}h}$
Подподвздошный	*b*	51,2 ± 4,4 ^{c,d,f}	8,05 ± 0,12 $^{a,c,d\text{-}h}$	8,66 ± 0,14 $^{a,c\text{-}h}$	13,12 ± 0,52 $^{c,d,f\text{-}h}$	0,19 ± 0,003 $^{a,c\text{-}f}$	0,36 ± 0,03 $^{e\text{-}h}$	20,82 ± 1,01 $^{c\text{-}h}$
Подмышечный	*c*	36,8 ± 2,3 $^{a,b,d\text{-}h}$	4,22 ± 0,06 $^{a,b,d\text{-}h}$	6,83 ± 0,17 $^{a,b,e\text{-}h}$	9,09 ± 0,34 ^{a,b,e,f}	0,08 ± 0,004 $^{a,b,d\text{-}h}$	0,28 ± 0,02 $^{a,b,d\text{-}h}$	16,30 ± 0,92 $^{a,b,d\text{-}h}$
Подколенный	*d*	31,7 ± 2,2 $^{a\text{-}c,e\text{-}h}$	4,46 ± 0,03 $^{a\text{-}c,e\text{-}h}$	6,66 ± 0,13 $^{a,b,e\text{-}g}$	9,18 ± 1,13 ^{a,b,f}	0,03 ± 0,001 $^{a\text{-}c,e\text{-}h}$	0,16 ± 0,02 $^{b,c,e\text{-}h}$	11,21 ± 0,19 $^{a\text{-}c,e\text{-}h}$
Каудальный средостенный	*e*	56,5 ± 4,2 ^{c,d}	9,33 ± 0,14 $^{a\text{-}c,f\text{-}h}$	9,51 ± 0,12 ^{b,c,f,g}	11,24 ± 1,16 ^{a,c,h}	0,58 ± 0,02 $^{a\text{-}d,f\text{-}h}$	0,52 ± 0,03 $^{a\text{-}d,f,g}$	25,32 ± 2,46 ^{b,c,d}
Подвздошноободочный	*f*	65,6 ± 6,8 $^{a\text{-}h}$	11,85 ± 0,12 $^{a\text{-}c,e,g,h}$	10,44 ± 0,16 $^{a\text{-}c,e,g}$	11,57 ± 0,39 $^{a\text{-}d,h}$	1,12 ± 0,006 $^{a\text{-}e,g,h}$	1,86 ± 0,12 $^{a\text{-}e,g,h}$	28,76 ± 2,6 $^{a\text{-}d}$
Медиальный заглоточный	*g*	50,8 ± 4,4 ^{c,d,f}	7,11 ± 0,16 ^{b,c,e,f,h}	7,53 ± 0,18 $^{a\text{-}c,e,f}$	10,47 ± 0,84 ^{a,b}	0,20 ± 0,008 $^{a,c\text{-}f,h}$	0,94 ± 0,09 $^{a\text{-}f,h}$	24,55 ± 1,16 $^{a\text{-}d}$
Медиальный подвздошный	*h*	49,2 ± 3,4 ^{c,d,f}	6,36 ± 0,08 $^{a\text{-}c,e\text{-}h}$	6,38 ± 0,13 $^{a\text{-}c,e\text{-}g}$	9,20 ± 0,12 ^{a,b}	0,18 ± 0,003 $^{a,c\text{-}g}$	0,56 ± 0,04 $^{a\text{-}d,f\text{-}h}$	26,52 ± 1,3 $^{a\text{-}d}$

Примечание: латинскими буквами обозначена статистическая вероятность разницы $P < 0,05$ относительного объема (V) в пределах отдельных групп структурных компонентов (I–VII) в различных лимфатических узлах (*a* – *h*).



а *б*

Рис. 1. Количество лимфоидных долек на площади тотальных срединных сегментальных срезов лимфатических узлов: *а* – соматические лимфатические узлы: поверхностные (*1* – поверхностный шейный, *2* – подподвздошный), глубокие (*3* – подмышечный, *4* – подколенный); *б* – висцеральные лимфатические узлы (*1* – каудальный средостенный; *2* – подвздошноободочный); соматовисцеральные (*3* – медиальный подвздошный; *4* – медиальный заглоточный); по оси абсцисс – лимфатические узлы, по оси ординат – количество лимфоидных долек (шт.)

Лимфоидные дольки в пределах срединных срезов лимфатических узлов развиты и распределены крайне неравномерно. Как правило, наиболее развитые лимфоидные дольки концентрируются в центре сегментов. Вышеуказанная разница наиболее выражена в соматических лимфатических узлах. Значительная вариабельность лимфоидных долек относительно их размеров и степени развития может быть обусловлена особенностями лимфоснабжения данных органов. Каждой отдельной дольке в паренхиме лимфатических узлов млекопитающих соответствует один афферентный лимфатический сосуд, объем лимфотока и концентрация антигенов в лимфе которого, вероятно, и определяют степень развития лимфоидных долек (Sainte-Marie, 2010). Преимущественная локализация наиболее развитых лимфоидных долек в центре сегментов лимфатических узлов также может быть связана с особенностями распределения корней афферентных лимфатических сосудов, с их концентрацией в определенных участках капсулы органов.

Лимфоидные дольки лимфатических узлов новорожденных телят по своим характеристикам, в основном, соответствуют аналогичным образованиям данных органов у лабораторных животных. Во всех без исключения лимфатических узлах лимфоидные дольки располагаются в один ряд, вдоль краевого синуса. С боков лимфоидные дольки ограничены промежуточными синусами, которые часто сопровождают капсулярные трабекулы. В результате этого граница между лимфоидными дольками более четко выражена в их апикальных участках. В связи с тем, что капсулярные трабекулы более развиты и выражены в соматических и соматовисцеральных узлах, дольковая структура паренхимы данных узлов проявляется более четко. В висцеральных лимфатических узлах, из-за слабого развития трабекулярного аппарата и вследствие незначительного просвета промежуточных синусов, граница между лимфоидными дольками слабо различима. Вследствие этого в пределах паренхимы висцеральных лимфатических узлов форми-

руются «сросшиеся» боковыми поверхностями комплексы лимфоидных долек. В соматических лимфатических узлах лимфоидные дольки имеют преимущественно равномерную овальную форму с незначительными расширениями апикальной части. В висцеральных лимфатических узлах апикальная зона лимфоидных долек умеренно расширяется, что особенно характерно для узлов, расположенных в брюшной полости (рис. 2).

В составе лимфоидных долек паренхимы лимфатических узлов новорожденных телят обнаружены все без исключения компоненты, как и у половозрелых лабораторных животных. В гистологических препаратах данные компоненты представлены двумя основными морфотипами: лентообразными перисинусоидальными тяжами (интерфолликулярная зона, паракортикальные и мозговые тяжи) и округлыми образованиями (центральные зоны единиц глубокой коры или Т-зависимые зоны, лимфатические узелки или В-зависимые зоны) (Kaldjian et al., 2001). Степень развития соответствующих зон, как в целом в пределах паренхимы, так и среди отдельных лимфоидных долек имеет ряд существенных особенностей. Основным компонентом лимфоидных долек являются единицы глубокой коры, в которых четко различается округлая центральная зона, окруженная снаружи полукольцевидным участком паренхимы, обеспечивающим транзит лимфоцитов из сосудистого русла в паренхиму узлов. Данный участок представлен перисинусоидальными тяжами – корковым плато (интерфолликулярная зона) и периферической зоной глубокой коры (паракортикальными тяжами) (рис. 3). Корковое плато при этом является самостоятельной структурной единицей лимфоидных долек и граничит с краевым синусом, а паракортикальные тяжи относятся к периферическим участкам единиц глубокой коры и граничат, соответственно, с междольковыми или паракортикальными синусами.

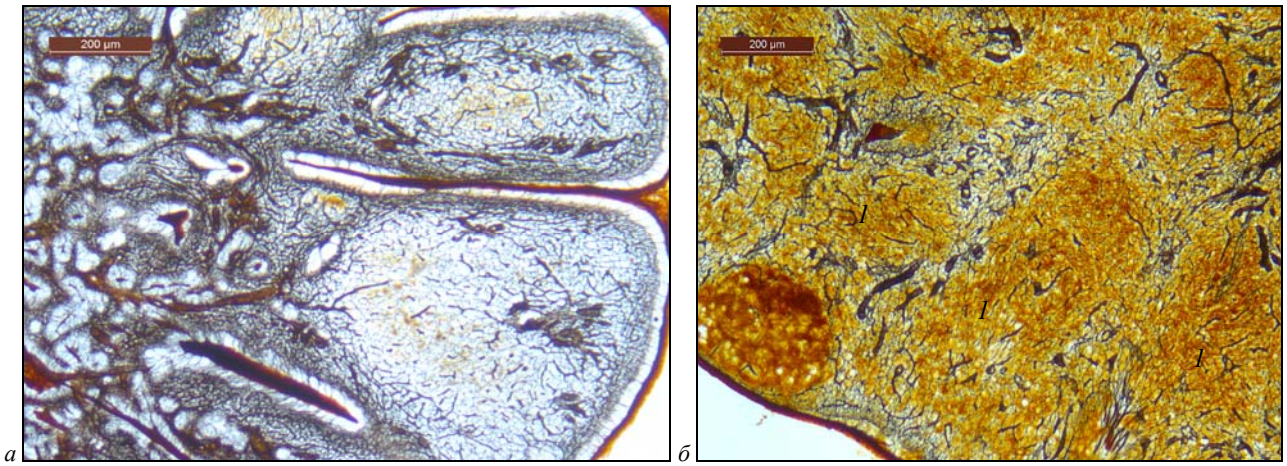


Рис. 2. Лимфоидные дольки в паренхиме соматических (*а*) и висцеральных (*б*) лимфатических узлов: импрегнация азотнокислым серебром

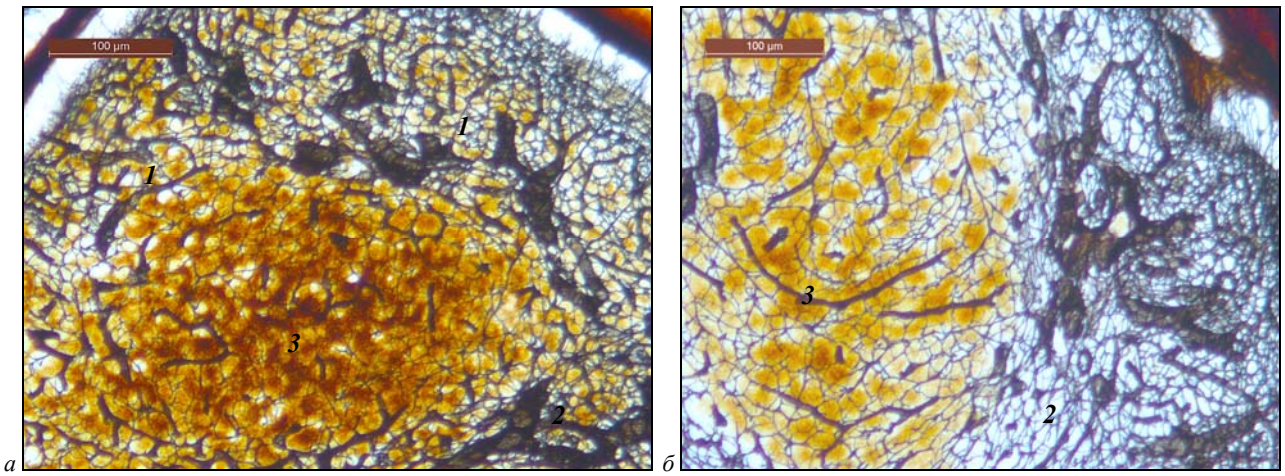


Рис. 3. Интерфолликулярная зона (*1*), паракортикальные тяжи (*2*) и центральная зона (*3*) единицы глубокой коры в поверхностном шейном (*а*) и подподвздошном (*б*) лимфатическом узле: импрегнация азотнокислым серебром

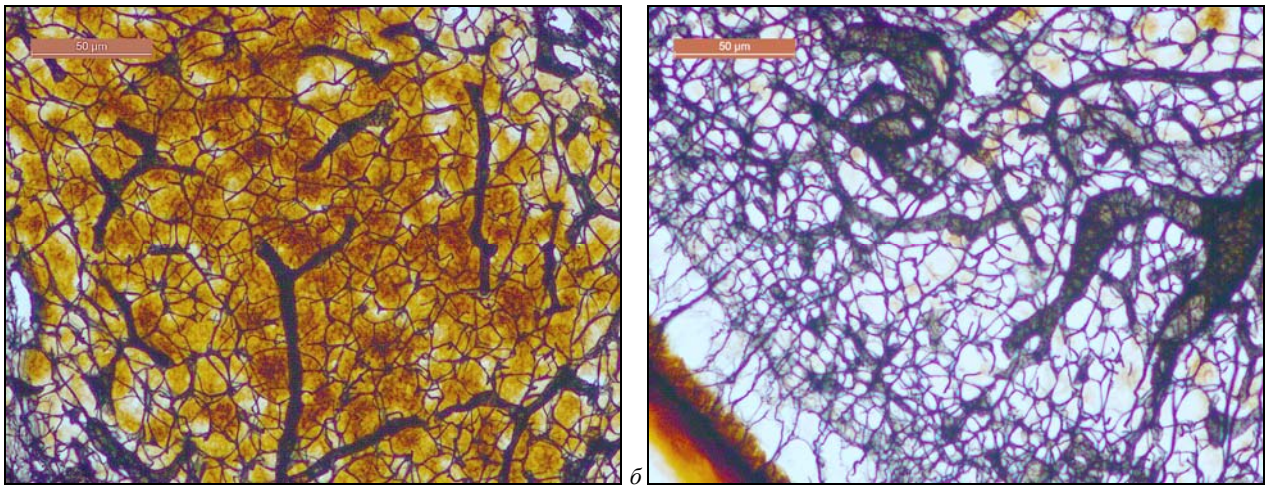
Плотность расположения фибробластических ретикулярных клеток и их отростков и, соответственно, ретикулярных волокон в различных участках лимфоидных долек значительно варьирует. В центральных зонах единиц глубокой коры ретикулярные волокна формируют равномерные широкопетлистые сети. В интерфолликулярных зонах и паракортикальных тяжах сети ретикулярных волокон абсолютно идентичны, преимущественно средне- и мелкопетлистые (рис. 4). Они образуют специфические ретикулярные уплотнения по всей периферии центральных зон единиц глубокой коры, за исключением их дистальных участков или кортико-медуллярного соединений, где происходит непосредственный контакт центральных зон единиц глубокой коры с мозговыми тяжами.

В гистопрепаратах, импрегнированных азотнокислым серебром в интерфолликулярных зонах и паракортикальных тяжах выявляется значительное количество кровеносных сосудов, в том числе и вен с высоким эндотелием (Sasaki et al., 1996; Ruddle, 2016; Ager, 2017).

Лимфатические узелки в лимфатических узлах новорожденных телят обнаруживаются в незначительных количествах не только в интерфолликулярной зоне, но и в паракортикальных тяжах. Для узелков без центров размножения характерны равномерные средне- и мелкопетлистые сети ретикулярных волокон. В узелках с центрами размножения ретикулярные сети их центральных участков в основном крупнопетлистые и плотные мелкопетлистые – в маргинальных зонах. Для мозго-

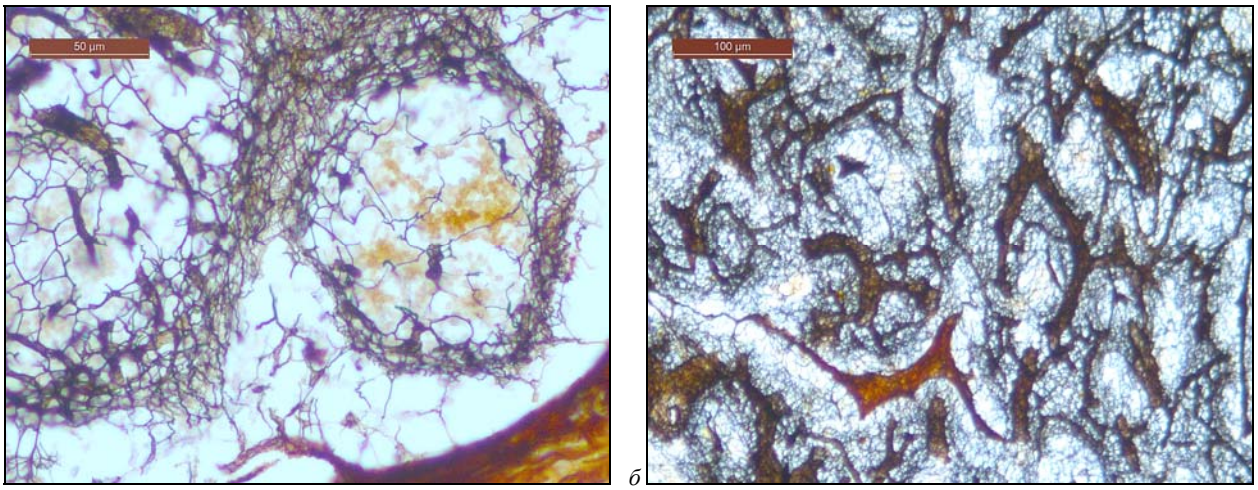
вых тяжей лимфатических узлов новорожденных телят характерны плотные мелкопетлистые сети ретикулярных волокон, которые равномерно окружают расположенные в основе тяжей кровеносные сосуды (рис. 5).

Степень развития отдельных компонентов лимфоидных долек у новорожденных телят имеет ряд особенностей, что обусловлено специфическими условиями развития данных органов в условиях ограниченного антигенного влияния (Gunnes et al., 1998; Sapin, 2006). «Полноценная» иммунокомпетентность развивается у 4–5-месячных плодов быка домашнего. Соответственно плоды данного возраста в состоянии адекватно реагировать на антигены и синтезировать антитела. По мнению исследователей (Buchvalder et al., 1981; Emeljanenko, 1987), развитие паренхимы вторичных лимфоидных органов у плодов млекопитающих связано как с воздействием на нее антигенов, проникающих через плацентарный барьер, так и собственных измененных белков, которые приобретают антигенные свойства. При этом влияние на лимфоидные органы обоих групп антигенов имеет крайне ограниченный характер, что, вероятно, и определяет особенности строения лимфоидных долек новорожденных особей млекопитающих.



а *б*

Рис. 4. Сети ретикулярных волокон в центральной зоне единицы глубокой коры (*а*) и интерфолликулярной зоне (*б*) медиального подвздошного лимфатического узла: импрегнация азотнокислым серебром



а *б*

Рис. 5. Сети ретикулярных волокон в лимфатическом узелке (*а*) и мозговых тяжах (*б*) подмышечного лимфатического узла: импрегнация азотнокислым серебром

Результаты наших исследований свидетельствуют, что участки лимфоидных долек, в которых происходит антигензависимая клональная пролиферация и, соответственно, локализация субпопуляций Т- и В-лимфоцитов, развиты относительно слабо. При этом Т-клеточные зоны развиты в гораздо большей степени, чем В-клеточные. Относительный совокупный объем центральных участков единиц глубокой коры в лимфатических узлах различных групп варьирует от 4,2% до 11,3%. Максимальные его показатели характерны для висцеральных лимфатических узлов, минимальные – для глубоких соматических. Средние значения данного показателя установлены в поверхностных соматических и соматовисцеральных лимфатических узлах. Совокупный относительный объем транзитных зон (интерфолликулярная зона, паракортикальные тяжи) в среднем в 2–3 раза превышает соответствующий показатель зон пролиферации и локализации Т-лимфоцитов. Эта разница наиболее выражена в глубоких соматических узлах, несколько меньше – в поверхностных соматических и соматовисцеральных и менее всего – в висцеральных лимфатических узлах. При этом совокупный относительный объем интерфолликулярных зон практически равнозначен объему паракортикальных тяжей. Так, во всех исследованных лимфатических узлах относительный объем паракортикальных тяжей превышает объем интерфолликулярных зон не более чем на 2–4%. Совокупный относительный объем мозговых тяжей в лимфатических узлах различных групп новорожденных телят незначительно отличается от показателей совокупной площади транзитных зон. В большинстве соматических лимфатических узлов, за исключением подколенного, относительный объем транзитных зон и мозговых тяжей практически равнозначны. В соматовисцеральных и висцеральных лимфатических узлах относительный совокупный объем мозговых тяжей на 5–11% превышает совокупный объем транзитных зон.

Лимфатические узелки в лимфоидной дольке лимфатических узлов новорожденных телят развиты незначительно. Их со-

вокупный относительный объем в большинстве лимфатических узлов не превышает 1% (за исключением висцеральных – 1–3%). Большая часть лимфатических узелков в паренхиме лимфатических узлов новорожденных телят относится к первичным, которые не содержат центры размножения.

Полученные результаты свидетельствуют, что в лимфоидных дольках паренхимы лимфатических узлов новорожденных телят обнаружены структуры, свидетельствующие об участии данных органов в реализации процессов антигензависимой клональной пролиферации Т- и В-лимфоцитов. В то же время основная масса лимфоидной паренхимы долек приходится на участки, обеспечивающие миграцию лимфоцитов, детекцию антигенов и аккумуляцию плазмоцитов. При этом уже у новорожденных животных различные зоны в лимфоидных дольках лимфатических узлов развиты крайне неравномерно, что зависит от локализации органов относительно кожи и слизистых оболочек.

Гистоархитектоника лимфоидных долек в лимфатических узлах новорожденных телят также весьма разнообразна и специфична. Топографически наиболее стабильными компонентами лимфоидных долек являются единицы глубокой коры. В соматических и соматовисцеральных лимфатических узлах они образуют цепь неравномерных по объему утолщений на границе с мозговыми тяжами и выглядят как отдельные шарообразные структуры с характерной архитектоникой сетей ретикулярных волокон. В висцеральных лимфатических узлах единицы глубокой коры могут «срастаться» боковыми поверхностями (паракортикальными тяжами), образуя в некоторых участках гантелеобразные утолщения (рис. 6). В отдельных единицах глубокой коры центральные зоны могут формировать боковые выросты (выпячивания), которые, как правило, находятся у основания базовой единицы, создавая картину многоярусного расположения соответствующих структур.

Лимфатические узелки (как первичные, так и вторичные) в лимфоидных дольках большинства лимфатических узлов новорожденных телят формируются в интерфолликулярной зоне на границе с краевыми синусами. При этом отдельные лимфатические узелки вдаются в просвет синуса, что наиболее выражено в глубоких соматических лимфатических узлах (рис. 7).

Абсолютные размеры лимфатических узелков в лимфоидных дольках соматических узлов новорожденных телят варьируют. Максимальный диаметр лимфатических узелков характерен для висцеральных лимфатических узлов, а минимальный – для глубоких соматических (рис. 8).

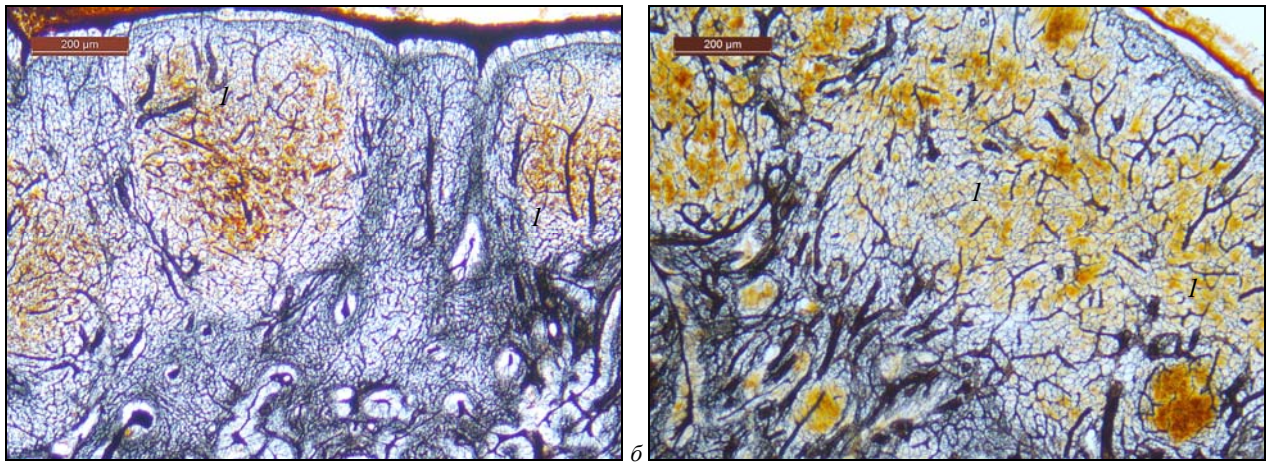


Рис. 6. Комплекс единиц глубокой коры (*1*) в соматическом (поверхностный шейный, *а*) и висцеральном (средостенный каудальный, *б*) лимфатическом узлах; импрегнация азотнокислым серебром

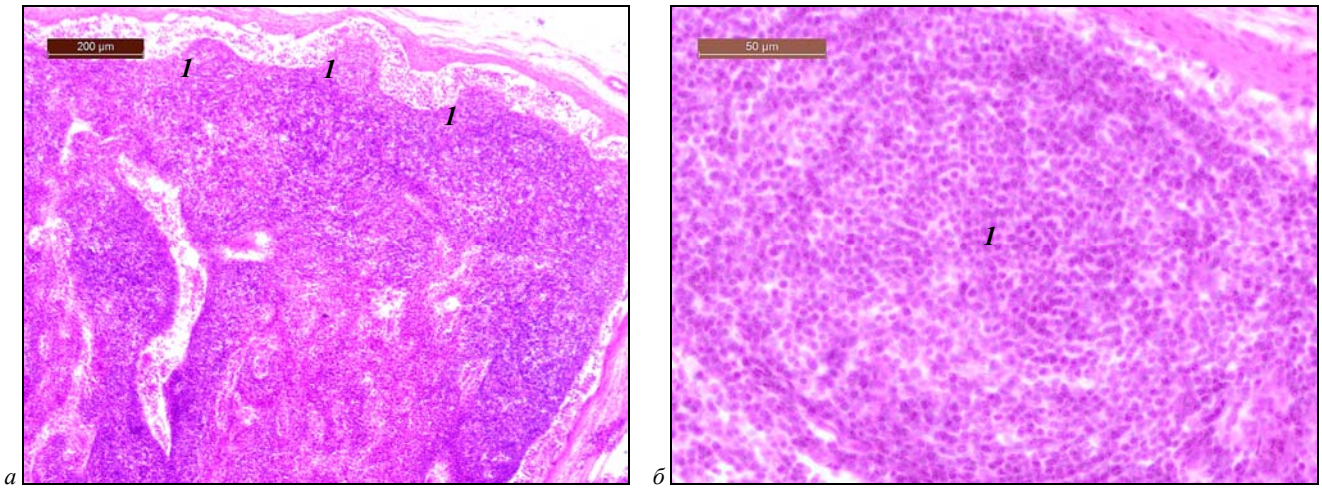
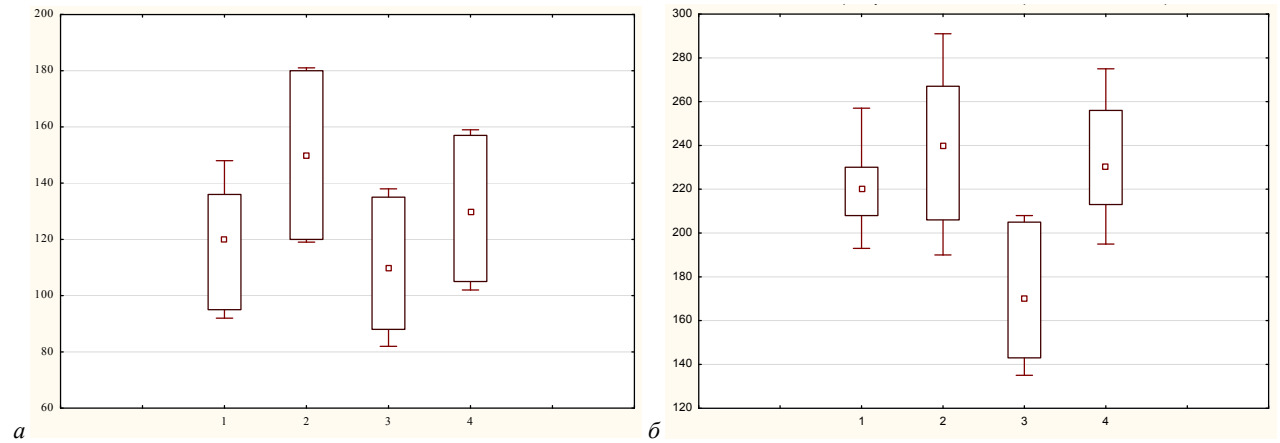


Рис. 7. Лимфатические узелки (*1*) в интерфолликулярной зоне подмышечного (*а*) и подвздошноободочного (*б*) лимфатических узлов; гематоксилин и эозин

В некоторых лимфатических узлах новорожденных телят (и, прежде всего, висцеральных) лимфатические узелки формируются в толще паракортикальных тяжей, что, вероятно, свидетельствует о возможности их развития в любых участках транзитных зон лимфоидных долек. Кроме того, в мозговых тяжах подвздошноободочных лимфатических узлов обнаруживаются незначительные утолщения, структура ретикулярной стромы которых аналогична строме лимфатических узелков, расположенных в пределах транзитных зон (рис. 9).

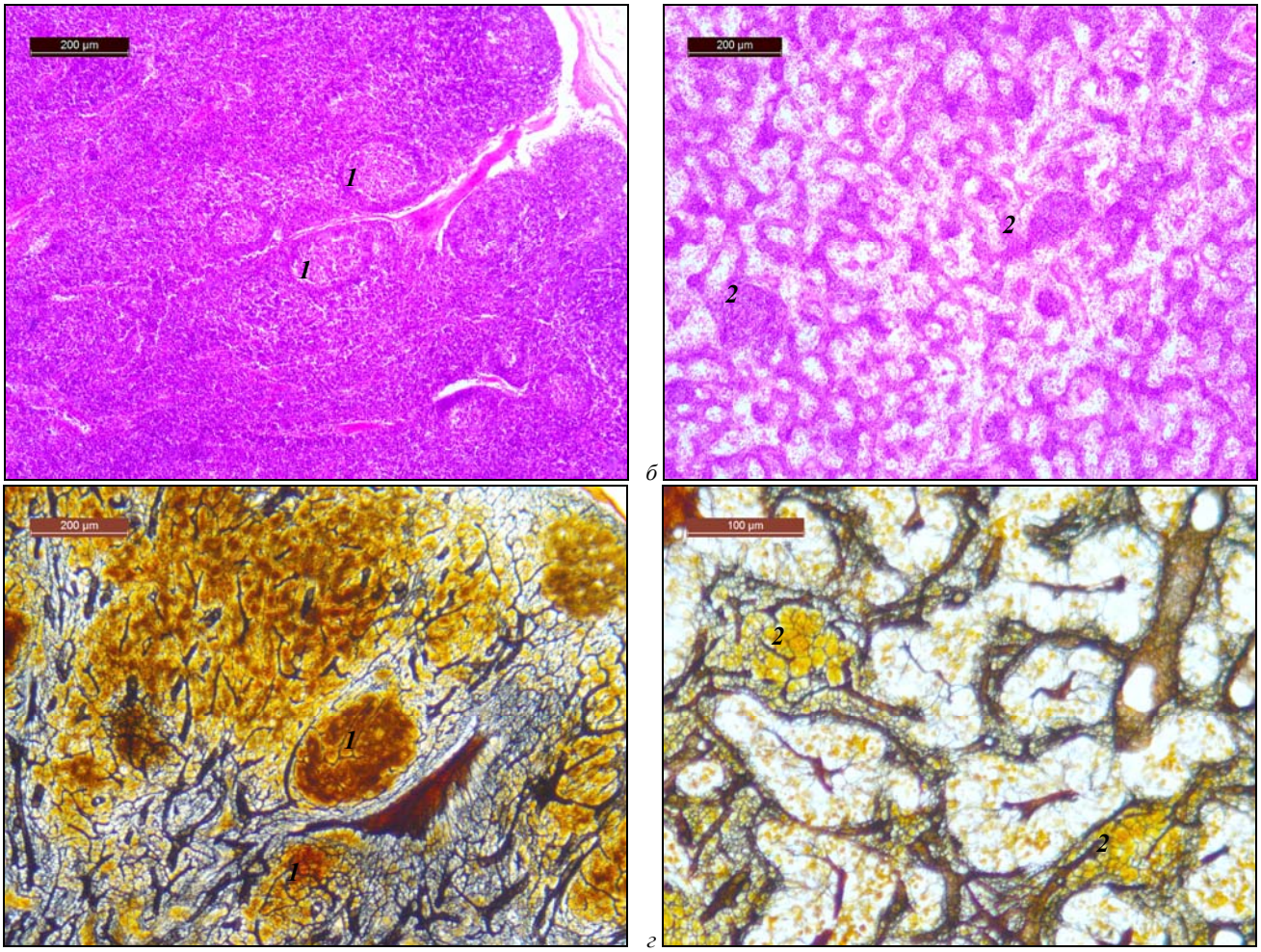
Факт развития лимфатических узелков исключительно на апикальных полюсах лимфоидных долек является приоритетным в большинстве научных публикаций (Rose et al., 1984).

В то же время гистоструктура и клеточный состав транзитных (интерфолликулярной и паракортикальной) зон, которые фактически являются внешней оболочкой зоны локализации и пролиферации Т-лимфоцитов, являются абсолютно аналогичными. Это в значительной степени объясняет возможность формирования лимфатических узелков в любых участках зон транзита лимфоидной дольки. Наличие узлообразных утолщений в мозговых тяжах висцеральных лимфатических узлов новорожденных телят может свидетельствовать о возможности формирования лимфатических узелков также в зонах преимущественной локализации антителосинтезирующих клеток. Данная особенность висцеральных лимфатических узлов описана в отдельных публикациях, где указывается, что она может быть обусловлена усиленной антигенной стимуляцией лимфатических узлов, регионарных для тонкого кишечника (Törö and Csaba, 1970; Sapin et al., 1978).



а *б*

Рис. 8. Диаметр лимфоидных узелков (мкм): *а* – соматические лимфатические узлы (поверхностные: *1* – поверхностный шейный, *2* – подподвздошный), глубокие (*3* – подмышечный, *4* – подколенный); *б* – висцеральные лимфатические узлы (*1* – каудальный средостенный, *2* – подвздошноободочный), соматовисцеральные (*3* – медиальный подвздошный, *4* – медиальный заглоточный); по оси абсцисс – лимфатические узлы, по оси ординат – диаметр лимфоидных узелков (мкм)



а *б* *в* *г*

Рис. 9. Лимфатические узелки (*1*) в паракортикальных тяжах каудального средостенного (*а*, *в*) лимфатического узла: узлообразные утолщения (*2*) на основе мозговых тяжей подвздошноободочного (*б*, *г*) лимфатического узла; *а*, *б* – гематоксилин и эозин, *в*, *г* – импрегнация азотнокислым серебром

Таким образом, структурно-функциональными единицами паренхимы лимфатических узлов новорожденных телят быка домашнего являются лимфоидные дольки, которые к моменту рождения достаточно сформированы, имеют ряд характерных черт строения и гистоархитектоники. Высокая степень морфофункциональной зрелости лимфоидной паренхимы у новорожденных особей быка домашнего определяется, вероятно, двумя основными биологическими факторами: наличием у парнокопытных наиболее совершенных систем жизнеобеспечения в целом и зрелорождаемостью или матуронатностью как одной из характерных черт организменного статуса копытных млекопитающих. У новорожденных имматуронатных видов млекопитающих в паренхиме лимфатических узлов отсутствуют признаки структурно-функциональной дифференциации и зональной специализации (Krishtoforova, 2007).

Выводы

У новорожденных особей быка домашнего паренхима лимфатических узлов отличается высокой степенью морфофункциональной дифференциации и имеет выраженную дискретную структуру с подразделением на лимфоидные дольки (компартменты), которые представлены комплексом отдельных специализированных зон в виде тяжей лимфоидной ткани (интерфолликулярные, паракортикальные и мозговые тяжи) и сферообразных лимфоидных структур (центральные зоны единиц глубокой коры и лимфатические узелки). Количественные характеристики компонентов лимфоидных долек в различных группах лимфатических узлов значительно варьируют. Они максимальны в висцеральных лимфатических узлах и минимальны в глубоких соматических.

Наиболее развитыми компонентами лимфоидных долек (компартментов) лимфатических узлов новороженных особей быка домашнего являются перисинусоидальные тяжи лимфоидной ткани (интерфолликулярные, паракортикальные, мозговые). Среди сферообразных (округлых) клеточных зон во всех исследованных группах узлов преобладают участки клональной пролиферации Т-лимфоцитов (центральные зоны единиц глубокой коры), а в целом специализированные клеточные зоны максимально развиты в лимфатических узлах кожи и слизистых оболочек и минимально – в глубоких соматических лимфатических узлах.

В пределах каждой лимфоидной дольки наиболее стабильными в топографическом отношении компонентами являются перисинусоидальные тяжи лимфоидной ткани, затем следуют центральные зоны единиц глубокой коры, которые могут формировать дочерние структуры (боковые выпячивания). Наиболее лабильными компонентами лимфоидных долек являются лимфатические узелки, локализующиеся в любом участке тяжей лимфоидной ткани коры узлов и в мозговых тяжах.

Дальнейшие исследования особенностей структуры паренхимы лимфатических узлов быка домашнего будут направлены на изучение закономерностей развития компартментов паренхимы узлов в постнатальном онтогенезе, в том числе при различных технологиях выращивания животных и, соответственно, различной интенсивности и характере действия антропогенных факторов.

References

Ager, A. (2017). High endothelial venules and other blood vessels: Critical regulators of lymphoid organ development and function. Frontiers in Immunology, 8(3), 1–16.

Andrian, U. H., & Mempel, T. R. (2003). Homing and cellular traffic in lymph nodes. Nature Reviews Immunology, 3, 867–878.

Avtandilov, G. G. (1990). Meditsinskaya morfometrya [Medical morphometry]. Medicine, Moscow (in Russian).

Azzi, J., Yin, Q., Uehara, M., Ohori, S., Tang, L., Cai, K., Ichimura, T., McGrath, M., Maarouf, O., Kefaloyianni, E., Loughhead, S., Petr, J., Sun, Q., Kwon, M., Tullius, S., von Andrian, U. H., Cheng, J., & Abdi, R. (2016). Targeted delivery of immunomodulators to lymph nodes. Cell Reports, 15(6), 1202–1213.

Belisle, C., & Sainte-Marie, G. (1981). Tradimentional study of the deep cortex of the rat lymph node. III. Morphology of the deep cortex units. The Anatomical Record, 199(2), 213–226.

Buhvalder, R., Fuks, H., & Hayder, G. (1981). Osnovyi immuniteta. Immunoprofilaktika bolezney zhivotnyih [The basis of immunity. Immunoprophylaxis of animal diseases]. Kolos, Moscow (in Russian).

Butler, J., Sawtell, A., Jarrett, S., Cosgrove, J., Leigh, R., Timmis, J., & Coles, M. (2016). Imaging immunity in lymph nodes: Past, present and future. Advances in Experimental Medicine and Biology, 915, 329–346.

Capece, T., & Kim, M. (2016). The role of lymphatic niches in T cell differentiation. Molecules and Cells, 39(7), 515–523.

Chandrasekaran, S., & King, M. R. (2014). Microenvironment of tumor-draining lymph nodes: Opportunities for liposome-based targeted therapy. International Journal of Molecular Sciences, 15(11), 20209–20239.

De Bruyn, P. P., & Cho, Y. (1990). Structure and function of high endothelial postcapillary venules in lymphocyte circulation. Current Topics in Pathology, 84(1), 85–101.

Elmore, S. A. (2006). Enhanced histopathology of the lymph nodes. Toxicologic Pathology, 34(5), 634–647.

Emelyanenko, P. A. (1987). Immunologia zhivotnych v period vnytriutrobnogo razvitia [Immunology of animals in the period of intrauterine development]. Agropromizdat, Moscow (in Russian).

Gavrilin, P. N. (1999). Modificatsiya sposoba impregnatsii serebrom po Futy gistotopogramm organov krovetvoreniya, izgotovlennyih na microtome-kriostate [Modification of the silver impregnation method according to Fut histotopograms of hemopoietic organs made on a microtome cryostat]. Vestnik Morphologii, 5(1), 106–108 (in Russian).

Gavrilin, P. N. (2000). Osoblyvosti dynamiky masy limfoi'dnyh organiv u teljat neonatal'nogo i molochnogo periodiv [Features of the dynamics of the mass of lymphoid organs in neonatal and dairy calves]. Agrarnyj Visnyk Prychornomorya, 4(9), 24–29 (in Ukrainian).

Gavrilin, P. N., Prokushenkova, O. H., Masjuk, D. N., & Perepechaeva, N. H. (2013). Peculiarities of structural and functional organization of Domestic Bull's lymph nodes parenchyma (*Bos primigenius taurus* L.). Naukovyj Visnyk Nycionalnogo Universytetu Bioresursiv i Pryrodokorystuvannja Ukrainy, 188(1), 92–101 (in Ukrainian).

Geptner, V. C., Naumov, N. P., & Jurgenson, P. B. (1961). Mlekopitajushhie Sovetskogo Sojuza. Parnokopytnye i mozolenogie [Mammals of the Soviet Union. Clovenhoofed and soliped]. Moscow (in Russian).

Gretz, J. E., Anderson, C. C., & Shaw, S. (1997). Cords, channels, corridors and conduits, critical architectural facilitating cell interactions in the lymph node cortex. Immunological Reviews, 156, 11–24.

Gunnes, G., Press, C., Tverdal, A., & Landsverk, T. (1998). Compartments within the lymph node cortex of calves and adult cattle differ in the distribution of leukocyte population: An immunohistochemical study using computer-assisted morphometric analysis. Developmental and Comparative Immunology, 22(1), 111–123.

Hoshi, N., Hashimoto, Y., Kitagawa, H., Kon, Y., & Kudo, N. (1986). Histological and immunohistochemical studies on the architecture of lymph nodes in pig. Japan Journal Veterinary Science, 48(6), 1097–1107.

Houston, S. A., Cerovic, V., Thomson, C., Brewer, J., Mowat, A. M., & Milling, S. (2016). The lymph nodes draining the small intestine and colon are anatomically separate and immunologically distinct. Mucosal Immunology, 9(2), 468–478.

Ikomi, F., Kawai, Y., & Ohhashi T. (2012). Recent advance in lymph dynamic analysis in lymphatics and lymph nodes. Annals of Vascular Diseases, 5(3), 258–268.

Iwasaki, R., Mori, T., Ito, Y., Kawabe, M., Murakmi, M., & Maruo, K. (2016). Computed tomographic evaluation of presumptively normal canine sternal lymph nodes. Journal of the American Animal Hospital Association, 52(6), 371–377.

Jafarnejad, M., Woodruff, M. C., David, C. Z., Michael, C. C., & Moore, J. E. (2015). Modeling lymph flow and fluid exchange with blood vessels in lymph nodes. Lymphatic Research and Biology, 13(4), 234–247.

Jia, L., Xie, Z., Zheng, J., Liu, L., He, Y., Liu, F., & He, Y. (2012). Morphological studies of lymphatic labyrinths in the rat mesenteric lymph node. The Anatomical Record, 295, 1291–1301.

Kaldjian, E. P., Gretz, J. E., Anderson, A. O., Shi, Y., & Shaw, S. (2001). Spatial and molecular organization of lymph node T cell cortex: A labyrinthine cavity bounded by an epithelium-like monolayer of fibroblastic reticular cells anchored to basement membrane-like extracellular matrix. International Immunology, 13(10), 1243–1253.

Katakai, T., Hara, T., & Lee, J. H. (2004). A novel reticular stromal structure in lymph node cortex: An immuno-platform for interactions among dendritic cells, T cells and B cells. International Immunology, 16(8), 1133–1142.

Kelly, R. H. (1975). Functional anatomy of lymph nodes. The paracortical cords. International Archives of Allergy and Immunology, 48(6), 836–849.

Koljakov, J. E. (1986). Veterinarnaja immynologija [Veterinary immunology]. Agropromizdat, Moscow (in Russian).

Konenkov, V. I., Shkyrat, G. A., & Kolesnikov, A. P. (2008). Limfaticheksij uzel: Morfofunkcional'naja harakteristika i mezhkletochnaja kooperacija [Lymph node: Morphofunctional characteristic and intercellular cooperation.]. Vestnik Limfologii, 4, 35–43 (in Russian).

Kowala, M. C., & Schoefi, G. I. (1986). The popliteal lymph node of the mouse: Internal architecture, vascular distribution and lymphatic supply. Journal of Anatomy, 148(1), 25–46.

Krishtoforova, B. V., Lemeshenko, V. V., & Stegnej, Z. G. (2007). Biologichni osnovy veterynarnoi' neonatologii' [Biological basis of veterinary neonatology]. Simferopol (in Ukrainian).

Lee, C. M., Park, D. W., Park, S., Kim, J. H., Park, S. H., & Kim, C. S. (2017). Lymph node dissection using bipolar vessel-sealing device during reduced port laparoscopic distal gastrectomy for gastric cancer: Result of a pilot study from a single. Journal of Laparoendoscopic and Advanced Surgical Techniques, 2017, 27.

Margaris, K. N., & Black, R. A. (2012). Modelling the lymphatic system: Challenges and opportunities. Journal of the Royal Society Interface, 69, 1–12.

Nicander, L., Nafstad, P., Landsverk, T., & Engebretsen, R. H. (1991). A study of modified lymphatics in the deep cortex of ruminant lymph nodes. Journal of Anatomy, 178, 203–212.

Ohtani, O., & Ohtani, Y. (2008). Structure and function of rat lymph nodes. Archives of Histology and Cytology, 71(2), 69–76.

Olson, M. R., McDermott, D. S., & Varga, S. M. (2012). The initial draining lymph node primes the bulk of the CD8 T cell response and influences memory T cell trafficking after a systemic viral infection. PLOS Pathogens, 8(12), 1–15.

Palm, E. A., Friedrich, C. H., & Kleinau, S. (2016). Nodal marginal zone B cells in mice: A novel subset with dormant self-reactivity. Scientific Reports, 6(27687), 1–11.

Platt, A. M., & Randolph, G. J. (2013). Dendritic cell migration through the lymphatic vasculature to lymph nodes. Advances in Immunology, 120, 51–68.

Rouse, R. V., Reichert, R. A., Gallatin, W. M., Weissman, I. L., & Bucher, E. C. (1984). Localization of lymphocyte subpopulation in peripheral lymphoid organs: Directed lymphocyte migration and segregation into specific microenvironments. American Journal of Anatomy, 170, 391–405.

Ruddle, N. H. (2016). High endothelial venules and lymphatic vessels in tertiary lymphoid organs: Characteristics, functions, and regulation. Frontiers in Immunology, 9(7), 1–7.

Sainte-Marie, G. (2010). The lymph node revisited: Development, morphology, functioning, and role in triggering primary immune responses. Anatomical Record, 293(2), 32–37.

Sapin, M. R. (2006). Osobennosti imunnogo otveta pri razlichnych vnechnich vozdeistviyah [Features of the immune response under various external influences]. Morphology, 129(4), 109–110 (in Russian).

Sapin, M. R., Jurina, N. A., & Etingen, L. (1978). Limfaticheskij uzel [Lymph node]. Medicine, Moscow (in Russian).

Sasaki, K., Okouchi, Y., Rothkotter, H. J., & Pabst, R. (1996). Ultrastructural localization of the intercellular adhesion molecule (ICAM-1) on the cell surface of hight endothelial venules in lymph nodes. Anatomical Record, 244(1), 105–111.

Shipman, W. D., Dasoveanu, D. C., & Lu, T. T. (2017). Tertiary lymphoid organs in systemic autoimmune diseases: Pathogenic or protective? F1000Res., 28(6), 1–7.

Sixt, M., Kanazawa, N., Selg, M., Samson, T., Roos, G., Reinhardt, D. P., Pabst, R., Lutz, M. B., & Sorokin, L. (2005). The conduit system transports soluble antigens from the afferent lymph to resident dendritic cells in the T-cell area of the lymph node. Immunity, 22(1), 19–29.

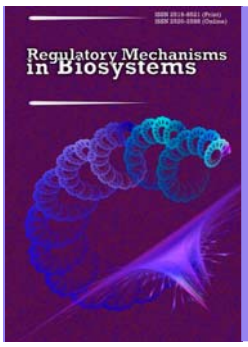
Törö, Y., & Csaba, J. (1970). Az ember normalis es pathologies fejlodese [The human pathologies and normal development]. Budapest (in Hungarian).

Vyrenkov, Y. E., Shishlo, V. K., Antropova, J. G., & Ryzhova, A. V. (1995). Sovremennye dannye o strukturno-funkcional'noj organizacii limfaticheskogo uzla [Modern data on the structural and functional organization of the lymph node]. Morphology, 103(3), 34–40 (in Russian).

Willard-Mack, C. L. (2006). Normal structure, function, and histology of lymph nodes. Toxicologic Pathology, 34(5), 409–424.

Zelenevsky, N. V. (2013). Mezhdunarodnaja veterinarnaja anatomicheskaja nomenklatura na latinskom i russkom jazykah. Nomina Anatomica Veterinaria [International veterinary anatomical nomenclature in Latin and Russian. Nomina Anatomica Veterinaria]. Mir, Sankt-Peterburg (in Russian).

Zidan, M., & Pabst, R. (2012). Histological, histochemical and immunohistochemical study of the lymph nodes of the one humped camel (*Camelus dromedarius*). Veterinary Immunology and Immunopathology, 145, 191–198.



Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(2), 179–184
doi: 10.15421/021728

Effect of external lighting on biopotential of maize leaves caused by pulsed temperature stimulation

M. P. Motsnyj, N. P. Botsva, O. V. Elina, D. V. Chernetchenko, L. Y. Sadovskaya, O. Y. Tykhomyrov

Oles Honchar Dnipro National University, Dnipro, Ukraine

Article info

Received 29.03.2017
Received in revised form 15.04.2017
Accepted 26.04.2017

Oles Honchar Dnipro National University, Gagarin Ave., 72, Dnipro, 49010, Ukraine.
Tel.: +38-056-760-85-06.
E-mail: kef.dnu@gmail.com

Motsnyj, M. P., Botsva, N. P., Elina, O. V., Chernetchenko, D. V., Sadovskaya, L. Y., & Tykhomyrov, O. Y. (2017). Effect of external lighting on biopotential of maize leaves caused by pulsed temperature stimulation. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(2), 179–184. doi:10.15421/021728

Study of electrophysiological indicators of the condition and behavior of plants has become more important in the development of farming activities and the search for effective ways to improve the productivity of crops. The influence of external light on the adaptive ability of corn leaf cells to rhythmic cold stimulation was determined experimentally. The method of rhythmic cold stimulation is not adequate for the studied plants, but its application allows us to evaluate the stability of plant cells to external stimuli. The method consists in repeating irritation during the time period of less duration than the relative refractory phase, which causes a response of less than the previous amplitude. Because of this in the system there is a negative feedback that leads to stabilization of the amplitude of biopotentials that are registered. Rhythmic cold stimulation was applied to the leaf with the help of a quick-response thermostimulator. Rhythm cold stimuli and settings of pulses were set by computer software. Cooling temperature was controlled using miniature differential thermocouple. Potentials of the leaf surface was diverted by an unpolarized macroelectrode and after a preamplifier fed to the input of the USB oscilloscope connected to the computer. Analysis of the results of experiments was performed using automated developed software. As a result, we experimentally established that rhythmic stimulation of leaves by cold leads to stabilization of responding potential. The level of stabilization depends on the frequency of cold stimuli and describes the adaptive properties of the system causing the biopotential. We found that the absence of photosynthesis when there is a deficit outdoor lighting leads to a significant increase in the average level of stabilized responses, indicating increased stability of the system to external influences. The maximum of this increase fell on the fourth day. This increase is likely to be due to the restructuring of functional ion transport through cell membranes, generating potentials registered. In the interval 4–9th days there was a significant decrease in stabilization, probably due to adaptation of plant cells to a lack of light, or depletion of ATP, which provides the active transport of ions across the cell membrane.

Keywords: bioelectrical potentials registration; photoinduced potentials; cold stimuli; relative refractory phase; photosynthesis

Вплив зовнішнього освітлення на біопотенціали листя кукурудзи, викликані ритмічними температурними подразненнями

М. П. Моцний, Н. П. Боцьва, О. В. Єліна, Д. В. Чернетченко, Л. Я. Садовська, О. Є. Тихомиров

Дніпровський національний університет імені Олеся Гончара, Дніпро, Україна

Вивчення електрофізіологічних показників стану та поведінки рослин стає актуальнішим в умовах розвитку агротехніки та активного пошуку ефективних шляхів підвищення продуктивності сільськогосподарських культур. Дослідження присвячені експериментальному визначенню впливу зовнішнього освітлення на адаптивну спроможність клітин листя кукурудзи до ритмічної холодової стимуляції. Метод холодової частотної стимуляції не адекватний для досліджуваної рослини, але його застосування дозволяє оцінити стійкість клітин рослини до зовнішніх подразнень. Суть методу полягає у повторюванні подразнення через часовий проміжок, менший тривалості відносної рефрактерної фази, що спричиняє відповідь із меншою, ніж попередня, амплітудою. Через це у системі виникає від'ємний зворотний зв'язок, який зумовлює стабілізацію амплітуди біопотенціалів. Ритмічні холодові подразнення наносили на листок за допомогою малоінерційного термостимулятора. Ритм подразнень і параметри холодових імпульсів задавали з комп'ютера програмно. Температуру охолодження контролювали за допомогою мініатюрної диференціальної термопари. Потенціали з поверхні листка відводили неполяризованим макроелектродом і після попереднього підсилення подавали на вхід USB осцилографа, поєднаного з комп'ютером. Аналіз результатів експериментів здійснювали автоматизовано за допомогою розробленого програмного забезпечення. У результаті експерименту встановлено, що ритмічна холодова стимуляція листя спричиняє стабілізацію рівня потенціалу відповідей. Рівень стабілізації залежить від частоти холодових подразнень і характеризує адаптивні властивості системи, що викликає біопотенціали. Відсутність фотосинтезу за дефіциту зовнішнього освітлення викликає значне підвищення середнього рівня стабілізованих відповідей, що свідчить про підвищення стійкості системи до зовнішніх впливів. Максимум такого підвищення припадає на четверту добу. Таке підвищення, можливо, пов'язане з функціональною перебудовою іонного транспорту через мембрани клітин, які генерують

зареєстровані потенціали. В інтервалі 4–9-ї доби спостерігали суттєве зниження рівня стабілізації, що, імовірно, пов'язано або з адаптацією клітин рослин до відсутності освітлення, або з виснаженням запасів АТФ, яка забезпечує активний транспорт іонів через клітинну мембрану.

Ключові слова: реєстрація біоелектричних потенціалів; фотоіндуковані потенціали; холодові стимули; відносна рефрактерність; фотосинтез

Вступ

Методи електрофізіологічної діагностики життєдіяльності рослин постійно привертають увагу дослідників. Інтерес до вивчення електрофізіологічних показників стану та поведінки рослин стає актуальнішим за розвитку агротехніки та активного пошуку ефективних шляхів підвищення продуктивності сільськогосподарських культур. Завдання дослідників полягає у пошуку ефективних у діагностичному відношенні біоелектричних показників і встановленні, яку саме інформацію про життєдіяльність рослин вони несуть.

Сучасні дослідження спрямовані на визначення агрономічної продуктивності, стійкості та механізмів адаптації рослин до компонентів клімату та екологічних стресів (Wijewardana et al., 2016), зокрема, екстремальних холодових і теплових впливів (Tao et al., 2016), дефіциту води та підвищеної солоності (Álvarez and Sánchez-Blanco, 2015; Zheng et al., 2015; Bendaly et al., 2016). Автори відмічають наявність зв'язку між фізіологічними показниками, екологічними факторами та процесами фотосинтезу в рослинах. При цьому дослідники насамперед приділяють увагу таким важливим для різних регіонів планети культурам як пшениця (Vodeneev et al., 2012; Wijewardana et al., 2016), соняшник (Zhou et al., 2014) та кукурудза (Zheng et al., 2015; Tao et al., 2016).

Окремий напрям досліджень – забезпечення безперервного та неушкоджувального прижиттєвого контролю за розвитком рослин під час вирощування в контрольованих умовах. Цілям ефективного планування та оптимізації умов вирощування відповідають біоелектричні потенціали, що реєструються з тих або інших органів рослин (Ríos-Rojas et al., 2014). Наприклад, електричні властивості листя можна використати для ефективного оцінювання водного стресу (Zheng et al., 2015).

Останнім часом у стадії експериментальних розробок перебувають дослідження ролі біоелектричних сигналів у внутрішньоклітинних та міжклітинних комунікаціях (Vodeneev et al., 2012; Volkov et al., 2013b). Існує думка, що різні види стимуляції (зокрема, дотики, тепловий стрес, світло або темрява) викликають характерні сигнали, кожен з яких має специфічний вплив на фізичні процеси у рослинах (Volkov et al., 2013a; Gallé et al., 2015).

У рослинах спостерігають два основні типи електричних сигналів: швидкі потенціали дії та повільні варіаційні потенціали (Gallé et al., 2015), і якщо потенціали дії в рослинах, подібно до потенціалів дії в нейронах, підкоряються закону «все або нічого», то варіаційні потенціали корелюють із силою стимулу та тривають набагато довше.

Сучасні електровимірювальні засоби здатні забезпечити різні як контактні, так і дистанційні методики реєстрації біопотенціалів, зокрема внутрішньоклітинні (Surova et al., 2016) або чотирьохелектродні позаклітинні (Zheng et al., 2015).

Електричні сигнали рослин містять низькочастотні складові як за наявності, так і за відсутності зовнішніх подразнень (Das et al., 2015). Через певну хаотичність таких змін з'ясування кількісних залежностей між стимулом і частотою електричної реакції наразі ускладнюється, хоча і розроблені методики та певні апаратні засоби усунення випадкової складової нестимульованих сигналів (Das et al., 2015).

Дослідники звертають увагу на зв'язок електричних сигналів із процесами дихання та фотосинтезу (Gallé et al., 2015). Процеси фотосинтезу, в яких ключовими датчиками темряви та зміни інтенсивності світла в широкому діапазоні температур вважаються хлоропласти, тісно пов'язані з акліматизацією до холодових впливів (Szechyńska-Hebda and Karpiński, 2013; Szechyńska-Hebda et al., 2015). Наявні дані про зв'язок термоіндукованих варіаційних потенціалів із фотосинтезом, зокрема, за низької освітленості (Surova et al., 2016). Низька температура у темряві суттєво впливає також на біохімічні реакції рослин (Gálvez-Valdivieso et al., 2015).

Фотоіндуковані біопотенціали нині вивчено недостатньо, існують лише модельні дослідження (Lyu and Lazár, 2017) та окремі експерименти з вивчення впливу на біопотенціали інтенсивності та довжини хвилі світла (Motsnyj et al., 2011; Chernetchenko et al., 2015). Висловлюється припущення про особливий механізм генерації фотоіндукованих потенціалів, пов'язаний зі світловою активацією АТФ-фази хромопластів (Trebacz and Sievers, 1998; Stahlberg et al., 2006). Недостатньо вивченим залишається також зв'язок електрогенезу із процесом фотосинтезу.

Мета цього дослідження – визначити вплив зовнішнього освітлення на адаптивну спроможність клітин листя кукурудзи до ритмічної холодової стимуляції. Досліджено біопотенціали листя, викликані ритмічними холодовими подразненнями.

Матеріал і методи досліджень

Досліди проводили на паростках кукурудзи сорту Кадр. Відібране насіння висівали у спеціальні грошики, заповнені грунтом, та рясно поливали. Через 24 доби після проростання паростки використовували в експериментах.

Застосовано універсальну установку для дослідження біопотенціалів рослин (Chernetchenko et al., 2013). Паростки розміщували в екранованій камері, листок розташовували на робочій поверхні портативного напівпровідникового термостимулятора. У зоні охолодження розташовували активний відвідний неполяризований електрод. Пасивний електрод розташовували на частині листка, що не охолоджувалася. Температуру під активним електродом контролювали за допомогою портативної диференціальної термопари, електроди з'єднували з підсилювачем, сигнал із виходу якого надходив одночасно на входи самописця та USB осцилографа IrisWaveware, сполученого з персональним комп'ютером. Тривалість імпульсу задавали за допомогою реле часу. Температуру термостимулятора регулювали зміною струму та контролювали за допомогою цифрового амперметра. Для калібрування застосовували спеціальний генератор.

Отримання даних у цифровому форматі дає змогу за допомогою розробленого програмного забезпечення проводити автоматизований аналіз результатів експерименту. Спеціальна програма мовою C^{++} для обробки масиву відцифрованих даних дозволяє швидко та зручно отримати значення амплітуди біопотенціалу відповіді, зберегти поточні значення досліджуваних параметрів, накопичувати типові результати та проводити усереднення (Chernetchenko et al., 2013).

Програма обробляє масив даних та відбирає потрібні для аналізу точки, значення яких заносяться в таблицю. У таблицю може бути записано одночасно декілька результатів відбору даних, що дозволяє накопичення декількох результатів для певного типу експерименту з подальшим їх усередненням і знаходженням надійних інтервалів. Приймаючи середнє значення амплітуди першої після подразнення відповіді за 100%, програма розраховує значення всіх інших амплітуд серії у відсотковому відношенні до першої. Отримані результати обробки даних зберігаються в окремому файлі й можуть бути використані для подальшого аналізу. При розрахунках надійних інтервалів для вибіркових середніх надійність задається на рівні 0,85.

Результати

У першій серії дослідів застосовували холодові імпульси тривалістю 5 с із зниженням температури на 6 ºС, швидкість охолодження становила 1,2 ºС/с. Імпульси наносили послідов-

но з інтервалом 30 с (f_1 = 1/30 c^{-1}). За результатами одного з типових експериментів цієї серії («норма») (рис. 1) видно, що перший стимул викликає відносно високоамплітудний потенціал з амплітудою близько 60 мВ. Наступний потенціал, викликаний стимулом, нанесеним через 30 с, має амплітуду близько 7 мВ. Потім амплітуда відповідей дещо збільшується та стабілізується на рівні 18–19 мВ.

За результатами серії подібних дослідів побудовано графік залежності середніх амплітуд відповідей (у %) від часу між першим і наступними імпульсами (рис. 2). Для побудови графіка амплітуда першої відповіді приймалась за 100% для того, щоб нівелювати розбіжності в абсолютних значеннях амплітуд потенціалів у різних дослідах. Результати свідчать, що стабілізація потенціалу для використаної в цій серії частоти стимуляції настає через 240 с на рівні 15% від амплітуди першої відповіді. У другій серії дослідів застосовували холодові імпульси тривалістю 5 с зі зниженням температури на 6 ºС, швидкість охолодження становила 1,2 ºС/с, але імпульси наносили послідовно з інтервалом 15 с (f_2 = 1/30 c^{-1}) (рис. 3). Стабілізація потенціалу для зазначеної частоти стимуляції настає вдвічі швидше – через 120 с на рівні 20% від амплітуди першої відповіді (рис. 4). Після закінчення контрольних реєстрацій паростки переносили в затемнену кімнату та проводили повторні реєстрації за вказаною методикою холодової стимуляції на 3, 4 та 9-ту добу.

У «нормі» рівні стабілізації для вказаних частот стимуляції практично однакові та становлять приблизно 15–20% (рис. 5). Після витримування паростків у темряві протягом 3 діб рівні стабілізації суттєво збільшуються: за частоти стимуляції f_1 = 1/30 c^{-1} до 75%, а за f_2 = 1/15 c^{-1} – до 60%. На четверту добу за першої частоти стимуляції картина практично не змінюється, а за другої частоти рівень стабілізації збільшується до 70%. На дев'яту добу для обох частот стимуляції спостерігається різке зниження рівня стабілізації до 45% (f_1 = 1/30 c^{-1}) та 10% (f_2 = 1/15 c^{-1}).

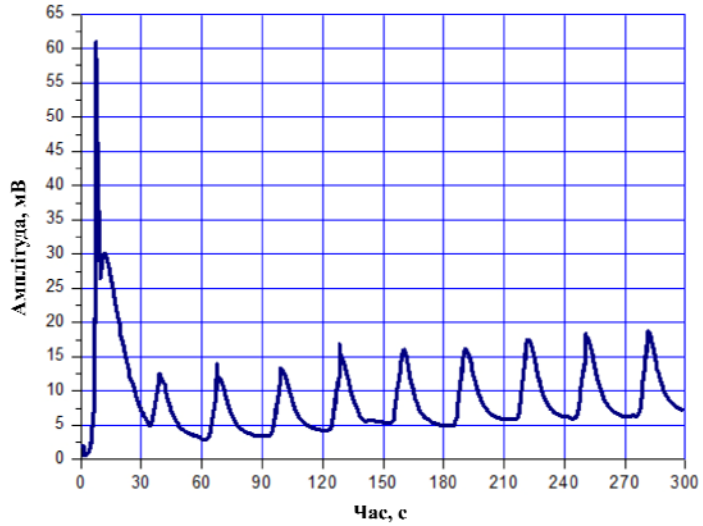


Рис. 1. Біопотенціали, викликані ритмічним холодовим подразненням листя кукурудзи: перепад температури – 6 ºС, час між холодовими стимулами 30 с (f_1 = 1/30 c^{-1}), тривалість стимулу 5 с

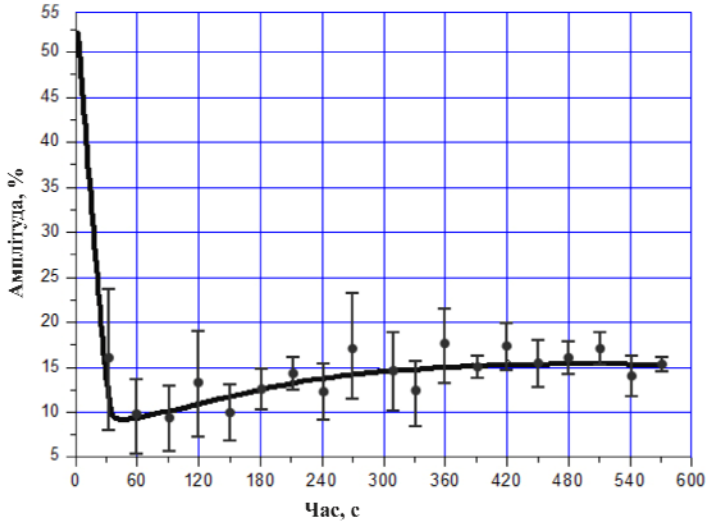


Рис. 2. Залежність амплітуди біопотенціалів (у % до амплітуди першої відповіді) від часу між першим і наступними стимулами (f_1 = 1/30 c^{-1}) для серії з 5 експериментів: вертикальні лінії позначають надійні інтервали для середніх, розраховані з надійністю 0,85

Обговорення

Досліджувані у роботі біопотенціали виникають у відповідь на надпороговий холодовий вплив та є, як відомо, потенціалами дії рослинних клітин (Pjatygin et al., 2006). Слід зазначити, що за застосованого макроелектродного відведення реєструються сумарні потенціали збуджених клітин у зоні відведення. Величина зареєстрованих таким методом потенціалів, на думку окремих авторів, може залежати як від рівня мембранного потенціалу клітин, так і від кількості клітин (Pjatygin et al., 2008).

Відомо (Pjatygin et al., 2005; Gallé, 2015), що сумарний мембранний потенціал рослинної клітини складається з дифузійної та метаболічної складової. Дифузійна складова відносно стабільна, залежить від властивостей мембрани та іонного

складу рідин, у той час як метаболічна складова створюється іонними насосами та значною мірою визначається функціональним станом самої клітини (Pjatygin et al., 2005). Саме тому для визначення впливу на стан клітини зовнішніх впливів краще віддавати перевагу застосуванню не поодиноких, а ритмічних подразнень.

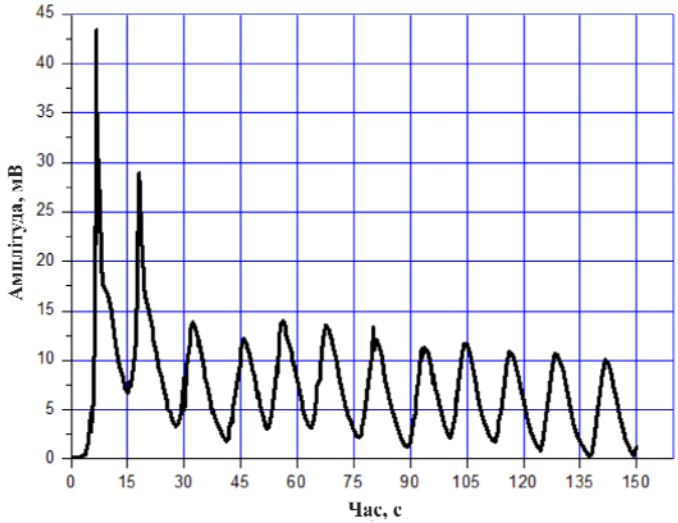


Рис. 3. Біопотенціали, викликані ритмічним холодовим подразненням листя кукурудзи: перепад температури – 6 ºС, час між холодовими стимулами 15 с (f_2 = 1/15 c^{-1}), тривалість стимулу 5 с

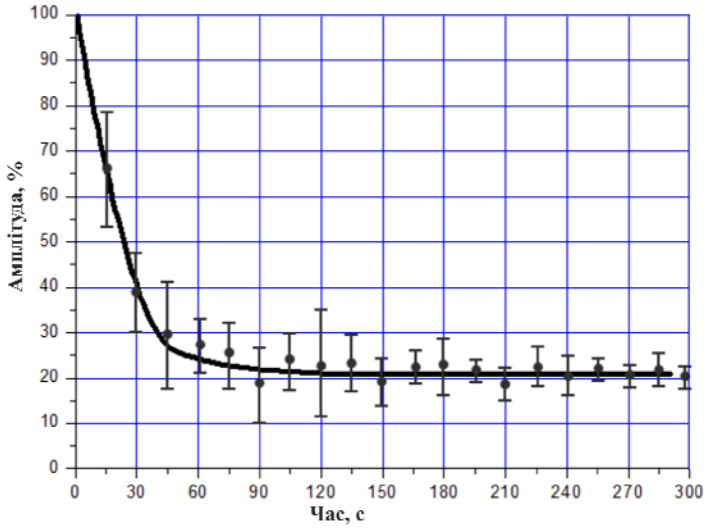


Рис. 4. Залежність амплітуди біопотенціалів (у % до амплітуди першої відповіді) від часу між першим і наступними стимулами (f_2 = 1/15 c^{-1}) для серії з 5 експериментів: вертикальні лінії позначають надійні інтервали для середніх, розраховані з надійністю 0,85

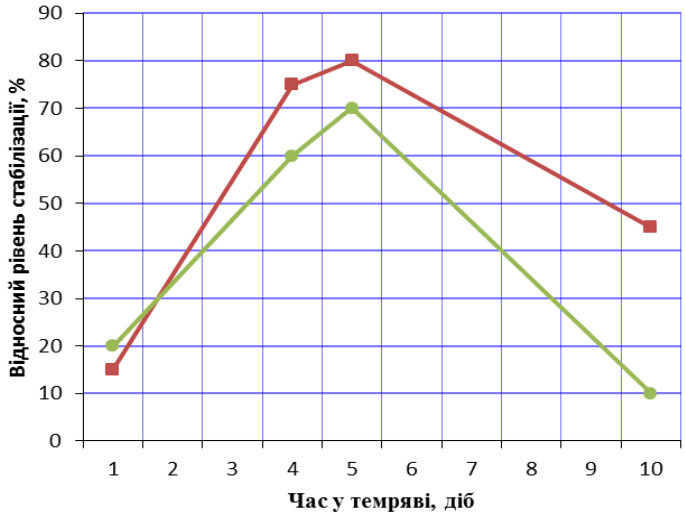


Рис. 5. Зміна середнього рівня стабілізації потенціалів (у % до першої відповіді), викликаних холодовою частотною стимуляцією, залежно від часу утримання паростків у темряві для двох частот стимуляції: f_1 = 1/30 c^{-1} (верхня крива) та f_2 = 1/15 c^{-1} (нижня крива)

Слід зазначити, що метод частотної холодової стимуляції не адекватний для досліджуваних рослин, але його застосування дозволяє оцінити стійкість клітин до зовнішніх подразників. Попередні дослідження показали (Motsnyj et al., 2004), що частоти стимуляції $f_1 = 1/30$ с$^{-1}$ та $f_2 = 1/15$ с$^{-1}$ достатньо потужні. За такої стимуляції в експериментах у відповідь на перше подразнення реєструється максимальний потенціал. Повторне подразнення, здійснене через часовий проміжок, менший за тривалість відносної рефрактерної фази, викликає відповідь із меншою амплітудою. Наступні потенціали змінюються за амплітудою та стабілізуються на певному, залежному від частоти рівні. Величина відповіді зменшується зі скороченням вказаного часового проміжку. При цьому рівень стабілізації певною мірою відображує функціональний стан клітин, які генерують потенціали.

У більшості вищих рослин відносна рефрактерність перевищує 60 с. За застосованих частот кожне наступне подразнення потрапляє у рефрактерну фазу попереднього, що викликає відповідь меншої амплітуди та меншої глибини фази рефрактерності. Таким чином, у системі «стимуляція – генерація потенціалу» виникає негативний зворотний зв'язок, який і зумовлює стабілізацію потенціалів, що реєструються. При цьому величина рівня стабілізації залежить від частоти стимуляції. Оскільки в даних експериментах реєструється сумарний потенціал дії, то за змінами рівня стабілізації можна оцінювати швидкість поновлення мембранного потенціалу. У свою чергу, швидкість поновлення потенціалу визначається, в основному, ефективністю АТФ-залежного протонного транспорту (Pjatygin et al., 2005).

Експерименти показали, що витримування паростків кукурудзи у темряві спричиняє значне підвищення стійкості рівня мембранного потенціалу до ритмічних холодових подразнень, максимум якої спостерігається на третю – четверту добу. Можна вважати, що відсутність процесу фотосинтезу (під час тримання паростків у темряві) викликає помітне підвищення активного протонного транспорту у третю – четверту добу дефіциту освітленості. Встановлені залежності, імовірно, свідчать про функціональну перебудову циклу життєдіяльності рослини, зокрема, іонного транспорту через мембрану, у відповідь на виражені несприятливі умови зовнішнього середовища.

Такі результати узгоджуються з результатами інших авторів, які підкреслюють наявність зв'язку між електричною активністю рослинних клітин і фотосинтезом (Gallé et al., 2015), а також ключову роль процесів фотосинтезу у підвищенні холодового опору рослин, зокрема, пшениці (Szechyńska-Hebda et al., 2015).

Виявлений ефект стійкості рівня мембранного потенціалу листя кукурудзи до ритмічних холодових подразнень за витримування рослини у темряві триває, принаймні, 9 діб. На 9-ту добу рівень стабілізації значно знижується, що може свідчити або про адаптацію рослин до відсутності освітлення, або про виснаження запасів АТФ, що запускає ланцюжок активного транспорту іонів через мембрану клітин, які генерують потенціали дії. За літературними даними, наявність двоетапних змін вмісту АТФ у клітинах та їх зв'язок із фотоіндукованими варіаційними потенціалами та процесами фотосинтезу та дихання в умовах низької освітленості мають місце також у листках гороху (Surova et al., 2016). Близькі до зареєстрованих у даних експериментах значення фотоіндукованих потенціалів були отримані нещодавно в умовах різної за інтенсивністю та тривалістю освітленості та у темряві на моделі електричної активності клітини, що враховує механізми протонного транспорту та синтезу АТФ (Lyu and Lazár, 2017).

Висновки

Ритмічна холодова стимуляція листя викликає стабілізацію рівня потенціалів відповідей. Рівень стабілізації мембранного потенціалу залежить від частоти холодових подразнень і характеризує адаптивні властивості системи, що викликає біопотенціали. Відсутність фотосинтезу за дефіциту зовнішнього освітлення зумовлює значне підвищення середнього рівня стабілізованих відповідей, що свідчить про підвищення стійкості системи до зовнішніх впливів. Максимум такого підвищення припадає на четверту добу. Таке підвищення пов'язане з функціональною перебудовою іонного транспорту через мембрани клітин, які генерують зареєстровані потенціали. В інтервалі 4–9-ї доби спостерігається суттєве зниження рівня стабілізації потенціалу, що, імовірно, пов'язано або з адаптацією клітин рослин до відсутності освітлення, або з виснаженням запасів АТФ, яка забезпечує активний транспорт іонів через клітинну мембрану.

References

Álvarez, S., & Sánchez-Blanco, M. J. (2015). Comparison of individual and combined effects of salinity and deficit irrigation on physiological, nutritional and ornamental aspects of tolerance in *Callistemon laevis* plants. Journal of Plant Physiology, 185, 65–74.

Bendaly, A., Messedi, D., Smaoui, A., Ksouri, R., Bouchereau, A., & Abdelly, C. (2016). Physiological and leaf metabolome changes in the xerohalophyte species *Atriplex halimus* induced by salinity. Plant Physiology and Biochemistry, 103, 208–218.

Chernetchenko, D. V., Motsnyj, M. P., Botsva, N. P., & Elina O. V. (2015) Doslidzhennja fotoindukovanyh potencialiv lystja percju [Research of photoinduced potentials of pepper leaves]. Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology, Ecology, 23(2), 225–229 (in Ukrainian).

Chernetchenko, D. V., Motsnyj, M. P., Botsva, N. P., Elina, O. V., & Milykh, M. M. (2013). Avtomitizovana systema reestraciy bioelectrichnih potencialiv [Automated experiment for bioelectrical potentials registration]. Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology, Ecology, 21(2), 70–75 (in Ukrainian).

Das, S., Ajiwibawa, B. J., Chatterjee, S. K., Ghosh, S., Maharatna, K., Dasmahapatra, S., Vitaletti, A., Masi, E., & Mancuso, S. (2015). Drift removal in plant electrical signals via IIR filtering using wavelet energy. Computers and Electronics in Agriculture, 118, 15–23.

Gallé, A., Lautner, S., Flexas, J., & Fromm, J. (2015). Environmental stimuli and physiological responses: The current view on electrical signalling. Environmental and Experimental Botany, 114, 15–21.

Gálvez-Valdivieso, G., Cardeñosa, R., Pineda, M., & Aguilar, M. (2015). Homogentisate phytyltransferase from the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Journal of Plant Physiology, 188, 80–88.

Lyu, H., & Lazár, D. (2017). Modeling the light-induced electric potential difference (ΔΨ), the pH difference (ΔpH) and the proton motive force across the thylakoid membrane in C_3 leaves. Journal of Theoretical Biology, 413, 11–23.

Motsnyj, M. P., Botsva, N. P., Elina, E. V., & Ulanova, Y. A. (2011). Vplyv fotostymuljacii' na bioelektrychnu reakciju lystja kukurudzy [Effect of photostimulation on maize leaves' bioelectrical response]. Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology, Ecology, 19(2), 103–108 (in Ukrainian).

Motsnyj, M. P., Elina, E. V., & Vlasova, S. V. (2004). Issledovanie reakcii rasteniy, vizvannoi ritmicheskoy stimulyaciei [The study plants responses induced by repetitive stimulation]. Nauka ta Osvita, Odessa, 55, 37–38 (in Russian).

Pjatygin, S. S., Opritov, V. A., & Vodeneev, V. A. (2008). Signal'naja rol' potenciala dejstvija u vysshih rastenij [Signal role of the action potential in higher plants]. Fiziologija Rastenij, 55, 312–319 (in Russian).

Pjatygin, S. S., Vodeneev, V. A., & Opritov, V. A. (2005) Soprjazhenie generacii potenciala dejstvija v kletkah rastenij s metabolizmom: Sovremennoe sostojanie problemy [Conjugation of generation of action potential in plant cells with metabolism: The current state of the problem]. Uspehi Sovremennoj Biologii, 125, 534–542 (in Russian).

Pjatygin, S. S., Vodeneev, V. A., & Opritov, V. A. (2006). Depoljarizacija plazmaticheskoj membrany kak universal'naja pervichnaja biojelektricheskaja reakcija rastitel'nyh kletok na dejstvie razlichnyh faktorov [Depolarization of the plasma membrane as a universal primary bioelectric reaction of plant cells to the action of various factors]. Uspehi Sovremennoj Biologii, 126(5), 492–502 (in Russian).

Ríos-Rojas, L., Tapia, F., & Gurovich, L. A. (2014). Electrophysiological assessment of water stress in fruit-bearing woody plants. Journal of Plant Physiology, 171(10), 799–806.

Stahlberg, R., Stephens, N. R., Cleland, R. E., & Van Volkenburgh, E. (2006). Shade-induced action potentials in *Helianthus annuus* L. Originate primarily from the Epicotyl. Plant Signaling and Behavior, 1(1), 15–22.

Surova, L., Sherstneva, O., Vodeneev, V., Katicheva, L., Semina, M., & Sukhov, V. (2016). Variation potential-induced photosynthetic and respiratory changes increase ATP content in pea leaves. Journal of Plant Physiology, 202, 57–64.

Szechyńska-Hebda, M., & Karpiński, S. (2013). Light intensity-dependent retrograde signalling in higher plants. Journal of Plant Physiology, 170(17), 1501–1516.

Szechyńska-Hebda, M., Wąsek, I., Gołębiowska-Pikania, G., Dubas, E., Żur, I., & Wędzony, M. (2015). Photosynthesis-dependent physiological and genetic crosstalk between cold acclimation and cold-induced resistance to fungal pathogens in triticale (Triticosecale Wittm.). Journal of Plant Physiology, 177, 30–43.

Tao, Z., Chen, Y., Li, C., Zou, J., Yan, P., Yuan, S., Wu, X., & Sui, P. (2016). The causes and impacts for heat stress in spring maize during grain filling in the North China Plain — A review. Journal of Integrative Agriculture, 15(12), 2677–2687.

Trebacz, K., & Sievers, A. (1998) Action potentials evoked by light in traps of *Dionaea muscipula* Ellis. Plant Cell Physiology, 39, 369–372.

Vodeneev, V., Orlova, A., Morozova, E., Orlova, L., Akinchits, E., Orlova, O., & Sukhov, V. (2012). The mechanism of propagation of variation potentials in wheat leaves. Journal of Plant Physiology, 169(10), 949–954.

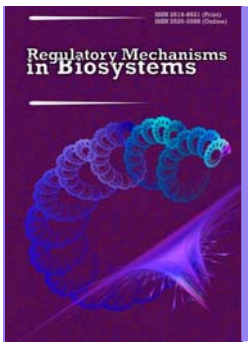
Volkov, A. G., O'Neal, L., Volkova, M. I., & Markin, V. S. (2013a). Morphing structures and signal transduction in *Mimosa pudica* L. induced by localized thermal stress. Journal of Plant Physiology, 170(15), 1317–1327.

Volkov, A. G., Vilfranc, C. L., Murphy, V. A., Mitchell, C. M., Volkova, M. I., O'Neal, L., & Markin, V. S. (2013b). Electrotonic and action potentials in the Venus flytrap. Journal of Plant Physiology, 170(9), 838–846.

Wijewardana, C., Henry, W. B., Gao, W., & Reddy, K. R. (2016). Interactive effects on CO_2, drought, and ultraviolet-B radiation on maize growth and development. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 160, 198–209.

Zheng, L., Wang, Z., Sun, H., Zhang, M., & Li, M. (2015). Real-time evaluation of corn leaf water content based on the electrical property of leaf. Computers and Electronics in Agriculture, 112, 102–109.

Zhou, H., Sun, Y., Cheng, Q., Schulze Lammers, P., Damerow, L., Schumann, H., Norton, T., & Wen, B. (2014). In situ observation of thermal and hydraulic responses of sunflower stem to cold water irrigation using embedded thermocouples. Computers and Electronics in Agriculture, 109, 195–199.



Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(2), 185–190
doi: 10.15421/021729

The effect of biologically active feed additives of humilid substances on the antioxidant system in liver mitochondria of gerbils

O. O. Dyomshina*, G. O. Ushakova*, L. M. Stepchenko**

**Oles Honchar Dnipro National University, Dnipro, Ukraine*
***Dnipro State Agrarian-Economic University, Dnipro, Ukraine*

Article info

Received 29.03.2017
Received in revised form 24.04.2017
Accepted 28.04.2017

Oles Honchar Dnipro National University, Gagarin Ave., 72, Dnipro, 49010, Ukraine.
Tel.: +38-050-607-52-83.
E-mail: olga-d2009@ukr.net

Dnipro State Agrarian-Economic University, Sergey Efremov Str., 25, Dnipro, 49600, Ukraine.

Dyomshina, O. O., Ushakova, G. O., & Stepchenko, L. M. (2017). The effect of biologically active feed additives of humilid substances on the antioxidant system in liver mitochondria of gerbils. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(2), 185–190. doi:10.15421/021729

Mitochondria are organelles that are most sensitive to the action of stressors on any cell of the entire organism and exposure to chemicals which can cause its dysfunction and cell death in general. Especially sensitive to adverse conditions are liver mitochondria, where the processes of biotransformation of endogenous and exogenous metabolites are formed, not only in the liver, but also in other organs and tissues. Mitochondrial dysfunction can cause instant hepatic cytolysis and steatosis. Therefore, early detection of mitochondrial toxicity is important during preclinical studies of new pharmacological agents, as this will help avoid remote negative effects. The biologically active feed additive Humilid, a complex of humic acids known for their antidiarrheal, analgesic, immune-stimulating, and antimicrobial properties; shows a corrective effect on the activity of the lysosomal cathepsin; enhances the positive effect of hematopoiesis on hemoglobin and its quality indicators consisting of red blood cells; and activates the synthesis and accumulation of fibronectin expression that takes part in the formation of immunological protection of animals. The objective of our experiment was to determine the effect of complex biologically active feed additives based on humic substances on the biochemical indicators of the liver mitochondrial antioxidant system of Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus* Milne-Edwards, 1867). The experiment was conducted on mature (6 months) Mongolian gerbils. The data obtained showing the influence of the biologically active feed additives Humilid, alone or in combination with ascorbate and Eco-impulse Animal, on the antioxidant defense system of liver mitochondria of gerbils are presented in this article. The proven antioxidant effect of humic substances in the mitochondrial fraction of the liver which inhibits the accumulation of oxidized products in the cells is shown, confirmed by the decrease in the number of TBA-active products, catalase activation, and an increase in the concentration of cytochrome C. Also, an increase in the amount of cytochrome C, which is a direct participant in the mitochondrial respiratory chain and provides efficient electron transport, indicates the acceleration of energy supply processes. The functional activity of mitochondria was accompanied by increased activity of aspartate aminotransferase involved in the shuttle of malate-aspartate transport of electrons through the mitochondrial membrane. The results obtained indicate the positive reaction of gerbil liver mitochondria under the influence of the biologically active feed additives of humic substance.

Keywords: Humilid; ascorbic acid; Eco-impulse Animal; aspartate aminotransferase; catalase; superoxide dismutase; TBA-active products; cytochrome C

Вплив біологічно активних кормових добавок гумінової природи на систему антиоксидантного захисту мітохондрій печінки монгольської піщанки

О. О. Дьомшина*, Г. О. Ушакова*, Л. М. Степченко**

**Дніпровський національний університет імені Олеся Гончара, Дніпро, Україна*
***Дніпровський державний аграрно-економічний університет, Дніпро, Україна*

Наведено дані щодо оцінки впливу біологічно активної кормової добавки Гумілід окремо та в суміші з аскорбіновою кислотою, або «Еко-імпульс Animal» на систему антиоксидантного захисту мітохондрій печінки піщанок. Доведено антиоксидантний вплив гумінових речовин у мітохондріях печінки, що підтверджено зниженням кількості ТБК-активних продуктів, активізацією каталази та підвищенням концентрації цитохрому С. Збільшення кількості цитохрому С свідчить про прискорення процесів енергозабезпечення за рахунок активації дихального ланцюга мітохондрій та ефективного транспорту електронів. Визначено потенціювальний синергізм аскорбінової кислоти та Гуміліду, що посилює антиоксидантні властивості гумінових речовин. Функціональна активність мітохондрій супроводжувалась підвищенням активності аспартатамінотрансферази, яка бере участь у малатаспартатному човниковому транспорті електронів крізь мітохондріальну мембрану та циклі сечовини. Встановлено сильний прямий корелятивний зв'язок високого ступеня значимості між

кількістю ТБК-активних продуктів і активністю каталази, кількістю ТБК-активних продуктів та кількістю цитохрому С в умовах застосування Гуміліду в суміші з аскорбіновою кислотою, а також вірогідний сильний обернений зв'язок високого ступеня значимості між кількістю ТБК-активних продуктів та активністю каталази, активністю СОД та кількістю цитохрому С за впливу біологічно активної добавки «Еко-імпульс Animal». Отримані результати вказують на позитивну реакцію мітохондрій печінки піщанок за впливу біологічно активних кормових добавок гумінової природи.

Ключові слова: Гумілід; аскорбінова кислота; «Еко-імпульс Animal»; аспартатамінотрансфераза; каталаза; супероксиддисмутаза; ТБК-активні продукти; цитохром С

Вступ

Органела, яка бере активну участь у більшості катаболічних процесів і забезпечує клітини енергією, – це мітохондрія. Саме мітохондрія найчутливіша органела до дії стресових факторів будь-якої клітини цілісного організму. Вплив хімічних речовин на мітохондрії може викликати їх дисфункції та бути причиною загибелі клітини в цілому (Begriche et al., 2011; Brinkmann et al., 2013; Buron et al., 2017). Особливо чутливі до несприятливих умов серед клітинних органел мітохондрії печінки, де відбуваються процеси біотрансформації ендогенних і екзогенних метаболітів, які утворюються не тільки у печінці, а і в інших органах і тканинах (Gergalova and Skok, 2011; Melnichuk et al., 2013; Hamdallah et al., 2014). Порушення функцій мітохондрій може бути причиною миттєвого печінкового цитолізу та стеатозу (Dykens et al., 2007; Labbe et al., 2008; Vadzuk et al., 2010). Тому раннє виявлення мітохондріальної інтоксикації важливе під час преклінічних досліджень нових фармакологічних препаратів, оскільки це допоможе уникнути віддалених негативних наслідків (Hynes et al., 2013; Felser et al., 2014; Buron et al., 2017).

Мітохондрії – джерело вільних радикалів, які у значній кількості утворюються внаслідок розвитку патологій різної етіології, що зумовлює підвищення продукції H_2O_2 і H_2O_2-індукованої інактивації аконітази за загального зниження концентрації каталази, що спричинить передчасне старіння клітини (Dai et al., 2017). Системи, які знешкоджують надлишкову кількість токсичних окиснених метаболітів, – високомолекулярна та низькомолекулярна антиоксидантні системи, які функціонують одночасно. Супероксиданіон – один із токсичних оксигенових метаболітів, що інтенсивно утворюється в дихальному ланцюзі мітохондрій. Ензими, які знешкоджують супероксиданіон – це супероксиддисмутаза (СОД) та цитохром С, найвищі рівні яких реєструються саме в мітохондріях печінки (Demin et al., 2008; Donghong et al., 2015; Serova et al., 2016).

У печінці форма СОД, що домінує та складає понад 65% загальної активності – мітохондріальна (Mn-СОД) (Surai and Fisinin, 2013). Цитохром С, а саме його окиснена форма (Fe^{3+}), виявляє потужні антиоксидантні властивості за рахунок ефективнішого, ніж СОД, окиснення супероксиданіона в молекулярний оксиген (Demin et al., 2008; Serova et al., 2016), тому вважається одним із маркерів ефективності функціонування антиоксидантної системи. Крім цього, її використовують як маркер оксидативного стресу (Birk et al., 2014). Зростання його концентрації у цитозольній фракції клітини свідчить про підвищення проникності зовнішньої мітохондріальної мембрани (як наслідок активації окисних процесів), що запускає механізм загибелі клітини шляхом апоптозу.

Окисне пошкодження також впливає на реплікацію та транскрипцію мітохондріальної ДНК і спричиняє зниження мітохондріальної функції, яка, у свою чергу, зумовлює збільшення рівня активних форм оксигену та подальше пошкодження мітохондріальної ДНК (Cui et al., 2012). Пошкодження мітохондріальних макромолекул клітинного дихання токсичними формами оксигену, у свою чергу, витупає причиною передчасного старіння клітин і організму в цілому (Lapointe, 2014; Lapointe et al., 2014). Запобігає оксидації клітини її антиоксидантна система – важлива ланка функціонування в нормі, особливо за впливу екзогенних факторів.

Біологічно активна кормова добавка Гумілід (ТУ У 15.7-00493675 004:2009) – це комплекс гумінових кислот, відомих своїми антидіарейними, знеболювальними, імуностимулювальними та антимікробними властивостями, здатністю впливати на конверсію корму, ріст і якість м'яса сільськогосподарських тварин (Stepchenko and Skorik, 2006; Kovalenko et al., 2010; Stepchenko, 2010). Гідрогумат проявляє корегувальний ефект на активність лізосомальних катепсинів, що може бути спричинене його мембранотропними властивостями та активацією внутрішньолізосомального протеолізу (Stepchenko, 2010), тобто впливає на молекулярні механізми адаптації тварин за дії хронічного стресу. Суміш сфагніну й дубліну викликає посилення гемопоезу, позитивно впливає на вміст гемоглобіну та його якісні показники у складі еритроцитів (Stepchenko and Skorik, 2006; Shvetsova et al., 2010). Ці біологічно активні кормові добавки зумовлюють зростання синтезу, експресії та накопичення фібронектину, який бере участь у формуванні імунологічного захисту тварин (Stepchenko, 2010), знижують кардіотоксичність високих доз адреналіну, що зумовлено їх здатністю зв'язувати вільні радикали (Paronik et al., 2015). Також у дослідженнях на пухлинах печінки (Pan et al., 2016) препарат Mineral Pitch, що містить фульвокислоти та гумінові кислоти, виявив себе як потенційний антипроліферативний та проапоптотичний агент через утворення перекисних продуктів і NO, а також шляхом модуляції рівня експресії miRNA-21 і miRNA-22, що дало авторам можливість рекомендувати використовувати цей препарат як дієтичну добавку, яка може знизити ризик розвитку раку та пригнічувати ріст пухлини.

Фульвокислоти та гумінові кислоти – джерело мікро- та макроелементів і, одночасно, активатори підвищення їх концентрації в органах і тканинах (Szabo et al., 2017). У дослідженнях Ryzhkovskaia et al. (2014) показано, що споживання щурами з парацетамольним експериментальним гепатитом мінеральної води, яка містить гумінові кислоти, протягом 21 доби зумовило модифікацію ультраструктури гепатоцитів. Спостерігали збільшення кількості цистерн гранулярного ендоплазматичного гетикулуму, гранул глікогену та мітохондріальний поліморфізм. Відбувалось відновлення енергетичних процесів, глікоген- і протеїнсинтезувальних функцій, порушених у результаті введення парацетамолу. Фаза після відміни лікувальних препаратів (14 діб) характеризувалася подальшим зміцненням репаративних процесів і функціональної активності клітин печінки. Гуміліди використовують у профілактиці та терапевтичних заходах у ветеринарній практиці для всіх видів тварин (EMEA, 1999).

«Еко-імпульс Animal» – біологічно активна кормова добавка, яка являє собою комплексний препарат, одержаний шляхом лужного гідролізу торфу за впливу електричного струму. Використовують у складі раціону сільськогосподарських тварин та птиці з метою поліпшення функціонального стану організму, підвищення імунітету, профілактики стресу, а також підвищення продуктивності та інтенсивності росту.

Незважаючи на широке використання біологічно активних кормових добавок на основі гумінових речовин у ветеринарії, птахівництві, тваринництві та рослинництві, дослідження їх впливу на організм людини з метою подальшого впровадження у медичну практику ще тривають. Відомості про вплив досліджуваних препаратів на антиоксидантну систему мітохондрій печінки ссавців відсутні. Класичний антиоксидант – аскорбінова кислота – найважливіший і найефективніший низькомолекулярний компонент антиоксидантної системи кожної клітини, але її комбінований вплив із гуміновими речовинами поки не досліджено.

Мета цієї статті – визначити вплив комплексних біологічно активних кормових добавок на основі гумінових речовин Гумі-

лід окремо або у комплексі з аскорбіновою кислотою, або «Еко-імпульс Animal» на стан антиоксидантної системи мітохондрій печінки монгольської піщанки.

Матеріал і методи досліджень

Експеримент проведено на монгольських піщанках (Mongolian gerbilia, *Meriones unguiculatus* Milne-Edwards, 1867) зрілого віку (6 місяців) середньою вагою 63–83 г, яких утримували у стандартних умовах віварію. Маніпуляції з тваринами проводили відповідно до правил «Європейської конвенції захисту хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986). Методика проаналізована та схвалена локальним етичним комітетом ДНУ.

Дослідні біологічно активні кормові добавки додавали до питної води у розрахунку 5 мг/кг ваги тварини. Тварин поділили на чотири дослідні групи по 6 особин у кожній: I група – інтактні тварини (контроль), які отримували звичайний раціон; II – тварини, яким у питну воду додавали 1% розчин Гуміліду (отримано та апробовано у проблемній лабораторії з гумінових речовин ім. Л. А. Христєвої, ДДАЕУ); III – у питну воду додавали суміш 1% розчинів Гуміліду та аскорбінової кислоти (ПрАТ «Фармацевтична фірма "Дарниця"», Київ, Україна); IV – у питну воду додавали 1% розчин препарату «Еко-Імпульс Animal» (ДДАЕУ). Експеримент проводили протягом 24 діб. Наприкінці тварин зважували та виводили з експерименту під етерним наркозом, видаляли печінку, промивали її у фізіологічному розчині та використовували для подальших досліджень.

Гомогенат печінки та її мітохондріальну фракцію отримували шляхом диференційного центрифугування у градієнті сахарози методом Wieckowski et al. (2009). Визначення загальної кількості протеїну та активності аспартатамінотрансферази (АсАТ, КФ 2.6.1.1) проводили з використанням стандартних лабораторних тест-наборів (Фелісіт, Дніпро, Україна) за методами Burtis et al. (2012) та Young (2014) згідно з протоколом фірми виробника. Активність каталази (КТ, КФ 1.11.1.6) визначали за здатністю пероксиду водню утворювати із солями молібдену стійкий забарвлений комплекс (Koroluk et al., 1988). Активність каталази виражали в мккат./кг мітохондріальної фракції. Активність супероксиддисмутази (СОД, КФ 1.15.1.1) оцінювали як здатність ензиму інгібувати реакцію окиснення кверцетину (Kostuk et al., 1990). Активність СОД виражали в умовних одиницях (у. о.). За умовну одиницю приймали активність ензиму, який здатний викликати інгібування кверцетину на 50% у розрахунку на 1 мг протеїнів тканини. Кількість ТБК-активних продуктів визначали фотометрично за концентрацією забарвленого комплексу (Andreeva et al., 1988), який утворювався за реакції малонового діальдегіду (МДА) у кислому середовищі із двома молекулами тіобарбітурової кислоти (ТБК). Кількість МДА виражали у мікромолях ТБК-активних продуктів на 1 мг протеїну мітохондріальної фракції. Кількість цитохрому С – за його здатністю відновлювати дитіонат натрію (Selivanov et al., 1997).

Статистичний аналіз результатів проводили методом ANOVA. Вірогідними вважали відмінності на рівні $P < 0,05$.

Результати

Обсяг загального пулу протеїнів у біологічних рідинах, тканинах і їх компартментах – один із найважливіших показників метаболізму. Дослідження загального вмісту протеїнів у отриманих мітохондріальних фракціях піщанок показали наявність стабільного пулу протеїнів за умов застосування гумінових препаратів протягом 24 діб у визначеній дозі (рис. 1).

Загальна кількість протеїнів у мітохондріальній фракції тварин, яких випоювали Гумілідом як окремо, так і у суміші з аскорбіновою кислотою, була майже на рівні контрольної групи. У тварин, яких випоювали «Еко-імпульс Animal», кількість протеїнів знижувалась вірогідно на 27% порівняно з контрольною групою та іншими дослідними групами.

Оцінювання ензиматичної активності аспартатамінотрансферази в мітохондріальних фракціях, отриманих із печінки дослідних тварин, показало несуттєве підвищення (в 1,2 раза) активності цього ензиму за впливу Гуміліду (рис. 2). У тварин, яким у питну воду додавали суміш Гуміліду та аскорбінової кислоти або «Еко-імпульс Animal», активність АсАТ підвищувалась у 2,5 раза порівняно з контрольною групою.

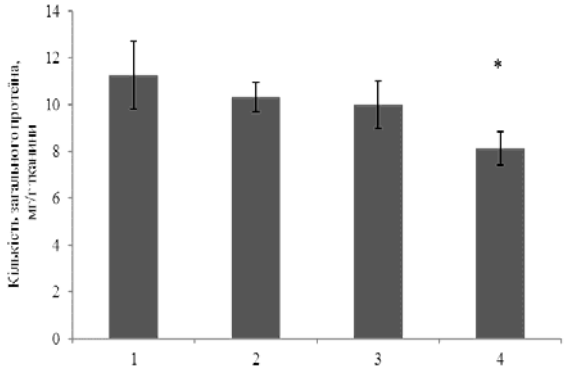


Рис. 1. Загальна кількість протеїнів у мітохондріальній фракції печінки піщанок: *1* – контрольна група тварин, *2* – тварини, які отримували у питній воді 1% Гуміліду, *3* – у питній воді суміш 1% Гуміліду та 1% аскорбінової кислоти, *4* – у питній воді 1% препарату «Еко-імпульс Animal»; * – $P < 0,05$ відносно контрольної групи; $x \pm SD$, $n = 6$

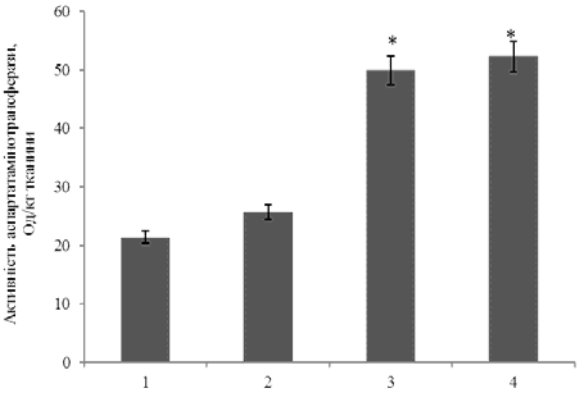


Рис. 2. Активність аспартатамінотрансферази в мітохондріальній фракції печінки піщанок: назви груп див. рис. 1

Для встановлення здатності препаратів гумінових кислот виявляти антиоксидантні властивості в мітоходріальних фракціях печінки визначали кількість ТБК-активних сполук, активність каталази та супероксиддисмутази – маркерів ступеня оксидативного стресу та стану антиоксидантної системи. Кількість ТБК-активних сполук суттєво зменшується в мітохондріальній фракції печінки в усіх дослідних групах тварин у 1,5–2,0 раза відносно контрольної групи (рис. 3). Активність каталази у досліджуваних фракціях печінки піщанок зросла на 11% тільки у випадку впливу Гуміліду (рис. 4), тоді як в інших групах перебувала на рівні контрольної групи.

Зміну активності супероксиддисмутази (СОД) у мітохондріальній фракції печінки спостерігали тільки у групі тварин, яких випоювали препаратом «Еко-імпульс Animal»: спостерігали зниження активності на 40% порівняно з контрольною групою тварин (рис. 5).

Для визначення енергозабезпечення печінки та цілісності мітохондріальної мембрани за застосування ксенобіотиків на основі гумінових речовин визначали кількість цитохрому С у мітохондріальній і водорозчинній фракціях печінки, основна частина якої представлена цитозольними протеїнами (рис. 6).

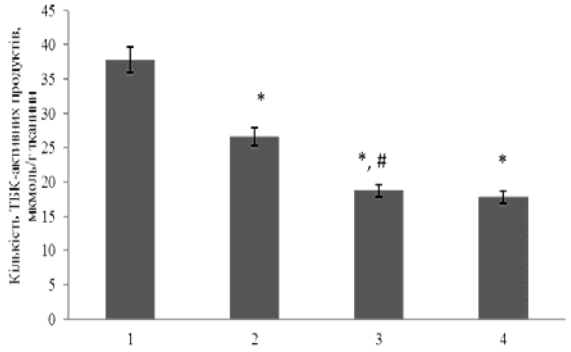


Рис. 3. Кількість ТБК-активних продуктів у мітохондріальній фракції печінки піщанок: назви груп див. рис. 1

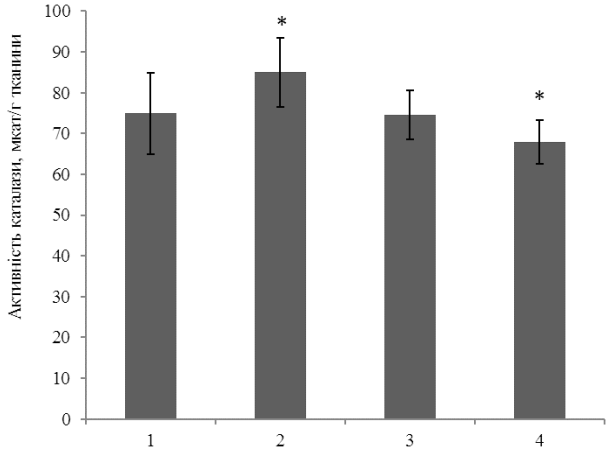


Рис. 4. Активність каталази в мітохондріальній фракції печінки піщанок: назви груп див. рис. 1

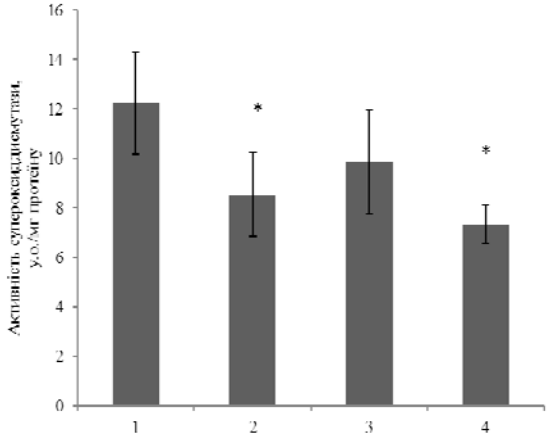


Рис. 5. Активність супероксиддисмутази в мітохондріальній фракції печінки піщанок: назви груп див. рис. 1

За результатами дослідження проведено кореляційний аналіз і розраховано кореляційний коефіцієнт Пірсона (табл.). Установлено сильний прямий зв'язок високого ступеня значимості між кількістю ТБК-активних продуктів і активністю каталази ($r = 0,98$, $P < 0,001$), кількістю ТБК-активних продуктів та кількістю цитохрому С ($r = 0,98$, $P < 0,001$), активністю СОД і кількістю цитохрому С ($r = 0,74$, $P < 0,01$) за застосування Гуміліду та аскорбінової кислоти, а також між активністю СОД і кількістю цитохрому С ($r = 0,78$, $P < 0,01$) у разі застосування Гуміліду. Вірогідний сильний обернений зв'язок високого ступеня значимості встановлено між кількістю ТБК-активних продуктів і активністю каталази ($r = –0,84$, $P < 0,01$), активністю СОД і кількістю цитохрому С ($r = –0,92$, $P < 0,001$) під час застосування препарату «Еко-імпульс Animal».

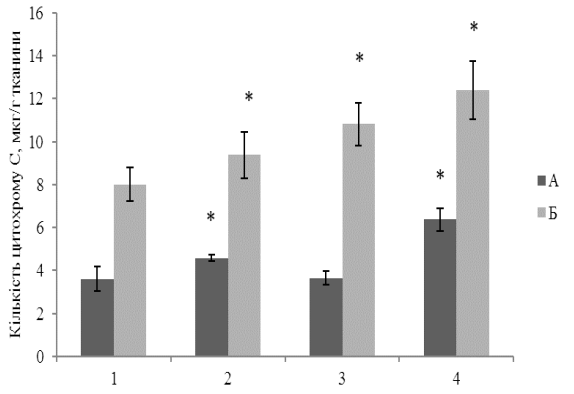


Рис. 6. Кількість цитохрому С у водорозчинній (*А*) та мітохондріальній (*Б*) фракціях печінки піщанок: назви груп див. рис. 1

Таблиця

Кореляційний коефіцієнт Пірсона між дослідними параметрами антиоксидантного захисту мітохондрій печінки піщанок

Групи	Гумілід	Гумілід + аскорбінова кислота	«Еко-імпульс Animal»
ТБК-активні продукти – КТ	–0,599*	0,988***	–0,842***
ТБК-активні продукти – СОД	0,229	0,639*	–0,290
ТБК-активні продукти – цитохром С	0,496*	0,982***	0,124
СОД – цитохром С	0,786**	0,744**	–0,924***
СОД-КТ	0,070	0,534*	–0,272

Примітки: * – $P < 0,05$, ** – $P < 0,01$, *** – $P < 0,001$.

Установлено помірний прямий зв'язок між кількістю ТБК-активних продуктів та кількістю цитохрому С ($r = 0,49$, $P < 0,05$) під час застосування Гуміліду, а також між кількістю ТБК-активних продуктів та активністю СОД ($r = 0,63$, $P < 0,05$) за умов застосування Гуміліду та аскорбінової кислоти. Для кількості ТБК-активних продуктів і активності каталази визначено помірний обернений зв'язок ($r = –0,59$, $P < 0,05$).

Обговорення

Дослідження загального вмісту протеїнів у отриманих мітохондріальних фракціях піщанок показали стабільний пул протеїнів за умов застосування гумінових препаратів протягом 24 діб у визначеній дозі. Однак у тварин, яких випоювали препаратом «Еко-імпульс Animal», кількість протеїнів у цій фракції вірогідно знижувалась порівняно з контрольною групою та іншими дослідними групами. Зниження вмісту протеїнів за впливу «Еко-імпульс Animal» може бути наслідком посилення протеолізу або гальмування біосинтезу нових протеїнів. З іншого боку, можливо, таке явище пов'язане з високою концентрацією вільних низькомолекулярних похідних гумінових речовин у складі даного препарату, які можуть виявляти властивості модуляторів біосинтетичних процесів.

Оцінювання ензиматичної активності аспартатамінотрансферази в мітохондріальних фракціях, отриманих із печінки дослідних тварин, показало несуттєве підвищення активності цього ензиму за впливу Гуміліду. У той же час, у тварин, яким у питну воду додавали суміш Гуміліду та аскорбінової кислоти або «Еко-імпульс Animal», активність АсАТ достовірно підвищувалась порівняно з контрольною групою. Можливо, за умов застосування даних речовин відбувається посилення процесів малатаспартатного човникового механізму, який забезпечує субстратами дихальний ланцюг і бере участь у транспорті електронів крізь мітохондріальну мембрану. Ці процеси спряжені із синтезом АТФ і енергозабезпеченням клітин печінки.

Маркери ступеня оксидативного стресу та стану антиоксидантної системи (у тому числі мітохондрій) – кількість ТБК-

активних сполук, активність каталази та супероксиддисмутази. Суттєве зменшення кількості ТБК-активних сполук у мітохондріальній фракції печінки всіх дослідних груп тварин вказує на потужні антиоксидантні властивості гумінових речовин у складі дослідних препаратів і можливу здатність активізувати ензими антиоксидантного захисту, які знижують кількість окиснених продуктів у клітині. Активність каталази підвищувалась під час додавання до питної води Гуміліду, тоді як в інших групах перебувала в межах контрольної групи. Таке підвищення активності каталази може бути позитивною ознакою гальмування процесів утворення окисних продуктів і активізації адаптивних процесів за умов ксенобіотичного впливу, що також показано іншими авторами (Lapointe and Hekimi, 2010; Stepchenko, 2011; Paronik et al., 2015; Dai et al., 2017) та дослідженнями впливу гумінових препаратів на печінку (Serova et al., 2016). Залишається відкритим питання про специфічність дії різних форм гумінових сполук на вказаний ензим.

Зниження активності супероксиддисмутази в мітохондріальній фракції печінки під час випоювання тварин препаратом «Еко-імпульс Animal» порівняно з контрольною групою тварин, скоріше за все, пов'язане зі значним зниженням концентрації гідроперекису в цій групі тварин, що також свідчить про зниження оксидації мітохондрій печінки за рахунок активізації інших ланок антиоксидантного захисту, таких як цитохром С, концентрація якого збільшується в усіх експериментальних групах. Окиснена форма (цитохром С Fe^{3+}) виявляє потужні антиоксидантні властивості за рахунок ефективнішого, ніж СОД, окиснення супероксиданіона в молекулярний оксиген.

Завдяки особливостям будови гумінових речовин, препарати на їх основі виявляють антиоксидантну дію, знижуючи кількість окиснених продуктів у клітині (Stepchenko and Skorik, 2006; Stepchenko, 2011; Paronik et al., 2015), у тому числі, субстратів СОД, що спричинює зниження її активності. У літературі наведено докази гормоноподібної дії метаболітів гумінових кислот у печінці свійських тварин (Stepchenko, 2011). Метаболізм гумінових речовин у печінці супроводжується утворенням біологічно активних гумінових похідних (або самих гумінових кислот), які можуть прямо або опосередковано брати участь у регуляції біосинтезу протеїнів.

Отримані нами результати свідчать про посилення процесу біосинтезу цитохрому С (особливо за присутності аскорбінової кислоти, яка бере участь у метаболізмі феруму), який, у свою чергу, є учасником дихального ланцюга мітохондрій та завдяки утворенню комплексу з кардіоліпіном забезпечує цілісність внутрішньої мембрани мітохондрій. Також цитохром С – регулятор апоптозу клітини. Отримані дані вказують на стимуляцію власних клітинних антиоксидантних систем печінки, що підтверджується підвищенням активності каталази у клітинах печінки та зниженням кількості ТБК-активних продуктів у всіх дослідних групах тварин. Можливе посилення процесу поглинання оксигену під час вживання екзогенних речовин гумінової природи та, як наслідок, енергетичного забезпечення клітин за рахунок активації транспорту електронів у дихальному ланцюзі мітохондрій і спряженого з ним окисного фосфорилювання, безпосереднім учасником чого виступає цитохром С. Отримані результати збігаються із даними щодо підвищення активності аспартатамінотрансферази як активного учасника малат-аспартатного човникового трансферу, як субстратів, так і електронів у мембрані мітохондрій.

Висновки

Біологічно активні добавки гумінової природи виявляють виражений позитивний вплив на стан та функціональну активність мітохондрій печінки піщанок за рахунок підвищення антиоксидантного захисту клітин шляхом посилення адаптаційних процесів, що супроводжуються збільшенням активності каталази, аспартатамінотрансферази, кількості цитохрому С. З'ясовано потенціювальний синергізм аскорбінової кислоти та Гуміліду. Додавання аскорбінової кислоти до розчину Гуміліду посилює його антиоксидантні властивості.

Вживання гумінових препаратів у дозі 1% діючої речовини у питній воді протягом 24 діб не викликало інтоксикації в мітохондріях печінки, що дозволяє рекомендувати ці біологічно активні добавки до подальших досліджень із метою їх упровадження в медичну практику.

References

Adrianova, I. G. & Sidorova, N. D. (1990). Citohrom C i ego rol' v processah tkanevogo dyhanija. Citohrom C i ego klinicheskoe primenenie [Cytochrome C and its role in the processes of tissue respiration. Cytochrome C and its clinical application]. Leningrad University Press, Leningrad (in Russian).

Andreeva, L. Y., Kozhemjakyn, L. A., & Kyshkun, A. A. (1988). Modyfykacyja metoda opredelenyja perekysej lypydov v teste s tyobarbyturovoj kyslotoj [Modification of the method for the determination of lipid peroxides in the test with thiobarbituric acid]. Laboratory Work, 2, 41–43 (in Russian).

Begriche, K., Massart, J., Robin, M.-A., & Borgne-Sanchez, A. (2011). Drug-induced toxicity on mitochondria and lipid metabolism: Mechanistic diversity and deleterious consequences for the liver. Bernard Fromenty Journal of Hepatology, 54(4), 773–794.

Birk, A. V., Chao, W. M., Bracken, C., Warren, J. D., & Szeto, H. H. (2014) Targeting mitochondrial cardiolipin and the cytochrome c/cardiolipin complex to promote electron transport and optimize mitochondrial ATP synthesis. British Journal of Pharmacology, 171(8), 2017–2028.

Brinkmann, C. R., Jensen, L., Dagnaes-Hansen, F., Holm, I. E., Endo, Y., Fujita, T., Thiel, S., Jensenius, J. C., & Degn, S. E. (2013). Mitochondria and the lectin pathway of complement. The Journal of Biological Chemistry, 288(12), 8016–8027.

Buron, N., Porceddu, M., Roussel, C., Begriche, K., Trak-Smayra, V., Gicquel, T., Fromenty, B., & Borgne-Sanchez, A. (2017). Chronic and low exposure to a pharmaceutical cocktail induces mitochondrial dysfunction in liver and hyperglycemia: Differential responses between lean and obese mice. Environmental Toxicology, 32, 1375–1389.

Burtis, C., Ashvud, E., & Bruns, D. (2012). Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics, 5th ed. Saunders.

Cui, H., Kong, Y., & Zhang, H. (2012). Oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. Journal of Signal Transduction, 646–654.

Dai, D. F., Chiao, Y. A., Martin, G. M., Marcinek, D. J., Basisty, N., Quarles, E. K., & Rabinovitch, P. S. (2017). Chapter seven mitochondrial targeted catalase: Extended longevity and the roles in various disease models. Progress in Molecular Biology and Translational Science, 146, 203–241.

Donghong, L., Lei, L., Pengxi, L., Yi, L., & Xiangyun, C. (2015). Apoptosis of hela cells induced by a newtargeting photosensitizer-based PDT via a mitochondrial pathway and ER stress. OncoTargets and Therapy, 8, 703–711.

Dykens, J. A., Marroquin, L. D., & Will, Y. (2007). Strategies to reduce late-stage drug attrition due to mitochondrial toxicity. Expert Review of Molecular Diagnostics, 7, 161–175.

Felser, A., Stoller, A., Morand, R., Schnell, D., Donzelli, M., Terracciano, L., Bouitbir, J., & Krähenbühl, S. (2014). Hepatic toxicity of dronedarone in mice: Role of mitochondrial β-oxidation, Toxicology, 323, 1–9.

Gergalova, G. L., & Skok, M. V. (2011). Vplyv nikotynu na membrannyj potencial mitohondrij: Uchast' nikotynovyh acetylholinovyh receptoriv [The influence of nicotine on the mitochondrial membrane potential, participate nicotinic acetylcholine receptor]. The Ukrainian Biochemical Journal, 83(5), 13–21 (in Ukrainian).

Hamdallah, A., Davydov, V. V., & Shvets, V. N. (2014). Oxidative stress and the enzyme system of aldehyde catabolism in the muscle mitochondria of immobilized pubertal rats. Ukrainian Biochemical Journal, 86(6), 50–55 (in Ukrainian).

Hynes, J., Nadanaciva, S., Swiss, R., Carey, C., Kirwan, S., & Will, Y. (2013). A high-throughput dual parameter assay for assessing drug-induced mitochondrial dysfunction provides additional predictivity over two established mitochondrial toxicity assays. Toxicology in Vitro, 27(2), 560–569.

Koroljuk, M. A., Yvanova, L. Y., Majorova, Y. G., & Tokareva, V. E. (1988). Metod opredelenyja aktyvnosty katalazy [Method for the determination of catalase activity]. Laboratory Work, 1, 16–19 (in Russian).

Kostjuk, V. A., Potapovych, A. Y., & Kovaleva, Z. V. (1990). Prostoj i chuvstvitel'nyj metod opredelenija aktivnosti superoksiddismutazy, osnovannyj na reakcii okislenija kvercetina [A simple and sensitive method for determining the activity of superoxide dismutase, based on the oxidation reaction of quercetin]. Questions of Medical Chemistry, 36, 2, 88–91 (in Russian).

Labbe, G., Pessayre, D., & Fromenty, B. (2008). Drug-induced liver injury through mitochondrial dysfunction: mechanisms and detection during preclinical safety studies. Fundamental and Clinical Pharmacology, 22, 335–353.

Lapointe, J. (2014). Mitochondria as promising targets for nutritional interventions aiming to improve performance and longevity of sows. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 98(5), 809–821.

Lapointe, J., Hughes, B. G., Bigras, E., & Hekimi, S. (2014). Compensatory elevation of voluntary activity in mouse mutants with impaired mitochondrial energy metabolism. Physiological Reports, 2(11): e12214.

Melnichuk, S. D., Khizhnyak, S. V., Morozov, V. S., & Voytsitsky, V. M. (2013). Aktyvnist' NAD•H-generujuchyh enzymiv ta vmist cytohromiv u mitohondrijah pechinky ta miokarda shhuriv za eksperymental'nogo gipobiozu [The activity of NAD•H-generating enzymes and content of cytochromes in the mitochondria of liver and myocardium of rats under experimental hibernation]. The Ukrainian Biochemical Journal, 85(4), 75–81 (in Ukrainian).

Pan, K., Gupta, P., Damania, P., Yadav, A. K., Gupta, A., Ashraf, A., & Venugopal, S. K. (2016). Mineral pitch induces apoptosis and inhibits proliferation via modulating reactive oxygen species in hepatic cancer cells. BMC Complementary and Alternative Medicine. 16, 148.

Paronik, V. A., Stepchenko, L. M., Djachenko, L. M., Ljevyh, A. E., & Shevcova, A. I. (2015). Vplyv korvitynu ta gumilidu na stan oksydantno-antyoksydantnoi' systemy shhuriv na foni vvedennja adrenalinu [Impact of corvitin and humilid on the state of the oxidant-antioxidant system of rats on the background of the introduction of adrenaline]. Biologija Tvaryn, 17(4), 109–114 (in Ukrainian).

Ryzhkovskaia, E. L., Verigo, N. S., Kuznetsova, T. E., & Ulashchik, V. S. (2014). The ultrastructural organization of the liver of rats with experimental hepatitis after drinking mineral water containing humic acids. Voprosy Kurortologii, Fizioterapii, i Lechebnoi Fizicheskoi Kultury, 5, 35–41 (in Russian).

Selyvanov, E. A., Hmilova, G. A., Beljaeva, Y. S., Slepneva, L. V., & Sydorova, N. D. (1997). Sposob kolichestvennogo opredelenija citohroma C v preparatah, soderzhashhih kollagen [Method of quantitative determination of cytochrome C in preparations containing collagen]. Patent of Russian Federation № 2084869, G01N21/25, application number 94023438/25 (in Russian).

Serova, D., Taran, O., & Dyomshina, O. (2016). Biologichna aktyvnist' preparativ na osnovi guminovyh rechovyn u pechinci pishhanok (*Meriones unguiculatus*) [Biological activity of humic substances in the liver of Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*)]. Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology, Ecology, 24(2), 410–415 (in Ukrainian).

Stepchenko, L. M. & Skorik, M. V. (2006). Stan systemy antyoksydantnogo zahystu erytrocytiv kurej-nesuchek za dii' guminovyh rechovyn [System status of erythrocyte antioxidant protection of laying hens under the influence of humic substance]. Scientific Bulletin of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnology S. Z. Gzhytsky, 7(3–4), 137–143 (in Ukrainian).

Stepchenko, L. M. (2010). Znachenia katepsinu B ta jogo inhibitoriv v reguljaciji obminnyh procesiv u kurchat-brojleriv za diji rechovyn guminovoji prypody [The value of cathepsin B and its inhibitors in the regulation of metabolism in broiler chickens for the actions of humic substances]. Biologija Tvaryn, 12(2), 180–188 (in Ukrainian).

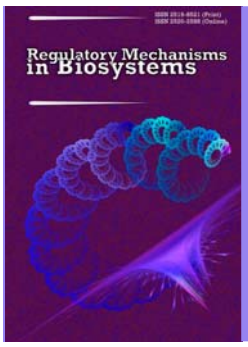
Surai, P. F., & Fisinin, V. I. (2013). Natural antioxidants in hen's embryogenesis and antioxidant defence in postnatal development. Agricultural Biology, 2, 3–17.

Szabó, J., Vucskits, A. V., Berta, E., Andrásofszky, E., Bersényi, A., & Hullár, I. (2017). Effect of fulvic and humic acids on iron and manganese homeostasis in rats. Acta Veterinaria Hungarica, 65(1), 66–80.

Vadzyuk, O. B., Mazur, Y. Y., & Kosterin, S. O. (2011). Reguljacija funkcionuvannja ATR-chutlyvogo K^+-kanalu mitohondrij miometrija aktyvnymy formamy kysnju [Regulation functioning of ATP-sensitive K^+-channels myometrium mitochondrial reactive oxygen species]. Ukrainian Biochemical Journal, 83(3), 48–57 (in Ukrainian).

Wieckowski, M. R., Giorgi, C., Lebiedzinska, M., Duszynski, J., & Pinton, P. (2009). Isolation of mitochondria-associated membranes and mitochondria from animal tissues and cells. Nature Protocols, 4(11), 1582–1590.

Young, D. S. (2014). Effects on clinical laboratory tests: Drugs, disease, herbs and natural products. American Association for Clinical Chemistry.



Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(2), 191–196
doi: 10.15421/021730

Biochemical properties of the plasma of rats with the experimentally induced hepatitis after oral administration of sodium diclofenac

V. Gryshchenko

National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

Article info

Received 24.03.2017
Received in revised form 20.04.2017
Accepted 23.04.2017

National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Heroyiv Oborony Str., 15, Kyiv, 03041, Ukraine.
Tel. +38-066-910-43-43.
E-mail: viktoriya_004@ukr.net

Gryshchenko, V. (2017). Biochemical properties of the plasma of rats with the experimentally induced hepatitis after oral administration of sodium diclofenac. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(2), 191–196. doi:10.15421/021730

We conducted an analysis of the metabolic activity of the liver and defined the peculiarities of biochemical parameters and macroelement composition of blood plasma of rats with experimentally induced toxic hepatitis. Hepatopathology was modeled by oral administration of sodium diclofenac at a dose of 12.5 mg/kg of body mass to rats during 14 days. For the preparation of plasma, rat blood was collected from the abdominal aorta into test-tubes with heparin, and then it was centrifuged at 1500 rev./min for 15–20 min. Then we studied biochemical parameters of blood indicators (level of total protein, albumin, total and conjugated bilirubin, glucose, creatinine, urea, triacylglycerols, cholesterol, thymol test value, activities of ALT, AST, LP and GGT, amylase and lipase) and also its macroelement composition: concentration of sodium, potassium, phosphorus, calcium, magnesium and chlorine using automatic biochemical analyzer «BioSystem A15» (Spain) according to the recommendations of the International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) Experts Panel. The results of the introduction in the laboratory rats of drug-induced toxic hepatitis indicate a decrease of metabolic activity of hepatocytes under this hepatopathology. The results showed a decrease in total protein by 17%, albumin by 11%, glucose by 6% triacylglycerols by 53%, cholesterol by 54%, and an appreciable increase in thymol test value (by a factor of 2.8). Besides this, disruption of the liver pigment function, development of cytolytic syndrome and intrahepatic cholestasis were revealed in the affected animals. The increased activity of the studied blood enzymes (ALT by 28%, AST by 45%, LP by 30%, GGT by a factor of 2.1) confirmed these disruptions. The increase in AST/ALT by 12% ratio confirmed destructive changes in cell membranes, including mitochondrial membranes, caused by metabolic changes under the toxic influence of sodium diclofenac. The increased activities of α-amylase by a factor of 2.4 and lipase by a factor of 8.3 indicate complex negative changes in the organism, not only in liver structure, but also in the pancreas. The results of the study indicate hypocalcemia (decrease by 29%), hypophosphatemia (decrease by 47%) and hypomagnesaemia (decrease by 38%) and a simultaneous increase in the Ca : P ratio by 35%. The last mentioned changes can cause the development of endogenous osteopathy. The results of the study can be used in diagnostics of development of hepatopathology caused by the toxic effects of medication on the liver, for prevention of complications through the early implementation of effective correction therapy.

Keywords: liver; biochemical parameters; enzymes; macroelements

Біохімічний профіль плазми крові щурів за експериментального гепатиту на тлі введення натрію диклофенаку

В. А. Грищенко

Національний університет біоресурсів і природокористування України, Київ, Україна

Установлене зниження метаболічної активності печінки та особливості біохімічних показників і макроелементного складу плазми крові лабораторних щурів за експериментального моделювання гепатиту на тлі введення натрію диклофенаку. Це підтверджується зменшенням у плазмі крові концентрації загального протеїну на 17%, альбуміну – на 11%, глюкози – на 6%, триацилгліцеролів – на 53% і холестеролу – на 54%, а також зростанням у 2,8 раза величини тимолової проби порівняно з контролем. У хворих тварин діагностовано розлади пігментної функції печінки, розвиток цитолітичного синдрому та внутрішньопечінкового холестазу, що підтверджується підвищенням активності АлАТ на 28%, АсАТ на 45% та коефіцієнта АсАТ/АлАТ на 12%, ЛФ на 30% і γ-ГТП в 2,1 раза порівняно з контролем. Гіперензимемія α-амілази в 2,4 раза та ліпази у 8,3 раза свідчить про зміни функціонального стану підшлункової залози. Для макроелементного складу плазми крові хворих тварин характерна гіпокальціємія (зменшується на 29%), гіпофосфатемія (на 47%) і гіпомагніємія (зменшується на 38%) та зростання величини співвідношення Ca : P на 35% порівняно з контролем, що може спровокувати розвиток ендогенної остеопатії. Результати експериментального дослідження важливі для поліпшення діагностики розвитку токсичного гепатиту внаслідок ураження печінки НПЗП, профілактики виникнення ускладнень і призначення ефективної коригувальної терапії.

Ключові слова: печінка; біохімічні показники; ензими; макроелементи

Вступ

У печінці як найбільшій травній залозі організму сконцентровані найважливіші фізіолого-біохімічні процеси, необхідні для підтримання гомеостазу організму (Chang and Schiano, 2007; Shapiro and Lewis, 2007). Останніми роками відмічається різке зростання кількості медикаментозних уражень печінки (Bunchorntavakul and Reddy, 2012; Rahmani et al., 2016). До 40% усіх випадків діагностованого гепатиту зумовлено лікарськими препаратами (Donnelly et al., 2017; Lin et al., 2017). Більша частина не визначених за етіологією гепатитів та цирозів печінки також викликана застосуванням медикаментів. Велике значення для розвитку медикаментозного ураження печінки мають власне гепатопатології: стеатоз, печінкова недостатність або холестаз, що сприяють кумуляції лікарських препаратів та їх метаболітів у гепатоцитах, тяжкі захворювання серцево-судинної, респіраторної, ендокринної систем і нирок, які супроводжуються вираженими порушеннями функціонального стану уражених органів (Taleb et al., 2014; Verbeek et al., 2015).

Один із перших проявів її токсичного ураження – розвиток запальної реакції та жирова дистрофія різного ступеня вираженості (Blas-Garcia et al., 2016). Серед лікарських препаратів, що викликають гепатопатологію, слід відзначити антибіотики, нестероїдні протизапальні препарати, сульфаніламідні засоби, гормональні та інші, які продовжують широко застосовуватися у терапії, деякі з них приймаються роками. Медикаментозні гепатити супроводжуються відповідними синдромами, що спостерігаються при ураженнях печінки: інфільтрацією, дистрофією, холестазом, некрозом (Teschke et al., 2013; Okudo and Anusim, 2016). Їх вираженість залежить від дози ліків, але це буває далеко не завжди. Частіше ураження печінки виникає на тлі лікування декількома гепатотоксичними препаратами або при повторних курсах терапії та залежить від тривалості їх прийому (Chalasani, 2005; Calderon et al., 2010; Bawany et al., 2013; Moole et al., 2015; Okudo and Anusim, 2016).

За гострих і хронічних гепатитів, отруєння гепатотоксичними речовинами відмічається різке зниження біоенергетичного потенціалу хімічних перетворень у гепатоцитах, прогресує індукція вільних радикалів, підвищується інтенсивність пероксидного окиснення ліпідів і активність мембранних фосфоліпаз (Koliaki et al. 2015; Ipsen et al., 2016; Gariani et al., 2017). Це порушує проникність усіх субклітинних структур, знижує електричну міцність мембран, що спричинює деструкцію гепатоцитів (Malhi and Kaufman, 2011). За таких обставин уповільнюються процеси переамінування та дезамінування амінокислот, погіршується їх використання у синтезі білка, складних білкових комплексів та біологічно активних речовин (Calderon et al., 2010). Зазначене негативно позначається на здатності гепатоцитів синтезувати альбумін, фактори згортання крові. Поряд із цим, порушується екскреція кон'югованого білірубіну, естерифікація холестеролу та глюкуронізація багатьох сполук (Moole et al., 2015; Okudo and Anusim, 2016). Водночас це спричиняє порушення детоксикаційної функції печінки (Allen et al., 2011).

Розвиток токсичного гепатиту у тварин викликає зміни інтенсивності та спрямування біохімічних процесів, які безпосередньо пов'язані з обміном мінеральних речовин і корелюють із функціональним станом печінки (Fabbrini and Magkos, 2015). Це свідчить про глибокі порушення метаболізму на клітинному рівні та суттєві розлади структурно-функціонального стану клітинних мембран. Дезорганізація у структурі гепатоцитів і ендотеліоцитів жовчовідвідних шляхів, задіяних у патологічному процесі, негативно позначається на обміні макроелементів, що відображається на інтенсивності стабілізації електролітного та кислотно-основного балансу в організмі тварин, хворих на токсичний гепатит (Baghdasaryan et al., 2016).

У сухому залишку жовчі міститься кальцій, натрій, калій, аніони гідрокарбонату, фосфату, хлору. У свою чергу, жовч сприяє всмоктуванню, поряд з амінокислотами, холестеролу, жиророзчинних вітамінів і солей кальцію, що підтверджує регуляторну роль гепатобіліарної системи в обміні мінеральних елементів (Shapiro and Lewis, 2007; Cole et al., 2016). Очевидно, що розвиток запальної реакції та холестазу, характерний для токсичної форми гепатиту, буде відповідним чином відображатися на обміні мінеральних речовин в організмі хворих тварин.

Серед макроелементів особливе місце посідають кальцій, фосфор, магній, калій і натрій, оскільки вони беруть участь у багатьох ланках метаболізму клітин, впливають на проникність їх мембран, задіяні в енергетичних процесах на рівні мітохондрій і в генерації потенціалу дії в м'язових і нервових клітинах, сприяють вивільненню та фізіологічній дії багатьох медіаторів і гормонів, забезпечують передачу збудження вздовж нервовом'язового волокна, підтримують кислотно-основний гомеостаз організму (Koliaki et al., 2015; Verbeek et al., 2015).

Комплексне проведення біохімічних досліджень сприяє визначенню особливостей молекулярних механізмів патогенезу гепатопатології, які тісно пов'язані з розвитком запальних, дистрофічних і дегенеративних змін у паренхімі печінки та характеризують виникнення ускладнень, що вкрай важливо діагностувати на ранніх стадіях розвитку патології. За змінами біохімічних показників крові можна визначати порушення синтетичної та видільної функцій печінки, наявність і ступінь розвитку цитолізу та холестазу (Allen et al., 2011; Minhas et al, 2017) тощо. Тому мета нашого дослідження полягала у з'ясуванні особливостей біохімічних показників плазми крові та її макроелементного складу, що характеризують метаболічну та функціональну активність печінки, за експериментального токсичного гепатиту на тлі введення натрію диклофенаку.

Матеріал і методи досліджень

В експеримент залучали білих лабораторних щурів (самців), яких підбирали за принципом аналогів (Vlizlo et al., 2012), із масою тіла 200–220 г. Сформовано дві групи щурів (дослідну та контрольну) по 12 тварин у кожній. Для цього їх окремо поміщали у клітки. До початку експерименту щурів витримували на карантині з клінічним обстеженням протягом 14 діб. Тварин утримували на збалансованому раціоні, що містив усі необхідні біологічно активні та поживні речовини. Вони мали вільний доступ до корму та питної води. Проводили моніторинг зміни маси тіла та спожитого дослідними тваринами корму. Тривалість експерименту становила 14 діб.

Упродовж експерименту дотримувалися вимог «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних і наукових цілей» (Страсбург, 1986), Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» № 3447 від 21.02.2006 року.

Моделювання токсичного гепатиту в лабораторних щурів здійснювали за авторською розробкою шляхом перорального введення натрію диклофенаку (нестероїдний протизапальний препарат, НПЗП) у дозі 12,5 мг/кг маси тіла тварини протягом 14 діб (Serdyukov et al., 2008; Melnychuk and Gryshchenko, 2016), відповідно до чинних критеріїв стандартизації та якості проведення біологічних експериментів та принципів біомоделювання (Vlizlo et al., 2012). У контрольній групі перебували інтактні тварини.

Більшість НПЗП після всмоктування у шлунково-кишковому тракті надходить до печінки. У гепатоцитах вони зазнають біотрансформації (передусім за дії різних ізоензимів цитохрому P450, 2E1 та 1A2) із подальшим утворенням NAPQI (Gariani et al., 2015; Björnsson and Hoofnagle, 2016). Наступні етапи їх перетворень пов'язують із взаємодією з глутатіоном. При цьому гідрофільні метаболіти, що утворюються, транспортуються мембранозв'язаними білками гепатоцитів у жовч або кров. З організму вони видаляються через травний тракт і нирки. Зі зростанням добової дози препарату підвищується вміст NAPQI. У такому разі відмічається дефіцит глутатіону. NAPQI взаємодіє з нуклеофільними групами протеїнів гепато-

цитів, що спричиняє їх некроз. Індукція або інгібування активності печінкових ензимів за дії ксенобіотиків викликає зростання чи зменшення концентрації останніх у плазмі і, як наслідок, розвиток небажаних реакцій (передусім запалення).

Клінічні ознаки токсичного гепатиту у дослідних щурів оцінювали за комплексом показників: зовнішнім виглядом, поведінкою, апетитом, масою тіла, еластичністю шкіри, станом шерстного покриву, а також проводили огляд і пальпацію черевної стінки, характеризували калові маси згідно із загальноприйнятими методиками, описаними Vlizlo et al. (2012). Стійкі та виражені клінічні ознаки захворювання починали проявлятися у хворих тварин на сьому добу перорального введення натрію диклофенаку та відзначалися пригніченням загального стану, зменшенням рухової активності й апетиту, втратою маси тіла по групі на 10–15 г, скуйовдженням шерстного покриву, частковим зниженням еластичності та сухістю шкіри, підвищенням тонусу стінок живота, кашоподібною консистенцією та різким запахом фекалій із домішками неперетравленого корму та слизу. У таких щурів температура тіла, частота дихання та пульсу відповідали параметрам тварин контрольної групи.

Під час патолого-анатомічного розтину щурів після введення препарату натрію диклофенаку констатовано темно-вишневий колір, в'ялу консистенцію та кровонаповнення печінки, відмічаються ознаки її дистрофії, а в інтактних тварин вона відрізнялася рівномірним червоно-бурим кольором, пружною консистенцією. За гістологічного дослідження зрізів печінки хворих щурів відмічається розширення кровоносних судин та переповнення їх кров'ю, окремі клітини у стані жирової дистрофії (ядра зміщені на периферію клітини, цитоплазма прозора, клітини мають перснеподібну форму), виражений набряк просторів Діссе, спостерігається дискомплексація печінкових балок і лімфоцитарна інфільтрація сполучної тканини. Останнє свідчить про розвиток запальної реакції під час уведення в організм щурів дослідної групи натрію диклофенаку. Процес дискомплексації охоплює окремі ділянки печінкових часточок, гепатоцити розташовані невпорядковано, на малому збільшенні утворюють коміркові структури.

Установлені макроскопічні та гістологічні зміни печінки тварин дослідної групи характеризують розвиток неспецифічного реактивного гепатиту. Домінує у гістоморфологічних змінах паренхіми печінки жирова та зерниста дистрофія, втрата радіальної орієнтації пластинок гепатоцитів і розширення просторів Діссе, повнокрів'я судин. Виходячи з цього, можна припустити, що центролобулярний характер ураження печінки за дії натрію диклофенаку зумовлений перивенозною локалізацією цитохрому P_{450}, 2E1 та інших ензимів, які каталізують утворення токсичного інтермедіату – N-ацетил-пара-бензохіноніміну (Verbeek et al., 2015). Ураження гепатоцитів супроводжується запальною реакцією.

Для отримання плазми кров у щурів відбирали з черевного відділу аорти у пробірки з гепарином, потім центрифугували за 1 500 об./хв упродовж 15–20 хв. Далі досліджували біохімічні показники плазми крові (вміст загального протеїну, альбуміну, загального та кон'югованого білірубіну, глюкози, креатиніну, сечовини, триацилгліцеролів, холестеролу, величину тимолової проби, активність аспартат-амінотрансферази (АсАТ), аланін-амінотрансферази (АлАТ), лужної фосфатази (ЛФ), γ-глутамілтранспептидази (γ-ГТП), α-амілази та ліпази, а також її макроелементний склад: концентрацію натрію, калію, фосфору, кальцію, магнію, хлору на біохімічному аналізаторі «BioSystem A15» (Іспанія) відповідно до рекомендацій панелі експертів Міжнародної федерації клінічної хімії (IFCC). Для виконання зазначених досліджень використовували реактиви фірми «BioSystems» (Іспанія).

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

Результати

Результати біохімічних, у тому числі ензиматичних, досліджень плазми крові за експериментального токсичного гепатиту щурів наведено в таблицях 1 і 2. Зниження у плазмі крові тварин дослідної групи рівня загального протеїну (на 17%) на тлі зменшення вмісту альбумінів (на 11%) підтверджує порушення протеїнсинтезувальної функції печінки та розвиток запальної реакції, що, як відомо (Allen et al., 2011), характерно для цитолітичного синдрому за ураження гепатоцитів. У відповідь на гіпоальбумінемію у плазмі крові хворих тварин відмічене компенсаторне підвищення вмісту протеїнів γ-глобулінової фракції, що підтверджується позитивними результатами тимолової проби (збільшення ступеня каламутності у 2,8 раза). Як описано нами раніше (Hryschenko, 2011), за токсичного гепатиту також значно пригнічується синтез факторів згортання крові. При цьому не зазнають кількісних змін показники залишкового азоту (креатинін і сечовина), що виключає на етапі їх дослідження наявність нефропатії. У таких хворих зберігається здатність гепатоцитів синтезувати сечовину в орнітиновому циклі, хоча помітна тенденція до зменшення її концентрації у плазмі крові.

Таблиця 1
Біохімічні показники плазми крові щурів в експериментальних умовах (M ± m, n = 12)

Показник	Група	
	контрольна	дослідна
Загальний протеїн, г/л	72,9 ± 3,1	60,3 ± 3,2*
Альбумін, г/л	41,3 ± 1,6	36,8 ± 0,7*
Загальний білірубін, мкмоль/л	2,9 ± 0,2	60,5 ± 3,0*
Кон'югований білірубін, мкмоль/л	1,43 ± 0,24	25,33 ± 0,81*
Глюкоза, ммоль/л	6,40 ± 0,03	6,05 ± 0,05*
Креатинін, мкмоль/л	68,7 ± 4,1	55,8 ± 5,8
Сечовина, ммоль/л	6,3 ± 0,4	5,9 ± 0,2
Тимолова проба, S-H	0,66 ± 0,11	1,83 ± 0,06*
Триацилгліцероли, ммоль/л	1,69 ± 0,27	0,79 ± 0,15*
Холестерол, ммоль/л	3,13 ± 0,20	1,43 ± 0,04*

Примітка: * – різниця відносно щурів контрольної групи за $P < 0,05$.

Водночас зниження у плазмі крові щурів дослідної групи вмісту глюкози (на 6%) порівняно з контролем пояснюється кисневим голодуванням гепатоцитів внаслідок їх набрякання та порушення мікроциркуляції, наступною деструкцією з ушкодженням мітохондрій і зниженням інтенсивності процесів окисного фосфорилювання. У свою чергу, енергодефіцит, який при цьому розвивається, – одна з причин пригнічення синтезувальної функції печінки.

Для щурів, хворих на токсичний гепатит, характерне явище гіполіпідемії та гіпохолестеролемії, що відповідно супроводжується зменшенням у плазмі крові вмісту триацилгліцеролів на 56% і холестеролу на 54%. Розвиток у тварин дослідної групи гіполіпідемії підтверджує наявність деструктивних змін паренхіми печінки та порушення обміну ліпідів.

У плазмі крові хворих тварин має місце суттєве підвищення вмісту загального білірубіну (у 21 раз) за рахунок кон'югованої фракції (у 18 разів), що вказує на порушення пігментної та жовчовидільної функцій гепатоцитів.

Дані таблиці 2 свідчать про підвищення у плазмі крові хворих щурів активності відносно специфічних для печінки ензимів. Зростає активність АлАТ, АсАТ і ЛФ (відповідно на 28%, 45% і 30%), підвищується величина коефіцієнта АсАТ/АлАТ на 12% ($P < 0,05$) порівняно з контролем. Останнє підтверджує наявність у тварин дослідної групи деструктивних змін клітинних оболонок, у тому числі мітохондріальних мембран, за токсичної дії натрію диклофенаку на печінку, а також розвиток біохімічного синдрому гепатоцелюлярної недостатності та внутрішньопечінкового холестазу. Водночас підвищується активність γ-ГТП у 2,1 раза, амілази – в 2,4 раза, ліпази – у 8,3 раза. Висока активність γ-ГТП у плазмі крові – ознака гепатотоксичності, а гіперензимемія α-амілази та ліпази свідчить про залучення у патологічний процес підшлункової залози.

Таблиця 2
Активність ензимів плазми крові щурів
в експериментальних умовах (од./л, M ± m, n = 12)

Показник	Група	
	контрольна	дослідна
АлАТ	91,5 ± 6,6	117,3 ± 7,2*
АсАТ	89,2 ± 4,8	129,4 ± 5,8*
АсАТ/АлАТ	0,98 ± 0,01	1,10 ± 0,03*
γ-ГТП	11,3 ± 0,4	24,1 ± 0,6*
ЛФ	350 ± 15	456 ± 16*
α-Амілаза	1 025 ± 52	2 504 ± 52*
Ліпаза	4,00 ± 0,42	33,00 ± 2,11*

Примітка: див. табл. 1.

У плазмі крові щурів дослідної групи встановлено істотне зменшення вмісту кальцію (на 29%), фосфору (на 47%) та магнію (на 38%), що поряд з одночасним підвищенням величини співвідношення Ca : P на 35% свідчить про порушення обміну зазначених макроелементів в організмі за розвитку експериментального токсичного гепатиту (табл. 3).

Таблиця 3
Вміст макроелементів у плазмі крові
дослідних щурів (ммоль/л, M ± m, n = 12)

Показник	Група	
	контрольна	дослідна
Калій (K)	2,92 ± 0,39	3,11 ± 0,35
Натрій (Na)	137,9 ± 5,8	134,0 ± 7,1
Магній (Mg)	1,81 ± 0,03	1,12 ± 0,03*
Хлор (Cl)	92,5 ± 8,5	93,4 ± 6,2
Кальцій (Ca)	2,38 ± 0,14	1,70 ± 0,10*
Фосфор (P)	12,04 ± 0,38	6,33 ± 0,26*
Співвідношення Ca : P	0,20 ± 0,01	0,27 ± 0,01*

Примітка: див. табл. 1.

Обговорення

Дефіцитний рівень вказаних елементів, очевидно, є наслідком запально-дистрофічних процесів у паренхімі печінки та явища холестазу, що, як відомо (Baghdasaryan et al., 2016), спричинює зменшення вмісту глікон'югатів у жовчі та порушення засвоєння двовалентних елементів у тонкому відділі кишечника, передусім кальцію. Водночас, зниження у плазмі крові хворих щурів рівня фосфору, кальцію та магнію – результат порушення регуляторної ролі печінки щодо їх обміну в організмі та функціональних розладів мембранних іонних помп, які взаємопов'язані з індукцією деструктивних змін у гепатоцитах.

Виникнення токсичного гепатиту на ґрунті застосування токсичної дози натрію диклофенаку може спровокувати розвиток ендогенного рахіту, остеодистрофії та інших нозологічних форм остеопатії, що частково підтверджено зростанням ензиматичної активності ЛФ (табл. 2).

Пероральне введення в організм лабораторних щурів натрію диклофенаку за розробленою нами моделлю викликає запальні та деструктивні зміни у паренхімі печінки, що підтверджується результатами комплексних біохімічних досліджень.

Експериментально відтворена гепатопатологія характеризується зниженням метаболічної та функціональної активності гепатоцитів (рис.), що проявляється гіпопротеїнемією, гіпоальбумінемією, гіпоглікемією, гіполіпідемією, гіпохолестеролемією та підтверджується високими значеннями тимолової проби.

Зміни метаболізму протеїнів у печінці відзначаються, як правило, порушенням переамінування та дезамінування амінокислот із подальшим нагромадженням аміаку та інших токсичних сполук, що зумовлює розвиток відповідних ускладнень (аміак виявляє церебротоксичну дію). Водночас гіпоальбумінемія, яка відмічається у хворих на експериментальний гепатит щурів, – індикатор (Gariani et al., 2015) пригнічення білоксинтезувальної функції печінки, причиною виникнення якого може бути енергодефіцит. Останнє узгоджується з розвитком гіпоглікемії у хворих тварин. У такому разі знижується інтенсивність окисних процесів, зростає роль анаеробного гліколізу, що супроводжується надмірним утворенням недоокиснених продуктів метаболізму (лактату та піруват). Внаслідок цього порушується електролітний і кислотно-основний баланс в організмі хворих на гепатопатологію тварин (Canto et al., 2015).

За таких метаболічних зрушень відбувається руйнування лізосом, звільнення у цитозоль гідролітичних ензимів, що обертається аутолізом і загибеллю клітин (Fabbrini and Magkos, 2015). Прогресуюче зменшення вмісту альбумінів у крові здатне спричинити зниження онкотичного тиску її плазми, подальший розвиток набряків, а згодом і асцит. Як наслідок, у таких хворих відмічається компенсаторне підвищення вмісту протеїнів γ-глобулінової фракції (збільшення значень тимолової проби), до яких, передусім (Ilan, 2016) належать імуноглобуліни – захисні протеїни, фактори гуморальної ланки імунітету.

Розвиток гіполіпідемії та гіпохолестеролемії за токсичного гепатиту щурів доводить наявність деструктивних змін паренхіми печінки та характеризує порушення обміну ліпідів та синтетичної активності гепатоцитів. У гепатоцитах синтезується близько 80% холестеролу організму та забезпечується його естерифікація, трансформація в жовчні кислоти, відбувається утворення ліпопротеїдів різної щільності (передусім, низької та дуже низької щільності). Це – прояв регуляторної ролі печінки в метаболізмі ліпідів (Bhardwaj and Chalasani, 2007; Guo et al., 2011; Gooijert et al., 2014).

Моделювання у лабораторних тварин медикаментозної форми токсичного гепатиту із застосуванням натрію диклофенаку супроводжується порушенням пігментної функції печінки. Гіпербілірубінемія (підвищення вмісту загального білірубіну в 21 раз) і посилення інтенсивності процесів кон'югації у печінці (збільшення концентрації кон'югованого білірубіну у 18 разів) – прояви її компенсаторної реакції, спрямованої на зменшення токсичного впливу некон'югованого білірубіну на організм хворих тварин, що попереджає виникнення білірубінової енцефалопатії (Allen et al., 2011; Baghdasaryan et al., 2016).

Для хворих тварин характерний розвиток гепатоцелюлярної недостатності, цитолітичного синдрому та біліарної обструкції, що підтверджується гіперензимемією АлАТ, АсАТ, ЛФ і γ-ГТП. У свою чергу, зростання коефіцієнта АсАТ/АлАТ на 12% доводить наявність уражень внутрішньоклітинних мембран органел (передусім мітохондрій), що пояснює виникнення порушень енергетичної, синтетичної, регуляторної та інших функцій травної залози за токсичної дії натрію диклофенаку.

Встановлені факти доповнюють дані літератури про те, що визначення активності амінотрансфераз – досить чутливий та інформативний тест щодо змін проникності клітинних мембран гепатоцитів під час ураження печінки екзо- чи ендогенними токсинами (Morita et al., 2009; Saba et al., 2010; Vyshtakaliuk et al., 2015). Одночасне дослідження у плазмі крові активності γ-ГТП, амінотрансфераз і ЛФ має велике діагностичне значення за комплексного ураження гепатобіліарної системи. У свою чергу, γ-ГТП чутливіша до виникнення структурно-функціональних порушень у клітинах печінки, ніж АсАТ, АлАТ і ЛФ. Таким чином, активність γ-ГТП належить до важливих ознак гепатотоксичності і є позитивною у 90% випадках захворювань печінки (Gariani et al., 2015; Verbeek et al., 2015).

Істотне зростання у плазмі крові хворих тварин активності α-амілази та ліпази (відповідно в 2,4 і 8,3 раза) свідчить про залучення у патологічний процес підшлункової залози, а, отже, розвиток ускладнення експериментальної гепатопатології.

Водночас серед установлених закономірностей у хворих тварин слід відзначити гіпокальціємію, гіпофосфатемію та гіпомагніємію за одночасного зростання співвідношення Ca : P (на 35%), що свідчить про якісні зміни гідроксиапатиту кісткової тканини. Дефіцитний рівень у плазмі крові таких щурів кальцію, фосфору та магнію можна пояснити розвитком запально-дистрофічних змін у паренхімі печінки та внутрішньо-

печінкового холестазу, а також вторинним виникненням гострих розладів травлення на тлі токсичної форми гепатопатології. У подальшому це може спричинити зниження інтенсивності кісткового метаболізму та формування схильності до резорбційних процесів. Таким чином, патологія печінки у вигляді медикаментозної форми токсичного гепатиту може спровокувати порушення процесів осифікації та розвиток ендогенного рахіту, остеодистрофії та інших нозологічних форм остеопатії, що частково вже підтверджено зростанням ферментативної активності ЛФ на 30% (табл. 2), яке може бути наслідком не лише розвитку внутрішньопечінкового холестазу, а й підвищення активності кісткового ізоензиму.

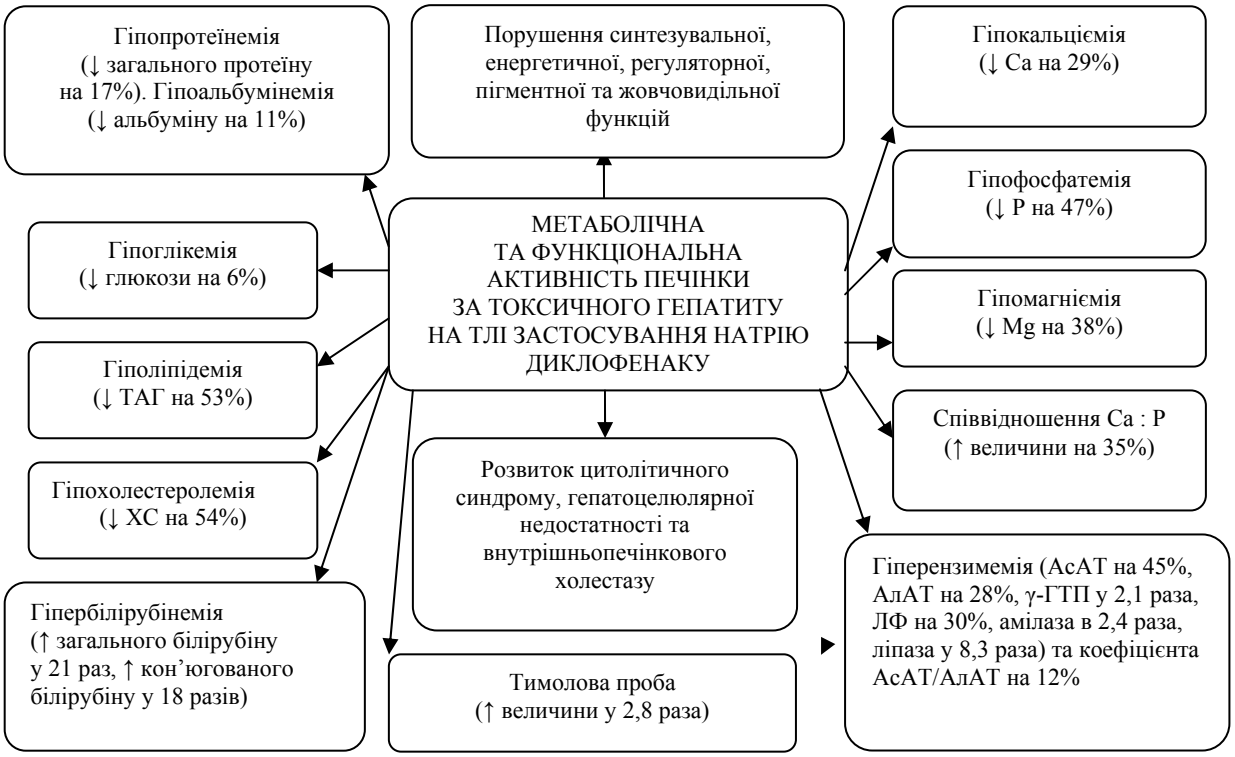


Рис. Особливості метаболічної та функціональної активності печінки за токсичного гепатиту на тлі введення натрію диклофенаку

Фізіологічна роль двовалентних катіонів винятково важлива для повноцінного перебігу багатьох внутрішньоклітинних процесів. Збіднення тканин і органів на зазначені вище макроелементи негативно позначається на внутрішньоклітинному метаболізмі, особливо протеїнсинтезувальній функції гепатоцитів (Hryschenko et al., 2011; Blas-Garcia et al., 2016), що відмічається у випадку експериментального гепатиту. При цьому виникає зростання градієнта концентрації H^+ на плазматичній мембрані клітин, яке істотно впливає на функціональну активність іонних помп, а, отже, інтенсивність і напрям трансмембранних та біохімічних процесів (Cole et al., 2016). Регуляторна роль печінки у підтриманні кислотно-лужного балансу в організмі ссавців полягає у тому, що в гепатоцитах відбувається остаточна утилізація недоокиснених продуктів проміжних етапів метаболізму протеїнів, ліпідів і вуглеводів (Canto et al., 2015). А тому за патології печінки можливе надлишкове утворення кислих метаболітів (передусім, лактату, пірувату, кетонових тіл) та відповідний розвиток ацидемії. Як наслідок розвивається енергодефіцит, що певною мірою пояснює формування у хворих щурів гіпоглікемії.

Висновки

У результаті комплексного аналізу біохімічних показників і макроелементного складу плазми крові щурів за експериментального токсичного гепатиту на тлі перорального введення в їх організм натрію диклофенаку встановлено порушення функціонального стану печінки та біліарної системи. Передусім це проявляється розладами метаболічної активності та відповідними змінами синтезувальної, енергетичної, регуляторної, пігментної та жовчовидільної функцій. При цьому виражених змін зазнають такі біохімічні показники плазми крові як уміст загального протеїну (зменшується на 17%), альбуміну (зменшується на 11%), загального та кон'югованого білірубіну (відповідно зростає у 21 і 18 разів), триацилгліцеролів і холестеролу (відповідно зменшується на 53% і 54%), активність АсАТ (зростає на 45%), АлАТ (підвищується на 28%), величина коефіцієнта АсАТ/АлАТ (збільшується на 12%), γ-ГТП (зростає у 2,1 раза) і ЛФ (збільшується на 30%). Водночас гіперензимемія α-амілази в 2,4 раза та ліпази у 8,3 раза свідчить про комплексний характер патології із залученням у патологічний процес підшлункової залози.

У хворих тварин відмічається зменшення в плазмі крові концентрації кальцію, фосфору, магнію (відповідно на 29%, 47% і 38%) та співвідношення Са : Р (підвищується на 35%) порівняно з контролем. Дефіцит в організмі хворих зазначених макроелементів, ймовірно, пов'язаний із порушенням їх засвоєння на рівні травного каналу, транзиторними втратами через вторинні розлади травлення, що супроводжують цю патологію, виснаженням депо організму на ці елементи, змінами регуляторної ролі печінки, а також функціональними розладами мембранних іонних помп. Вочевидь, патологія печінки у вигляді медикаментозної форми токсичного гепатиту може спровокувати розвиток ендогенного рахіту, остеодистрофії та інших нозологічних форм остеопатії, що частково вже підтверджено зростанням ензиматичної активності ЛФ.

Комплексне дослідження біохімічних показників плазми крові дозволило визначити особливості метаболічних зрушень на тлі застосування токсичних доз натрію диклофенаку, що характерно і для інших НПЗП, та своєчасно діагностувати патологію печінки внаслідок її медикаментозного ураження, що важливо у призначенні ефективної терапії.

На перспективу планується приділити увагу особливостям змін метаболічної активності печінки, взаємопов'язаних із розвитком репаративних процесів за гепатопатології та у випадку застосування засобів клітинної терапії.

References

Allen, K., Jaeschke, H., & Copple, B. L. (2011). Bile acids induce inflammatory genes in hepatocytes: A novel mechanism of inflammation during obstructive cholestasis. American Journal of Pathology, 178(1), 175–186.

Baghdasaryan, A., Fuchs, C. D., Osterreicher, C. H., Lemberger, U. J., Halilbasic, E., Pahlman, I., Graffner, H., Krones, E., Fickert, P., Wahlström, A., Stahlman, M., Paumgartner, G., Marschall, H.-U., & Trauner, M. (2016). Inhibition of intestinal bile acid absorption improves cholestatic liver and bile duct injury in a mouse model of sclerosing cholangitis. Journal of Hepatology, 64(3), 674–681.

Bawany, M. Z., Bhutto, B., Youssef, W. I., Nawras, A., & Sodeman, T. (2013). Acute liver failure: an uncommon complication of commonly used medication. American Journal of Therapeutics, 20(5), 566–568.

Bhardwaj, S., & Chalasani, N. (2007). Lipid lowering agents that cause drug-induced hepatotoxicity. Clinics in Liver Disease, 11(3), 597–613.

Björnsson, E. S., & Hoofnagle, J. H. (2016). Categorization of drugs implicated in causing liver injury: Critical assessment based on published case reports. Hepatology, 63(2), 590–603.

Blas-Garcia, A., Apostolova, N., Valls-Belles, V., & Esplugues, J. V. (2016). Endoplasmic reticulum and mitochondria: Independent roles and crosstalk in fatty liver diseases and hepatic inflammation. Current Pharmaceutical Design, 22(18), 2607–2618.

Bunchorntavakul, C., & Reddy, K. R. (2012). Review article: Herbal and dietary supplement hepatotoxicity. Alimentary Pharmacology and Therapeutics, 37(1), 3–17.

Calderon, R. M., Cubeddu, L. X., Goldberg, R. B., & Schiff, E. R. (2010). Statins in the treatment of dyslipidemia in the presence of elevated liver aminotransferase levels: A therapeutic dilemma. Mayo Clinic Proceedings, 85, 349–356.

Canto, C., Menzies, K. J., & Auwerx, J. (2015). NAD(+) metabolism and the control of energy homeostasis: A balancing act between mitochondria and the nucleus. Cell Metabolism, 22, 31–53.

Chalasani, N. (2005). Statins and hepatotoxicity: Focus on patients with fatty liver. Hepatology, 41(4), 690–695.

Chang, C. Y., & Schiano, T. D. (2007). Drug hepatotoxicity. Alimentary Pharmacology and Therapeutics, 25, 1135–1151.

Cole, H. L., Pennycook, S., & Hayes, P. C. (2016). The impact of proton pump inhibitor therapy on patients with liver disease. Alimentary Pharmacology and Therapeutics, 44(11–12), 1213–1223.

Donnelly, M. C., Davidson, J. S., Martin, K., Baird, A., Hayes, P. C., & Simpson, K. J. (2017). Acute liver failure in Scotland: Changes in aetiology and outcomes over time (the Scottish Look-Back Study). Alimentary Pharmacology and Therapeutics, 45(6), 833–843.

Fabbrini, E., & Magkos, F. (2015). Hepatic steatosis as a marker of metabolic dysfunction. Nutrients, 7(6), 4995–5019.

Gariani, K., Menzies, K. J., Ryu, D., Wegner, C. J., Wang, X., Ropelle, E. R., Moullan, N., Zhang, H., Perino, A., Lemos, V., Kim, B., Park, Y.-K., Piersigilli, A., Pham, T. X., Yang, Y., Ku, C. S., Koo, S. I., Fomitchova, A., Cantó, C., Schoonjans, K. A., Sauve, A., Lee, J.-Y., & Auwerx, J. (2015). Eliciting the mitochondrial unfolded protein response via NAD repletion reverses fatty liver disease. Hepatology, 63(4), 1190–1204.

Gariani, K., Ryu, D., Menzies, K. J., Yi, H.-S., Stein, S., Zhang, H., Perino, A., Lemos, V., Katsyuba, E., Jha, P., Vijgen, S., Rubbia-Brandt, L., Kim, Y. K., Kim, J. T., Kim, K. S., Shong, M., Schoonjans, K., & Auwerx, J. (2017). Inhibiting poly ADP-ribosylation increases fatty acid oxidation and protects against fatty liver disease. Journal of Hepatology, 66(1), 132–141.

Gooijert, K. E., Havinga, R., Wolters, H., Wang, R., Ling, V., Tazuma, S., & Verkade, H. J. (2014). The mechanism of increased biliary lipid secretion in mice with genetic inactivation of bile salt export pump. AJP Gastrointestinal and Liver Physiology, 308(5), 450–457.

Guo, Z., Liu, X. M., Zhang, Q. X., Shen, Z., Tian, F. W., Zhang, H., Sun, Z. H., Zhang, H. P., & Chen, W. (2011). Influence of consumption of probiotics on the plasma lipid profile: A meta-analysis of randomised controlled trials. Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases, 21(11), 844–850.

Hryschenko, V. A., Tomchuk, V. A., Lytvynenko, O. N., Chemyshenko, V. O., Gryschuk, V. I., & Platonova, T. M. (2011). Otsinka proteyinsintezuyuchoyi funktsiyi pechinki za eksperimentalnogo gepatitu [An estimate of protein synthesis in liver under induced hepatitis]. Ukrainian Biochemistry Journal, 83(1), 63–68 (in Ukrainian).

Ilan, Y. (2016). Novel methods for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis – targeting the gut immune system to decrease the systemic inflammatory response without immune suppression. Alimentary Pharmacology and Therapeutics, 44(11–12), 1152–1167.

Ipsen, D. H., Tveden-Nyborg, P., & Lykkesfeldt, J. (2016). Normal weight dyslipidemia: Is it all about the liver? Obesity, 24(3), 556–567.

Koliaki, C., Szendroedi, J., Kaul, K., Jelenik, T., Nowotny, P., Jankowiak, F., Herder, C., Carstensen, M., Krausch, M., Knoefel, W. T., & Schlensak, M. R. (2015). Adaptation of hepatic mitochondrial function in humans with non-alcoholic fatty liver is lost in steatohepatitis. Cell Metabolism, 21(5), 739–746.

Lin, S. C., Heba, E., Bettencourt, R., Lin, G. Y., Valasek, M. A., Lunde, O., Hamilton, G., Sirlin, C. B., & Loomba, R. (2017). Assessment of treatment response in non-alcoholic steatohepatitis using advanced magnetic resonance imaging. Alimentary Pharmacology and Therapeutics, 45(6), 844–854.

Malhi, H., & Kaufman, R. J. (2011). Endoplasmic reticulum stress in liver disease. Journal of Hepatology, 54(4). 795–809.

Melnychuk, D. O., & Gryshchenko, V. A. (2016). Sposib modelyuvannya toksichnogo gepatitu [Method modeling of toxic hepatitis]. Patent UA, 105657, 2016 (in Ukrainian).

Minhas, A. M., Usman, M. S., Khan, M. S., Fatima, K., Mangi, M. A., & Illovsky, M. A. (2017). Link between non-alcoholic fatty liver disease and atrial fibrillation: A systematic review and meta-analysis. Cureus, 9(4), e1142.

Moole, H., Ahmed, Z., Saxena, N., Puli, S. R., & Dhillon, S. (2015). Oral clindamycin causing acute cholestatic hepatitis without ductopenia: A brief review of idiosyncratic drug-induced liver injury and a case report. Journal of Community Hospital Internal Medicine Perspective, 5(4), 1–5.

Morita, M., Akai, S., Hosomi, H., Tsuneyama, K., Nakajima, M., & Yokoi, T. (2009). Drug-induced hepato-toxicity test using gamma-glutamylcysteine synthetase knockdown rat. Toxicology Letters, 189(2), 159–165.

Okudo, J., & Anusim, N. (2016). Hepatotoxicity due to clindamycin in combination with acetaminophen in a 62-year-old african american female: A case report and review of the literature. Case Reports in Hepatology, 2016, 1–5.

Rahmani, S., Asgary, S., Askari, G., Keshvari, M., Hatamipou, M., Feizi, A., & Sahebkar, A. (2016). Treatment of non-alcoholic fatty liver disease with curcumin: A randomized placebo-controlled trial. Phytotherapy Research, 30(9), 1540–1548.

Saba, A. B., Oyagbemi, A. A., & Azeez, O. I. (2010). Amelioration of carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity and haemotoxicity by aqueous leaf extract of *Cnidoscolus aconitifolius* in rats. Nigerian Journal of Physiological Sciences, 25, 130–147.

Serdyukov, Y. K., Lytvynenko, O. N., & Gryshchenko, V. A. (2008). Patologo-anatomichni ta gistologichni zmini v pechintsi shchuriv za medikamentoznogo gepatitu [Pathologo anatomical and histological changes are in liver of rats with drug induced hepatitis]. Suchasni Problemi Toksikologiyi, (2), 63–65 (in Ukrainian).

Shapiro, M. A., & Lewis, J. H. (2007). Causality assessment of drug-induced hepatotoxicity: Promises and pitfalls. Clinics in Liver Disease, 11(3), 477–505.

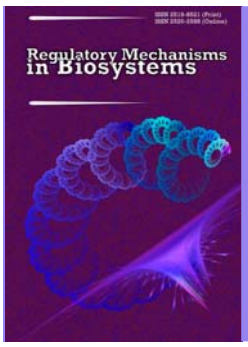
Taleb, M., Almasri, I., Siam, N., Najim, A., & Ahmed, A. (2014). The effect of atorvastatin on liver function among patients with coronary heart disease in Gaza Strip. Pharmacology and Pharmacy, 5(8), 781–788.

Teschke, R., Schulze, J., Schwarzenboeck, A., & Frenzel, C. (2013). Herbal hepatotoxicity: Suspected cases assessed for alternative causes. European Journal of Gastroenterology and Hepatology, 25(9), 1093–1098.

Verbeek, J., Lannoo, M., Pirinen, E., Ryu, D., Spincemaille, P., Vander Elst, I., Windmolders, P., Thevissen, K., Cammue, B. P. A., Van Pelt, J., Fransis, S., Van Eyken, P., Groote, C. C.-D., Van Veldhoven, P. P., Bedossa, P., Nevens, F., Auwerx, J., & Cassiman, D. (2015). Roux-en-y gastric bypass attenuates hepatic mitochondrial dysfunction in mice with non-alcoholic steatohepatitis. Gut, 64(4), 673–683.

Vlizlo, V. V., Fedoruk, R. S., & Ratych, I. B. (2012). Laboratorni metody doslidzhen u biolohiyi, tvarynnytstvi 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* (Hydroxyethyldimethyldihydropyrimidine) on the rat liver recovery under toxic damage induced by carbon tetrachloride. Biochemistry, Biophysics and Molecular Biology, 462(1), 143–146.



Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(2), 197–203
doi: 10.15421/021731

Myofascial syndrome as a pathogenetic mechanism for formation of scoliosis in people with multiple sclerosis

Y. Lysenko

Precarpatian National University named after Vasyl' Stefanyk, Ivano-Frankivsk, Ukraine

Article info

Received 24.03.2017
Received in revised form 20.04.2017
Accepted 23.04.2017

Precarpatian National University named after Vasyl' Stefanyk, Shevchenko Str., 57, Ivano-Frankivsk, 76018, Ukraine. Tel.: +38-066-07-12-052. E-mail: uristOO@mail.ru

Lysenko, Y. (2017). Myofascial syndrome as a pathogenetic mechanism for formation of scoliosis in people with multiple sclerosis. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(2), 197–203. doi:10.15421/021731

The purpose of this research was to conduct a comprehensive analysis of clinical changes and electroneuromyographic indices in people with multiple sclerosis in combination with various types of functional disorders of posture. The study involved 105 people with multiple sclerosis aged 26–58 who were undergoing rehabilitation at a specialized medical center. The degree of spasticity of the muscles was determined by the modified Ashworth scale. To assess the intensity and nature of pain, a neurologic examination was performed using a visual analogue scale and a McGilovsky pain questionnaire. Interference and stimulation electroneuromyography was used to characterize the functional state of the peripheral neuromotor apparatus of skeletal muscles, the results of which determined the maximum arbitrary contraction of the muscle using quantitative analysis of time, amplitude and frequency parameters, and also determined the speed of the pulse, the amplitude and duration of the F wave, latent period and polyphase M-wave, monosynaptic testing (H-reflex) was carried out. The percentage of H_{max}/M_{max} was calculated from the electroneuromyographic results. By the ratio between the maximum and minimum amplitude of the M-response, the number of motor units was calculated. To analyze the denervation-reinvational processes of motor units and degenerative-restorative changes in the muscle fibers, spontaneous fibrillation potentials and positive acute waves were recorded. By the stage of manifestation of pain myofascial syndrome, all patients were divided into three groups, in which the force characteristics decreased by 10.2%, 25.0% and 30.2%, respectively. It is well understood in clinic-instrumental research, that in 67.3% cases of multiple sclerosis the patient also suffers from functional scoliosis. This pathological symptom complex contributes to the creation of not only muscular, but also fascial-ligamental trigger points. They, in turn, are the source of the formation of secondary trigger loci. In terms of the degree of manifestation of subjective pain in the presence of myo-fascial syndrome, all patients were divided into three groups, and depending on the value of individual indicators, three stages of spontaneous fibrillation potentials were identified that clearly correlate with the degree of fibromyalgic syndrome and manifest specific electroneuromyographic disorders in each of these stages. The main pathogenetic mechanism that contributes to the formation of pathological bends of the spine in people with multiple sclerosis is a painful muscular-fascial syndrome. It is provoked by myofascial hypertonia and takes part in the development of cross syndromes, which is also manifested by clear changes in electroneuromyographic parameters in the form of asymmetric muscle tone. This article discusses clinical variants of the course of local muscular-tonic syndromes. Pathogenetic approaches to the prevention of posture disorders in patients with multiple sclerosis are presented here.

Keywords: multiple sclerosis; myofascial syndrome; pain; posture; scoliosis; electroneuromiography

Міофасціальний синдром як патогенетичний механізм формування сколіозу в людей із розсіяним склерозом

Ю. Лисенко

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

Проаналізовано клінічні зміни та електронейроміографічні показники людей із розсіяним склерозом у комплексі з різними видами функціональних порушень постави. У дослідженні брали участь 105 людей із розсіяним склерозом віком 26–58 років, які проходять реабілітацію у спеціалізованому медичному центрі. Під час клініко-інструментального дослідження встановлено, що у пацієнтів із розсіяним склерозом у 67,3% випадків спостерігаються функціональні порушення постави. Цей патологічний симптомокомплекс сприяє створенню не тільки м'язових, а й фасціально-зв'язкових тригерних пунктів. Вони, у свою чергу, стають джерелом формування вторинних тригерних локусів. За ступенем прояву суб'єктивних больових відчуттів за наявності міофасціального синдрому всі пацієнти поділені на три групи, а залежно від величини окремих показників виділено три стадії формування спонтанних потенціалів фібриляцій, які чітко корелюють зі ступенем фіброміалгічного синдрому, що проявляється специфічними електронейроміографічними порушеннями в кожній із цих стадій. Основний патогенетичний механізм, який сприяє формуванню патологічних згинів хребта у людей із розсіяним склерозом, –

больовий м'язово-фасціальний синдром. Він провокується міофасціальним гіпертонусом і бере участь у розвитку перехресних синдромів, що також проявляється чіткими змінами електронейроміографічних показників у вигляді асиметричного м'язового тонусу. У статті обговорюються клінічні варіанти перебігу локальних м'язово-тонічних синдромів. Обгрунтовано патогенетичні підходи до профілактики порушень постави у пацієнтів із розсіяним склерозом.

Ключові слова: розсіяний склероз; міофасціальний синдром; біль; постава; сколіоз; електронейроміографія

Вступ

Розсіяний склероз – хронічна нейродегенераторна хвороба центральної нервової системи, за якої відбувається вогнищева демієлінізація нервової тканини, що стає причиною неправильної передачі імпульсів уздовж нервових волокон у головному та спинному мозку (Hsieh et al., 2011). Ця хвороба має багатофазовий перебіг із періодами загострень, які стають однією із причин інвалідності серед молодих людей (до 40 років) і зустрічаються, як правило, частіше у жінок, ніж у чоловіків. Захворюваність коливається від 30 до 100 на 100 тис. населення (Hutchinson, 2013).

Серед багатьох вогнищевих симптомів найчастіше виявляються порушення моторики, чутливості (парестезії), мозочкові (порушення рівноваги) та зорові розлади, порушення діяльності вегетативної нервової системи, больові синдроми, а також психічні дисфункції – порушення когнітивних функцій (Hilz, 2016). Як правило, спочатку хворий починає відчувати ослаблення ізольованих м'язових груп, а пізніше з'являється підвищений м'язовий тонус (спастичність), який ускладнює виконання окремих рухів, іноді робить їх навіть цілком неможливими (Miller, 2013).

За сучасними даними медичної статистики, лідерство у різноманітних проявах розсіяного склерозу тримає гострий і хронічний біль (Dommerholt and Bron, 2013). За даними Henriksson (2013), клінічні прояви больових м'язових тригерних пунктів спостерігаються у 85,9% пацієнтів із даною патологією, а терапевтичні ефекти від методів і засобів їх лікування не викликають зменшення частоти їх рецидивів.

Останніми роками, базуючись на накопичених фактах, сформульовано чітку теорію генераторних систем. За цією теорією, основа патологічного болю – створення в центральній нервовій системі генератора патологічно посиленого збудження (сукупності гіперактивних нейронів). Ця гіперактивація (розгальмовування) нейронів і утворення генератора можливі із залученням синаптичного чи несинаптичного механізмів. Тривало існуючий генератор, по-перше, закріпляє свою структуру у вигляді нейропластичних змін, а, по-друге, чинить патологічний вплив на інші структури ноніцептивної системи, захоплюючи їх у патологічну больову систему. Клінічно больовий синдром проявляється тільки тоді, коли у патологічну больову систему включається соматосенсорна та орбітофронтальна кора головного мозку. Обов'язкова умова формування генератора патологічної больової системи – слабкість гальмівних систем, тобто антиальгічної системи, яка, за даними Suputtitada (2016), страждає за розсіяного склерозу.

При цьому окремі автори (Colbert and Borg-Stein, 2016) вказують, що больові відчуття найбільше виявляються у молодому та середньому віці (в основному до 50 років). Із збільшенням віку спостерігається збільшення проявів не стільки больових відчуттів, скільки обмеження рухливості, особливо за рахунок зменшення гнучкості (Hutchinson, 2014). Хронічний біль і зменшення рухової активності – ланки одного патологічного кола, яке має дезадаптивне значення для організму людини з розсіяним склерозом. Через зниження гнучкості розвиваються різні порушення з боку м'язової системи, що проявляється у вигляді асиметрії та дистонії основних груп м'язів. Це, у свою чергу, викликає порушення постави внаслідок недосконалості «м'язового корсета».

За даними різних авторів, розсіяний склероз іноді супроводжується функціональними порушеннями постави різного ступеня вираженості. Це – несприятливе ускладнення, яке значно знижує рівень ефективності лікувально-реабілітаційних заходів у таких пацієнтів (Roeing et al., 2017). Якщо ознаки функціонального порушення постави тривають більше одного року, воно може створити всі умови для виникнення більш грізного ускладнення – сколіозу, який проявляється комплексом дегенеративно-дистрофічних змін у складових хребта (Hutchinson, 2014). Дегенеративно-дистрофічні зміни хребта викликають специфічний больовий синдром, у реалізації якого переважно задіяні м'язи, фасції та зв'язки, тому він отримав назву м'язово-фасціальний синдром (Colbert and Borg-Stein, 2016). Тригерна точка цього синдрому – міофасціальний гіпертонус (Hilz, 2016). Однак роль кожного з них у загальній структурі больового м'язово-фасціального синдрому за розсіяного склерозу залишається маловивченою.

Недосконалість або патологія аферентної частини багатьох аналізаторів спричинює формування патологічної постави, оскільки відсутня інформаційна база для формування повноцінної фізіологічної функціональної системи (Pandey et al., 2014). У людей із розсіяним склерозом функціональні порушення постави чи патологічні форми хребта формуються пришвидшеними темпами та спостерігаються у багатьох випадках уже на ранніх етапах перебігу цього захворювання (Miller, 2013). Незважаючи на значну кількість досліджень, праці щодо вивчення вертебрологічної патології в людей із розсіяним склерозом поодинокі, а результати таких досліджень фрагментарні, вимагають узагальнення (Kanekar and Aruin, 2013). Поряд із цим вимагають своєї інтерпретації електронейроміографічні показники за функціональних порушень постави чи вираженої патології хребта у людей із розсіяним склерозом (Partanen et al., 2010).

Мета цієї статті – проаналізувати клінічні зміни та електронейроміографічні показники в людей із розсіяним склерозом із функціональними порушеннями постави.

Матеріал і методи досліджень

Обстежено 105 людей із розсіяним склерозом, віком 26–58 років, які проходять реабілітацію у спеціалізованому центрі (м. Славськ, Польща). Ступінь спастичності м'язів визначали за модифікованою шкалою Ашворта, що дозволяє виявити порушення різного ступеня (1, 1+, 2, 3) за суб'єктивно-об'єктивними ознаками, які проявляються підвищенням м'язового тонусу чи опором м'язів залежно від відсотка можливої амплітуди рухів у суглобах і характеру утруднення цих рухів під час пасивних рухів (Hutchinson, 2013). Для встановлення давності захворювання проаналізовано медичні картки.

Проведено неврологічне обстеження всіх пацієнтів із використанням тестів оцінювання інтенсивності та характеру болю (візуально-аналогова шкала та опитувальник болю Мак-Гіловського). Крім цього проведено обстеження обсягу рухових функцій, м'язового тонусу, чутливих порушень (шкала стану функціональних систем Курцке Disability Status Scale, Functional System Score, шкала неврологічного дефіциту, шкала ADL).

Ступінь прояву міофасціального больового синдрому діагностували методом пальпації за схемою, запропонованою Simons and Dommemolt (2007).

Для характеристики функціонального стану периферичного нейромоторного апарату скелетних м'язів використано стимуляційну та інтерференційну електронейроміографію, яку проведено на комп'ютерному електронейроміографічному комплексі «Нейро-ЕМГ-Мікро» виробництва фірми «Нейрософт» (Росія), який має низький рівень шумів, високу чутливість (10–500 мкВ/см) та стійкість до спотворень.

Досліджували максимальне довільне скорочення м'яза з використанням кількісного аналізу часових, амплітудних і частотних параметрів. Визначали швидкість проведення імпульсу, амплітуду та тривалість F-хвилі, амплітуду, латентний період і поліфазність М-хвилі, проводили моносинаптичне тестування (Н-рефлекс). За електронейроміографічними результатами розраховували відсоток співвідношення H_{max}/M_{max}. За співвідношенням між максимальною та мінімальною амплітудою М-відповіді розраховували кількість рухових одиниць (РО). Для аналізу денерваційно-реінерваційних процесів рухових одиниць і дегенеративно-відновних змін у м'язових волокнах реєстрували спонтанні потенціали фібриляцій і позитивні гострі хвилі.

Максимальну швидкість проведення імпульсу (ШПП) по нервових волокнах визначали за формулою: $\frac{S}{t_2 - t_1}$, м/с, де t_1 – латентний період у разі подразнення нерва в дистальній точці (с), t_2 – латентний період при подразненні нерва в проксимальній точці (с), S – відстань між проксимальною та дистальною точками стимуляції (м).

Статистичне опрацювання результатів електронейроміографічних досліджень здійснювали за допомогою програмного пакета GrafPad Prism 4.0 (GrafPad Sowtware Inc., США).

Результати

Аналіз медичних карток свідчив, що за давністю захворювання всі пацієнти спеціалізованого реабілітаційного центру розподілені таким чином: до 5 років – 15 хворих (17,6%), до 10 – 36 (42,6%), до 15 – 30 (35,2%), понад 15 років – 4 (4,7%). За симптоматикою: порушення черепних нервів (крім II пари) домінували у 10 (8,5%) хворих, симптоми ураження пірамідного шляху – у 38 (32,3%), порушення координації – у 18 (15,3%), порушення чутливості – у 19 (16,2%).

Дані клініко-антропометричного дослідження вказують на наявність у 67,6% пацієнтів із розсіяним склерозом функціональних порушень постави. У таких пацієнтів визначаються значно вищий ступінь болю у поперековому відділі хребта, шиї та грудній клітці.

За ступенем прояву больового міофасціального синдрому всі пацієнти поділені на три групи.

Першу групу складають 31,6% пацієнтів, у яких спостерігаються вогнищеві болі, що проявляються тільки за активної локомоції. Ці болі провокуються надавлюванням або розтягуванням, в основному, довгих м'язів спини, консистенція яких має локальні м'язові ущільнення. При цьому поперечна пальпація цих м'язів не супроводжується локальною спастичною відповіддю, а силові характеристики залишаються без змін.

До другої групи увійшли 47,3% пацієнтів, у яких спостерігаються спонтанні тягнучо-ниючі болі в усьому м'язі. До його складу входить активний тригерний пункт із регіонарною м'язовою тонічною реакцією. Ці явища відбуваються у м'язах-синергістах. Під час пальпації у поперечному напрямку виявляються шкірні гіпералгічні зони, що викликають локальний спазм. Порівняно з м'язами контрлатеральної сторони силові характеристики зменшуються на 25,0% ($P < 0,05$).

Третя група (21,1% пацієнтів) характеризується вираженими дифузними болями, що виникають під час як активних, так і пасивних рухів і характерні для м'язів антагоністів і синергістів. Біль при цьому визначається активним тригерним пунктом із генералізованою м'язово-тонічною реакцією. Сила м'язів знижується на 30,2% ($P < 0,05$).

У результаті пальпаторного обстеження м'язів спини та зон больової реакції в усіх обстежених пацієнтів виявлено активні тригерні пункти, які більшою мірою превалювали у м'язах поперекового відділу хребта (табл.). Для пацієнтів із функціональними порушеннями постави та хворих без такого порушення зареєстровано вірогідну ($P < 0,05$) різницю за відносною кількістю хворих із рівнем напруження м'язів величиною в 1 бал (на 8,2%) і 3 бали (на 8,6%) за майже рівної кількості хворих із величиною напруження м'язів у 2 бали (різниця невірогідна, складає тільки 0,4%, $P > 0,05$).

Чим вища вираженість больових відчуттів, тим частіше тригерні пункти формуються у додаткових анатомічних утвореннях, зокрема у зв'язках і фасціях. При цьому основні скарги людей першої групи зводяться до локального болю на проблемному боці функціонального порушення постави, яка має місцевий прояв і виникає під час розтягування та місцевого натискання. В останньому випадку біль зникає після незначного розтягування.

Таблиця

Міофасціальні тригерні пункти та ступінь напруження м'язів у хворих на розсіяний склероз залежно від наявності функціональних порушень постави

Показник	Кількість тригерних пунктів			
	пацієнти з функціональними порушеннями постави, n = 71		пацієнти без порушень постави, n = 34	
Міофасціальні тригерні пункти	абс.	%	абс.	%
	71	100	34	100
Ступінь напруження м'язів				
1 бал	5	7,2	5	15,4*
2 бали	39	54,9	19	55,3
3 бали	27	37,9	10	29,3*

Примітка: * – $P < 0,05$ порівняно з I групою.

У людей другої групи крім локальної болючості визначаються локальні ущільнення м'язів, спостерігається активний міогенний тригерний пункт. Він характеризується спонтанною та відображеною (ексвізитною) болючістю, локальною спастичною відповіддю, зміною координаційних співвідношень у вигляді синергічних рухів і дестабілізації реципрокних взаємовідношень.

В обстежених третьої групи під час глибокої, проникаючої ковзкої пальпації в ділянці локальної болючості спостерігаються твердіші ділянки, які практично не деформуються під час натискання та розтягування.

Результати обстеження хворих за модифікованою шкалою Ашворта показали, що всі ступені спастичності м'язів виявляються майже з однаковою частотою в усіх пацієнтів. При цьому перший ступінь визначається у 19,0% хворих, ступінь 1+ у вигляді легкого підвищення м'язового тонусу та мінімального опору м'язів у половині цілої амплітуди руху виявляється також у 19,0% пацієнтів, ступінь 2, що проявляється помірним підвищенням м'язового тонусу протягом усього об'єму чи діапазону можливого для даного суглоба руху на фоні неутруднених пасивних рухів установлено у 24,0% усіх обстежених, ступінь 3 у вигляді значного підвищення м'язового тонусу та утруднених пасивних рухів спостерігається ще у 19,0% випадків. На цьому фоні у 81,0% хворих із геміпарезами виявлено вторинний міофасціальний больовий синдром.

При цьому зниження м'язової сили четвертого ступеня за шкалою Lovetta виявлено у 21,0% осіб, третього – у 22,0% пацієнтів, другого – у 38,0% хворих.

У цих людей нерідко спостерігається надлишкове поєднане залучення у скоротливу активність ближніх і віддалених агоністів, що проявляється регіонарними м'язово-тонічними реакціями, які не мають пристосувального значення.

Наведені дані, а також відсутність об'єктивних критеріїв, що визначають формування міофасціального гіпертонусу спонукали нас до проведення електронейроміографічного обстеження. У результаті встановлено, що у людей першої групи спостерігаються потенціали занурення (тобто під час уведення голкового електрода), які тривають понад 10 с. Розподіл діаграми потенціалу дії рухової одиниці за тривалістю характеризується нормальними значеннями у 76,4% (від загальної кількості) у зоні тривалості 6–10 мс. При цьому у 12,5% випадків вони мають вкорочені (менше 5 мс) і в 11,1% – подовжені (понад 10 мс) потенціали (рис. 1).

У пацієнтів другої групи поряд із потенціалами занурення характер діаграм потенціалу дії рухової одиниці характеризується розподілом на рівні 50,0% загальної кількості у зоні потенціалів тривалістю 6–10 мс, 20,1% – вкорочених і 29,9% – подовжених.

У хворих третьої групи розподіл діаграм характеризується пропорційним розподілом потенціалу дії рухової одиниці: 50,0% – у зоні середньої тривалості, по 25,0% – у зоні вкорочених і тривалих потенціалів. Крім того, у третій групі спостерігається «залпова» електроміографічна активність під час поперечної пальпації м'язів. Результати такого розподілу підтверджують дані нашого обстеження, які вказують на різке зниження активності окремих частин опорно-рухового апарату для забезпечення найпростіших і найнадійніших характеристик локомоцій, які спостерігаються в усіх пацієнтів із розсіяним склерозом у вигляді патологічних рефлекторних реакцій (34,6% випадків), підтримання гіпертонусу (76,1%), порушення силових характеристик м'язів (89,2%), реципрокних відношень (45,3%), синергізму та антагонізму цілих груп скелетних м'язів (відповідно у 23,7% та 27,8% пацієнтів).

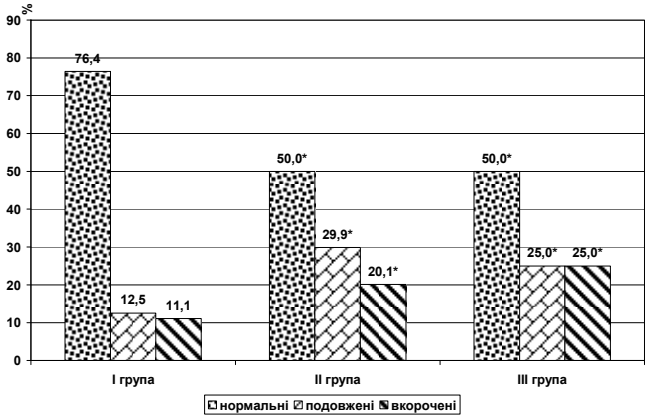


Рис. 1. Розподіл потенціалу дії рухової одиниці у різних групах людей із розсіяним склерозом залежно від ступеня прояву больового міофасціального синдрому: * – $P < 0,05$ порівняно з першою групою

Залежно від величини показників електронейроміографії виділено три стадії формування спонтанних потенціалів фібриляцій:

– на першій стадії визначаються дисфункція корекційної побудови локомоцій, що реалізується у вигляді локальних м'язових і фасціальних гіпертонусів тих груп м'язів, які розташовані на контрлатеральному боці від патологічного згину хребта;

– на другій стадії змінюється стереотип рухів, з'являються тонічні порушення, пов'язані з порушенням постави, що супроводжується генералізованими, регіонарними, перехресними або пошаровими синдромами;

– для третьої стадії характерне збільшення детермінації міофасціального гіпертонусу за рахунок участі супрасегментарних центрів вегетативної нервової системи, що проявляється індивідуальними порушеннями вегетативного тонусу (у 48,2% пацієнтів), дестабілізацією сну (у 79,3%), депресивними реакціями (83,1% випадків).

Формування психовегетативного синдрому за поєднаної патології (РС + сколіоз + плоскостопість) відбувається нерівномірно (у різних пацієнтів від 1,0 до 2,5 року). Однак за наявності сформованого фіброміалгічного компонента (протягом 3–6 місяців) функціональний дефіцит протибольової системи сприяє його пришвидшеному формуванню у 35,7% пацієнтів.

Залежно від цього ми виділяємо три ступені фіброміалгічного синдрому:

1) легкий ступінь виражається активацією тригерних феноменів у вигляді локальної болючості, ущільненням і судомами (як відповідь на міофасціальні гіпертонуси, у 46,2% пацієнтів), що проявляються вкороченням і гіпотонічністю м'язів, місцевими полімоторними реакціями, гіпергідрозом шкіри. У цій стадії спостерігаються синдроми переднього драбинчастого, грушоподібного, малого грудного, великого та малого заднього прямих м'язів голови та розгиначів спини (рис. 2);

2) середній ступінь характеризується певними електронейроміографічними порушеннями (рис. 3) та приєднанням порушення рухового стереотипу, а вторинний синдром вегетативної дисфункції може бути перманентним або пароксизмальним у формі астенії (27,2% пацієнтів), звуження діапазону вегетативного реагування (33,2% пацієнтів), перехресних синдромів (27,8% випадків), незначними змінами постави (від 15,3% до 37,9% обстежених хворих), зниження рухливості під час виконання складних рухових комплексів. Зранку у 75,6% таких пацієнтів є скарги на тугорухомість і ломоту в усьому тілі, які проходять після розминки;

3) важкий ступінь характеризується вираженими електронейроміографічними порушеннями у вигляді асиметричного тонусу м'язів-розгиначів тулуба (рис. 4) та сформованими перехресними синдромами.

У таких пацієнтів формується специфічний тип локомоторної організації, яка характеризується незграбністю рухів, невмінням розслаблятися, вони погано повторюють фізичні вправи, передбачені реабілітаційною програмою. У 83,4% цих хворих виявлено виражений шийний гіперлордоз, сутулість, плечі припідняті, медіальний край лопатки висувається допереду, нерідко виявляється також поперековий гіперлордоз.

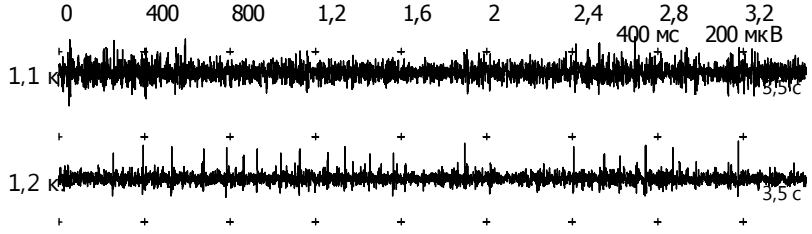


Рис. 2. Характер електронейроміографічної асиметрії у пацієнта з легким ступенем фіброміалгічного синдрому за розсіяного склерозу у поєднанні з функціональними порушеннями постави: 1,1 к: пр., *Erector trunci* (*spinae*), *nn. Intercostales*, T_9–T_{12}; 1,2 к: лів., *Erector trunci* (*spinae*), *nn. Intercostales*, T_9–T_{12}

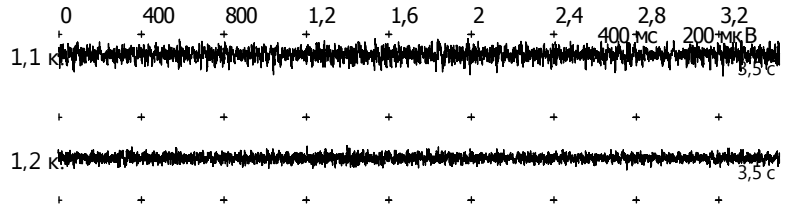


Рис. 3. Характер електронейроміографічної асиметрії у пацієнта із середнім ступенем фіброміалгічного синдрому за розсіяного склерозу у поєднанні з функціональними порушеннями постави: 1,1 к: пр., *Erector trunci* (*spinae*), *nn. Intercostales*, T_9–T_{12}; 1,2 к: лів., *Erector trunci* (*spinae*), *nn. Intercostales*, T_9–T_{12}

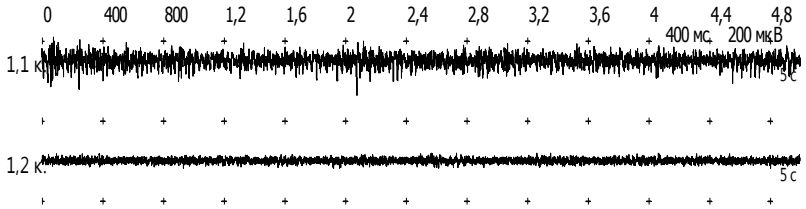


Рис. 4. Характер електронейроміографічної асиметрії у пацієнта з важким ступенем фіброміалгічного синдрому за розсіяного склерозу у поєднанні з функціональними порушеннями постави: 1,1 к: пр., *Erector trunci* (*spinae*), *nn. Intercostales*, T_9–T_{12}; 1,2 к: лів., *Erector trunci* (*spinae*), *nn. Intercostales*, T_9–T_{12}

Обговорення

Результати досліджень вказують на те, що розсіянний склероз часто супроводжується функціональними порушеннями постави. На цей факт інші автори мало звертали увагу, однак саме таке поєднання часто створює значні труднощі не тільки для діагностики, а й під час проведення реабілітаційних заходів, оскільки в цій ситуації, залежно від ступеня важкості перебігу основного захворювання, тригерні пункти часто можуть формуватися не тільки у м'язах, а й у зв'язках і фасціях (Colbert and Borg-Stein, 2016).

Дослідженнями Dommerholt and Bron (2013) встановлено, що ці анатомічні утворення володіють контрактильними властивостями, тому можуть брати участь у формуванні первинних або вторинних фасціально-зв'язкових тригерних локусів. Ми встановили, що первинні фасціально-зв'язкові тригерні пункти утворюються внаслідок локальної контрактильної властивості зв'язок без участі м'язів. Вторинні фасціально-зв'язкові тригерні пункти формуються в динамічних частинах м'язів (фасціях, апоневрозах тощо) і проявляються після утворення міогенного тригерного пункту. Обидва види фасціально-зв'язкових тригерних пунктів мають близький патогенетичний механізм, а за близькістю суб'єктивного прояву окремі автори об'єднують їх під назвою больового міофібрилярного синдрому (Partanen et al., 2010). Низкою досліджень (Hsieh, 2011) установлено, що тривало існуючий міогенний і фасціально-зв'язковий гіпертонус спричиняє фіброзне переродження м'язової тканини. При цьому відомо (Buskila, 2010), що локальний, латентний м'язовий біль має місцевий прояв і виникає під час розтягування та місцевого натискання. За даними Wiles (2008), в останньому випадку біль може зникати після незначного розтягування.

Наші дані узгоджуються з результатами досліджень інших авторів (Partanen, 2010; Kanekar and Aruin, 2013), які вказують, що у цих людей нерідко спостерігається надлишкове поєднане залучення до скоротливої активності ближніх і віддалених агоністів, яке проявляється регіонарними м'язово-тонічними реакціями, що не мають пристосувального значення. На нашу думку, підвищена синергічна активність агоністів реципрокно створює вплив на антагоністи, формуючи патологічні координаційні комплекси. Це положення підтверджується у працях низки авторів (Gerwin, 2010), які вказують на прямо пропорційну залежність і прямий вплив супрасегментарних регуляторів рухових актів на рівень больових відчуттів у локальних м'язових ущільненнях.

Міофасціальний больовий синдром за розсіяного склерозу виникає у період гострої стадії захворювання, коли різко зростає спастичність і порушення рухових стереотипів (Daniels and Ishmael, 2010). Найчастіша локалізація тригерних точок у м'язах плечового поясу спостерігається у м'язах-ротаторах плечового суглоба, двоголовому м'язі плеча та верхній частині трапецієподібного м'яза. При цьому тригерні точки розташовуються як у самому м'язі, так і в м'язових сухожилках.

Установлений нами специфічний характер пропорційності розподілу потенціалу дії рухової одиниці (50,0% – у зоні середньої тривалості та по 25,0% – у зоні вкорочених і тривалих потенціалів) вказує на «залпову» електроміографічну активність під час поперечної пальпації м'язів, що відповідає локальній спастичній відповіді (Miller, 2013).

Із урахуванням теорії створення поліфункціональних систем організму потрібно зазначити, що будь-який біологічний пристосувальний результат (або руховий факт) являє собою універсальну форму саморегульованої системи. Тому під час порушення супрасегментарної взаємодії або сегментарних механізмів побудови локомоцій, які спостерігаються за розсіяного склерозу у поєднанні з функціональними порушеннями постави, руйнується негативний зворотний зв'язок. Це, у свою чергу, стає основою для розпаду поліфункціональної системи, оскільки відсутнє узгодження між параметрами конкретного результату дії та параметрами аферентного синтезу, який здійснюється акцептором за фізіологічних умов. Результат такого розладу між окремими частинами поліфункціональної системи – різке зниження активності окремих частин опорно-рухового апарату під час забезпечення найпростіших і надійних характеристик локомоцій. Створюються патологічні умови для реалізації простих рефлекторних реакцій, підтримання гіпертонусу, порушення силових характеристик м'язів, реципрокних відносин, синергії та антагонізму цілих груп скелетних м'язів. Отже, за розсіяного склерозу у поєднанні з іншою патологією порушується сам програмний тип пошуку вибору та інтеграції різних виконавчих можливостей опорно-рухового апарату, що викликає формування неправильного рухового стереотипу в організмі таких хворих. Формується міофасціальний гіпертонус, який змінює програму реалізації рухового завдання щодо підтримання правильної фізіологічної постави.

Міофасціальний гіпертонус викликає електронейроміографічні зміни, зафіксовані нами у пацієнтів із таким патологічним поєднанням як розсіяний склероз і функціональні порушення постави та зміни за монопатології хребта чи поєднання «сколіоз і плоскостопість», показані у публікаціях інших авторів (Pandey et al., 2014). Різниця цих електронейроміографічних показників чітко вказує на супра- та сегментарний рівень порушень у хворих із розсіяним склерозом, що може бути використано для діагностики їх схильності до сколіозу чи поєднання сколіозу зі змінами склепінчастого апарату стопи.

Цей факт потребує спеціального дослідження та буде являти для нас особливий інтерес у майбутній серії досліджень.

За поєднаної патології активний міофасціальний гіпертонус набуває властивостей генератора патологічно підсиленого збудження, що сприяє перетворенню негативного зворотного зв'язку на позитивний зв'язок. Це вказує на трансформацію фізіологічної функціональної системи на патологічну функціональну систему. Деякі автори (Kanekar and Aruin, 2013) вказують, що патологічна функціональна система побудована за принципом взаємодії позитивних зворотних зв'язків, а її стійкий патологічний стан підтримується активним станом у вигляді міофасціального гіпертонусу в аферентному синтезі виконавчих структур опорно-рухового апарату на різних рівнях організації. Тому відбувається десинхронізація в роботі фізіологічної функціональної системи внаслідок наростаючої детермінації патологічної активності. При цьому міофасціальному гіпертонусу відводиться особлива роль у появі додаткових зворотних позитивних зв'язків у програмі побудови системи локомоцій за розсіяного склерозу у поєднанні з порушеннями постави.

На наш погляд, різний ступінь прояву порушень постави може впливати на виявлену різницю електронейроміографічних показників у хворих із розсіяним склерозом. Тому, залежно від величини електронейроміографічних показників, ми виділили три стадії формування патологічної функціональної системи.

Перша стадія визначається дисфункцією корекційної побудови локомоцій і реалізується у вигляді локальних м'язових і фасціальних гіпертонусів тих груп м'язів, які розташовані на контрлатеральному боці від патологічного згину хребта.

На другій стадії змінюється стереотип рухів, з'являються тонічні порушення, пов'язані з порушенням постави. Вони проявляються у вигляді генералізованих, регіонарних, перехресних або пошарових синдромів.

Для третьої стадії характерне збільшення детермінації міофасціального гіпертонусу за рахунок участі супрасегментарних центрів вегетативної нервової системи, що проявляється індивідуальними порушеннями вегетативного тонусу, дестабілізацією сну, депресивними реакціями.

Потрібно зазначити, що формування розгорнутої клінічної картини психовегетативного синдрому за сколіозу – тривалий процес, а функціональний дефіцит протибольової системи сприяє формуванню фіброміалгічного компонента протягом не менше трьох місяців.

Із позиції теорії функціональних систем доцільно виділяти три ступені фіброміалгічного синдрому.

Легкий ступінь виражається активацією тригерних феноменів у вигляді локальної болючості, ущільненням і судомами у відповідь на міофасціальні гіпертонуси. При цьому кількість тригерних точок, їх розподіл у м'язах, фасціях і сухожиллях не мають принципового значення. З'являються вкорочені та гіпотонічні («в'ялі») м'язи. Вегетативні порушення мають яскраво виражений характер у вигляді місцевої полімоторної реакції, пітливості, зниження електричного імпедансу шкіри тощо. На цій стадії спостерігаються синдроми переднього драбинчастого, грушоподібного, малого грудного, великого та малого заднього прямого м'язів голови тощо.

Середній ступінь: до вищезазначених змін приєднується порушення рухового стереотипу, а вторинний синдром вегетативної дисфункції може бути перманентним або пароксизмальним у формі астенії, звуження діапазону вегетативного реагування, перехресних синдромів, різкої зміни постави, зниження спритності під час виконання складних рухових комплексів. Зранку у пацієнтів реєструються скарги на тугорухомість і ломоту в усьому тілі, які минають після розминки.

Весь комплекс патологічної перебудови локомоторного стереотипу базується на різних рухових дефектах, які визначаються дисфункціями на рівні палідонігральної організації поліфункціональної системи.

Важкий ступінь характеризується сформованими перехресними синдромами. Такі пацієнти мають специфічний тип локомоторної організації, характеризуються незграбністю рухів, невмінням розслаблятися, вони погано навчаються гімнастичних вправ тощо. У них часто спостерігається виражений шийний гіперлордоз, сутулість, плечі припідняті та висуваються вперед, нерідко виявляється також поперековий гіперлордоз.

Враховуючи те, що один з основних проявів розсіяного склерозу – враження системи зорового аналізотора, а фіброміалгічний синдром вимагає застосування значного арсеналу медикаментозних засобів, які часто протипоказані саме за захворювань цього аналізатора, для компенсації невротичних, депресивних і вегетативних розладів необхідний, а іноді і єдиний засіб – методи фізичної реабілітації (Niraj, 2012).

Висновки

Міофасціальний гіпертонус з поєднанням розсіяного склерозу та функціональних порушень постави формується в три етапи: а) залишкова деформація м'язів за ізометричного виду роботи мінімальної інтенсивності та максимальної тривалості з патологічною перебудовою архітектоніки м'яза, що викликає спотворення пропріоцентивної активності з ділянки гіпертонусу; б) створення аферентації регуляторних релейних пунктів як сегментарного апарату спинного мозку (кільцево-корекційний тип локомоцій), так і супрасегментарних структур (програмний тип організації локомоторного акту) у центральній нервовій системі; в) перебудова нормального локомоторного стереотипу у патологічно сформований фібро-больовий синдром, який має латентний і активний тригерний феномен.

Різний ступінь порушення постави за розсіяного склерозу має типові клінічні та електронейрографічні прояви, патогномонічні з яких: а) наявність потенціалів занурення тривалістю понад 10 с (зміна гістограми розподілу потенціалів дії рухових одиниць за рахунок їх перекалібрування; б) збільшення кількості вкорочених і подовжених та зменшення середніх за тривалістю потенціалів; в) створення «залпової» електронейрографічної активності під час поперечної пальпації м'язів.

Міофібрилярний больовий комплекс – типовий патологічний сидром, характерний для поєднання розсіяного склерозу та функціональних порушень постави, а його ініціатор – міофасціальний гіпертонус.

Перспективи подальших досліджень полягають у вивченні впливу засобів фізичної реабілітації на прояв фіброміалгічного синдрому в людей із розсіяним склерозом і схильністю до патології хребта або вираженим сколіозом із порушенням склепінчастого апарату стопи того чи іншого ступеня важкості.

References

Buskila, D. (2010). Fibromyalgia, chronic fatigue syndrome, and myofascial pain syndrome. Current Opinion in Orthopedics, 11(1), 49–55.

Colbert, M., & Borg-Stein, J. (2016). Fibromyalgia, myofascial pain syndrome, and related conditions. Pathology and Intervention in Musculoskeletal Rehabilitation, 1164–1174.

Daniels, J. M., & Ishmael, T. (2010). Managing myofascial pain syndrome. The Physician and Sports Medicine, 38(4), 39–45.

Dommerholt, J., & Bron, C. (2013). Myofascial pain syndrome: Trigger points. Journal of Musculoskeletal Pain, 21(2), 183–195.

Gerwin, R. (2010). Myofascial pain syndrome: Here we are, where must we go? Journal of Musculoskeletal Pain, 18(4), 329–347.

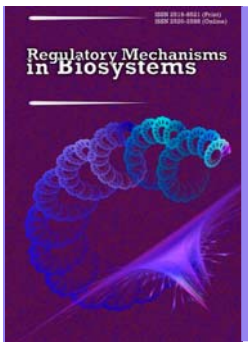
Henriksson, K. G. (2013). Hypersensitivity in muscle pain syndromes. Current Pain and Headache Reports, 7(6), 426–432.

Hilz, M. J. (2016). Cardiac stunning as first manifestation of multiple sclerosis: A case report reminding us not-overlook cardiovascular autonomic dysfunction in multiples clerosis. Multiple Sclerosis Journal, 22(6), 847–848.

Hsieh, Y. L., Chou, L. W., Joe, Y. S., & Hong, C. Z. (2011). Spinal cord mechanism involving the remote effects of dry needling on the irritability of myofascial trigger spots in rabbit skeletal muscle. Archives of Physical Medicine and Rehabilitation, 92, 1098–1105.

Hutchinson, M. (2013). The best clinical paper on multiple sclerosis in 2012: Commentary. Multiple Sclerosis Journal, 19(5), 522–523.

Hutchinson, M. (2014). The best basic science paper in multiple sclerosis in 2013: Disease specific molecular events in cortical multiple sclerosis lesions. Multiple Sclerosis Journal, 20(14), 1817–1818.
Kanekar, N., & Aruin, A. S. (2013). The role of clinical and instrumented outcome measures in balance control of individuals with multiple sclerosis. Multiple Sclerosis International, 20(13), 1–10.
Miller, A. E. (2013). The best clinical paper on multiple sclerosis in 2012. Multiple Sclerosis Journal, 19(5), 520–521.
Niraj, G. (2012). Ultrasound-guided pulsed radiofrequency treatment of myofascial pain syndrome: A case series. British Journal of Anaesthesia, 109(4), 645–646.
Pandey, K. S., Krieger, S. C., Farrell, C., Hannigan, C., DeAngelis, T., Miller, A. E., & Lublin, F. D. (2014). Clinical course in multiple sclerosis patients presenting with a history of progressive disease. Multiple Sclerosis and Related Disorders, 3(1), 67–71.
Partanen, J. V., Tuula, A., Ojala, T. A., & Arokoski, J. P. A. (2010). Myofascial syndrome and pain: A neurophysiological approach. Pathophysiology, 17(1), 19–28.
Roeing, K. L., Moon, Y., & Sosnoff, J. J. (2017). Unplanned gait termination in individuals with multiple sclerosis. Gait and Posture, 53, 168–172.
Simons, D. G., & Dommemolt, J. (2007) Myofascial pain syndromes – trigger points. Journal of Musculoskeletal Pain, 15(2), 69–84.
Suputtitada, A. (2016). Myofascial pain syndrome and sensitization. Physical Medicine and Rehabilitation Research, 1(5), 1–4.
Wiles, C. (2008). Physiotherapy and related activities in multiple sclerosis. Multiple Sclerosis Journal, 14(7), 863–871.



Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(2), 204–209
doi: 10.15421/021732

Immunohistochemical tests for diagnostics of infiltrative forms of breast cancer and identification of molecular subtype in women of different ages in Dnipro city

T. M. Shevchenko, P. V. Gazdyuk, A. M. Bondar, O. Y. Govoruha

Oles Honchar Dnipro National University, Dnipro, Ukraine

Article info

Received 25.03.2017
Received in revised form 28.04.2017
Accepted 05.05.2017

Oles Honchar Dnipro National University, Gagarin Ave., 72, Dnipro, 49010, Ukraine.
Tel. +38-056-372-58-76.
E-mail: klinlab@ua.fm

Shevchenko, T. M., Gazdyuk, P. V., Bondar, A. M., & Govoruha, O. Y. (2017). Immunohistochemical tests for diagnostics of infiltrative forms of breast cancer and identification of molecular subtype in women of different ages in Dnipro city. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(2), 204–209. doi:10.15421/021732

The article presents the results of histological and immunohistochemical testing of women of different ages who are suffering from infiltrative forms of breast cancer in Dnipro. The study presents the distribution of receptors of estrogens and progesterone (ER, PR), HER-2/neu (necessary for prescribing treatment) and Ki-67 (reveals additional features of a tumour). Considering that luminal types of breast cancer include tumours whose receptors express to ER and PR, depending on the kind of expression HER2/neu, they are classified into A (do not express HER2/neu) and B (express HER2/neu). Tumours with hyperexpression of HER2/neu and lack of ER and PR are called HER2+. The research conducted has shown that duct cancer is by far the commonest form, at 81%. In duct cancer, undifferentiated stage and moderately-differentiated stage cancer prevails, whereas with nodule cancer the majority (80%) have moderately-differentiated stage cancer. We discovered a correlative link between the stage of differentiation and the percentage of metastasis both in duct and nodule breast cancer. But nodule breast cancer is more aggressive: with metastasis occurring in 31.2% of women even in cases of moderately-differentiated stage cancer. Only duct cancer is able to produce slime, which distinguishes it from other forms. Combined forms of cancer are rare, but they lead to metastases in all cases. Most women with infiltrative cancer in Dnipro are aged between 51 and 60. There has been observed the increase in cases of breast cancer among young women; the most widespread among infiltrated forms of breast cancer is subtype Luminal A, which has the best prognosis. As the research shows, women under 60 tend to have less aggressive subtypes, which are easy to treat, whereas in older patients their aggressiveness increases substantially, which means an unfavourable prognosis and lower effectiveness of treatment. Ki-67 marker increases substantially in the absence of ER and PR, which means a high level of tumour aggressiveness. Luminal A subtype in not aggressive in most cases, which means the most favourable prognosis. Luminal B is partly aggressive which leads to a high percentage of metastasis, but thanks to ER+ or PR+, it is successfully treated by hormone therapy, which can lead to a positive prognosis. Overall, HER2+ and triple negative are the most aggressive.

Keywords: immunohistochemistry; breast cancer; receptor to estrogen; receptor to progesteron; marker Ki-67

Імуногістохімічне дослідження для діагностики інфільтративних форм раку молочної залози та визначення молекулярного підтипу в жінок різного віку м. Дніпро

Т. М. Шевченко, П. В. Газдюк, А. М. Бондар, О. Ю. Говоруха

Дніпровський національний університет імені Олеся Гончара, Дніпро, Україна

Наведено результати гістологічних та імуногістохімічних досліджень у хворих на інфільтративні форми раку молочної залози (РМЗ) у жінок різного віку міста Дніпро. Проаналізовано розподіл рецепторів естрогенів і прогестерону (ER, PR), HER2/neu (необхідні для призначення лікування) і Ki-67 (розкриває додаткові властивості пухлини). Вважаючи, що до люмінальних типів РМЗ належать пухлини, рецептори яких експресують до ER та PR, залежно від експресії HER2/neu їх класифікують на А (не експресують HER2/neu) і В (експресують HER2/neu). HER2+ називаються пухлини з гіперекспресією HER2/neu і відсутністю ER та PR. Проведені дослідження визначили, що достовірно частіше зустрічається протоковий рак (81%). Серед протокового раку превалює рак недиференційованого та помірнодиференційованого ступеня, тоді як за дольковий більша частина (80%) має помірнодиференційований рак. Виявлено зворотний кореляційний зв'язок між ступенем диференціювання та відсотком трапляння метастазів як за протокового, так і за дольковий РМЗ. Але дольковий рак агресивніший: навіть за помірнодиференційованого ступіня у 31% жінок виявленно метастази, а за недиференційованого в усіх випадках (100%). Тільки протоковий рак здатен до слизоутворення, що відрізняє його від інших форм. Комбінований РМЗ зустрічається рідко, але в усіх випадках він метастазує. Основна частина жінок з інфільтративним раком у м. Дніпро мають вік від 51–

60 років. Відзначається збільшення кількості РМЗ серед молодих жінок, найчастіше з інфільтративних форм РМЗ виявляється підтип Luminal A, який має найліпший прогноз. У жінок до 60 років переважають менш агресивні підтипи, які добре піддаються лікуванню, тоді як у старшому віці значно збільшується їх агресивність, що говорить про поганий прогноз і гіршу ефективність лікування. Маркер Кі-67 значно збільшується за відсутності ER і PR, що говорить про високу агресивність пухлини. Підтип Luminal A у більшості випадків неагресивний, що свідчить про найліпший прогноз. Luminal B хоч і володіє невеликою агресивністю, яка говорить про більшу частоту метастазування, але завдяки ER+, і/ або PR+ добре піддається гормонотерапії, що має позитивне значення у прогнозі, тоді як HER2+ та Triple negative відзначаються найвищою агресивністю.

Ключові слова: імуногістохімія; рак молочної залози; рецептори до естрогену; рецептори до прогестерону; маркер Кі-67

Вступ

Високий рівень і темпи зростання захворюваності на РМЗ, які залишаються незмінними, зумовлюють актуальність наукових досліджень у цій галузі. На відміну від економічно розвинених країн, де РМЗ становить 26% загальної кількості випадків захворювання на рак у жінок, і Японії, де показник дорівнює 6%, Україна посідає проміжне місце – 18% випадків раку у жінок (Siegel et al., 2016).

Імуногістохімічне дослідження проводиться як попередній загальний скринінг, який добре зарекомендував себе в лікуванні хворих на рак молочної залози та дозволяє забезпечити максимальну ефективність лікування, уникнути при цьому невиправданих витрат.

Високий ризик розвитку РМЗ відзначають у жінок із раннім початком менструацій (до 12 років), пізньою менопаузою, народженням першої дитини у віці понад 30 років, перериванням вагітності, відсутністю пологів. У молодому та пременопаузальному віці все частіше виявляють РМЗ агресивних форм (Olopade et al., 2008; Bertos et al., 2011).

Головний вплив на розвиток РМЗ чинить зміна гормонального балансу. Частота РМЗ у жінок із підвищеним вмістом естрогену у тканинах і плазмі нижча, ніж у жінок, в яких підвищений рівень двох гормонів – естрогену та прогестерону одночасно (Fisher et al., 1989; Bardou et al., 2003; Castellano et al., 2010; Clarke et al., 2015), а в постменопаузі у плазмі крові змінюється співвідношення рівня тестостерону, андростендіону та глобуліну, що зв'язує статеві гормони (SHBG). Жінки з ознаками гіперкортицизму, гіпертонічним компонентом, хворобами печінки, віком 50–59 років і старші мають значно більший ризик розвитку РМЗ.

Підвищена маса тіла та гіподинамічний спосіб життя пов'язані з розвитком резистентності до інсуліну, яка спричинює підвищення його вироблення. Потужний викид інсуліну, а також інсуліноподібного фактора росту (ILGF) сприяє підвищенню синтезу яєчниками або наднирниками статевих гормонів, зокрема андрогенів, зниженню утворення печінкою глобуліну SHBG, який зв'язує їх. У жінок у постменопаузі це зумовлює підвищення рівня естрону та, відповідно, збільшує ризик розвитку РМЗ (Loi et al., 2007; Gucalp et al., 2013).

РМЗ нерідко пов'язаний із генетичними аномаліями. Ген BRCA-1 (міститься на довгому плечі 17-ї хромосоми) бере участь в усуненні пошкоджень ДНК або знищенні клітин, в яких репарація неможлива. Його мутація зумовлює 56–87% ризик розвитку РМЗ у віці 70 років і 33–50% – 50 років.

Вживання алкоголю (в тому числі в невеликій кількості) помірно підвищує ризик розвитку РМЗ, проте не виключено, що впливає і одночасний прийом гормонів або генетична схильність. Вплив куріння фахівці продовжують обговорювати, відзначаючи, що тютюн як антиестроген може чинити захисну дію. Що стосується впливу іонізуючого випромінювання, то дані тривалих спостережень за мешканками Хіросіми та Нагасакі свідчать про підвищення ризику розвитку РМЗ, особливо якщо вплив відбувся у період статевого дозрівання (Jordan, 2014).

Висунуто також вірусну теорію розвитку РМЗ. В експериментах на мишах ретровіруси викликали зміни на молочній залозі. Фіброзно-кістозна мастопатія та інші проліферативні захворювання молочних залоз підвищують ризк розвитку РМЗ.

За анатомічними ознаками виділяють:

– вузлові форми (обмежений вузол у молочній залозі);

– дифузні форми (набрякова, дифузно-інфільтративна, лімфангітична, мастотоподібна, панцерна);

– атипові форми (рак Педжета, первинно-метастатичний рак без виявленого пухлинного процесу в молочній залозі).

Згідно з класифікацією ВООЗ, гістологічні варіанти раку молочної залози: 1) неінфільтративний, 2) інфільтративний, 3) рак Педжета.

Гістологічне дослідження дає можливість установити наявність раку, визначити гістологічну форму (протоковий, дольковий, комбінований) та стадію диференціювання (високо-, помірно-, або недиференційований рак). Але цього недостатньо для вибору тактики та ефективності лікування, визначення прогнозу, на відміну від морфологічних підтипів, які розкривають біологічні особливості пухлини. Тому додатково проводять визначення експресії рецепторів до онкомаркерів за допомогою ІГХ. Його суть полягає у визначенні локалізації антигенів за допомогою специфічних антитіл, тобто імунологічні реакції «перенесені» на предметне скло морфолога (Isola, 1993; Nadji et al., 2005; Schnitt, 2010).

Молекулярні маркери пухлини (клітинні, тканинні, біологічні) визначаються безпосередньо у пухлинній тканині або в субклітинних фракціях (цитозоль, мембрани тощо). Вони відображають різні аспекти та рівні функціонування клітини, специфіку її «поведінки» та регуляції – гормональну чутливість, схильність до інвазії та метастазування (Brenton et al., 2005; Hu et al., 2006; Holm et al., 2010; Haibe-Kains et al., 2012). Основні маркери РМЗ – рецептори до естрогенів і прогестерону (ER, PR), her-2/neu і Кі-67. На основі цих маркерів визначають молекулярні підтипи РМЗ (Cheang et al., 2009).

Естрогени – група жіночих статевих гормонів, що синтезуються в організмі яєчниками та регулюють специфічні статеві функції. Прогестерон (гестаген) – основний гормон жовтого тіла, що також секретується корою наднирників. Він – попередник у біосинтезі глюкокортикоїдів. Прогестерон впливає на проліферацію мамарного епітелію, через це використовується для пояснення резистентності, що поступово розвивається, до стероїдів у міру прогресу РМЗ. PR синтезується у клітині за впливу естрогенів, а, отже, є показником функціональної активності ER.

У нормі в епітелії молочної залози спостерігається невисока експресія ER і PR (7–30% клітин залежно від фази циклу або гормонального фону), тоді як за пухлинної трансформації значно підвищується експресія обох маркерів, що корелює з гістологічним диференціюванням пухлини у відповідь на гормональну терапію (Massarweh et al., 2008; Melchor et al., 2008; Lonning, 2012).

Реакції на прогестерон і естроген вважають найпотужнішими маркерами за захворювання завдяки специфічній будові лігандів, а також способу синтеза та взаємозалежності з мРНК. За впливу на них жіночих статевих гормонів утворюється комплекс, який стимулює пухлину до розмноження. Чутливість пухлини до гормонів визначається збереженням у пухлині рецепторів, здатних сприйняти гормональний сигнал і транслоціювати його в ядро. Є відомості про існування різних форм рецепторів до естрогенів і прогестерону: РЕ-альфа, РЕ-бета, РП-А і РП-В. Із присутністю РЕ-альфа у пухлинах молочної залози пов'язана чутливість до тамоксифену. Рецептори прогестерону, представлені ізоформами А і В, відіграють різні ролі у проникненні стероїдів усередину клітини. А такі препарати як тамоксифен і фарестон (група антиестрогенів) впливають саме на ці рецептори, блокуючи їх, не даючи пухлинній клітині розмножуватися.

Вміст рецепторів естрогену та прогестерону завжди вищий у високодиференційованих пухлинах, а також у хворих, що перебувають у постменопаузі, порівняно з жінками репродуктивного та пременопаузального віку. У рецептор-негативних пухлинах проліферація пухлинних клітин у 10 разів активніша (Kim et al., 2012; Loi et al., 2009).

Велика частина даних базується на дослідженні рецепторів ER і PR біохімічним методом, який не дозволяє оцінити рецептори гормонів тільки у клітинах пухлини, а визначає наявність рецепторів гормонів у всьому тканинному шматочку, у тому числі у стромі та нормальних протоках молочної залози. Тоді як ІГХ дозволяє уникнути цього, оскільки досліджується тканинний зріз із візуальним забарвленням структури пухлини та локалізацій рецепторів ER і PR.

Human Epidermal growth factor Receptor 2 – фактор пухлинного росту та прогресії HER2/neu (c-erbB-2) – ген родини рецепторів епідермального чинника зростання. Він локалізується на мембранах клітин та після зв'язування з лігандами активує кінази. Крім того, експресія HER2/neu відіграє важливішу роль, ніж більшість інших факторів, у прогнозі та термінах виникнення рецидиву у хворих із метастазами в лімфовузлах (Geyer et al., 2006).

У лікарській практиці маркер HER2/neu вважають чинником несприятливого прогнозу, а його високу експресію – показником високої метастатичної здатності пухлини та можливої резистентності до лікування.

У нормі через HER2/neu рецептори організм контролює процес росту, поділу та самовідновлення здорових клітин молочної залози. Під час порушення регуляції ген c-erbB-2 виробляє занадто багато однойменних рецепторів, і після зв'язування їх із білком HER2/neu клітина отримує сигнал на неконтрольоване зростання та поділ, після чого перетворюється на ракову.

Підвищений вміст білка (p185) і ампліфікація гена c-erbB-2 із підвищеним виробленням рецептора HER2/neu характеризує HER2 позитивний рак молочної залози. Рак молочної залози з нормальним вмістом гена, рецептора та білка називається HER2 негативним. HER2 позитивний рак молочної залози відрізняється агресивним перебігом, зростає та поширюється швидше, ніж HER2 негативний рак молочної залози. Іноді HER2 позитивний рак може трансформуватися в HER2 негативний (Sorlie et al., 2001; Rakha et al., 2009; Badve et al., 2011; Lehmann et al., 2011).

Маркер проліферації Ki-67 дозволяє визначити «прихований» проліферативний потенціал пухлини (швидкість поділу клітин пухлини) та дозволяє судити про ступінь злоякісності. Виявляє тільки клітини, які діляться. Позитивна реакція з Ki-67 має зворотні відносини з рецепторним статусом, передбачає променеву та хіміотерапію. Якщо Ki-67 присутній у понад 14% пухлинних клітин, то пухлина розглядається як високоагресивна з вищою ймовірністю відповіді на хіміотерапевтичне лікування. За низького рівня Ki-67 та наявності позитивних рецепторів до естрогенів і прогестерону пухлина більшою мірою відреагує на гормонотерапію. Він прямо корелює зі ступенем гістологічної злоякісності, розмірами пухлини, наявністю метастазів і має зворотні зв'язки з ER і PR. Проліферативний індекс служить незалежним прогностичним показником виникнення рецидиву, загальної та безрецидивної виживаності (Nishimura, 2010; Polyak, 2011; Prat et al., 2011, 2015).

Дослідники сперечаються про рівень Ki-67. У багатьох країнах порогове значення – 20%. Тобто понад 20% – це агресиніші пухлини з високою ймовірністю метастазування, менше 20% – менш агресивні пухлини, які рідко метастазують. Але в Україні нині залишається показник 14%. Інколи важливий для подальшого лікування поділ на слабку проліферативну активність (до 14%), помірну (15–30%) та високу (понад 30%).

Завдяки цим онкомаркерам можна поділити пухлини МЗ на молекулярні підтипи, які відрізняються між собою за прогнозом розвитку та відповіддю на медикаментозну терапію (Perou et al., 2000; Sorlie et al., 2003; Wirapati et al., 2008; Parker et al., 2009).

Матеріал і методи досліджень

Дослідження виконане у два етапи. На першому етапі виконано 246 гістологічних і 25 імуногістохімічних досліджень на базі КЗ «ДО ПАБ», відділення онкопатології. Критеріями відбору матеріалу були інфільтративні форми РМЗ (протоковий, дольковий і комбінований), яким у подальшому проводили імуногістохімічне дослідження на визначення онкомаркерів (ER, PR, HER2/neu та Ki-67). Його проводили ручним методом.

Для створення таблиці диференційних морфологічних критеріїв відібрано три нозології: протоковий, дольковий і комбінований РМЗ. У кожній групі визначено випадки метастазування та слизоутворення. Після визначення онкомаркерів РМЗ поділено на молекулярні підтипи.

Пухлини класифікували за різними ступенями диференціювання згідно з рекомендаціями C. W. Elston та I. O. Ellis, які враховують ступінь ядерного поліморфізму та кількість мітозів, що дало змогу поділити на три групи: G_1 – високодиференційовані пухлини (низького ступеня злоякісності), G_2 – помірнодиференційовані пухлини (помірного ступеня злоякісності), G_3 – низькодиференційовані пухлини (високого ступеня злоякісності).

Таблиця 1
Імуногістохімічний фенотип молекулярних підтипів РМЗ

Молекулярний підтип	Імуногістохімічний портрет			Частота виявлення у м. Дніпро, %
	ER	PR	HER2/neu	
Luminal A	+	+	–	68,0
Luminal B	+	+	+	5,2
HER2+	–	–	+	10,4
Triple negative	–	–	–	16,3

До люмінальних відносять пухлини, рецептори яких експресують до ER та PR, і залежно від експресії HER2/neu їх класифікують на A (не експресують HER2/neu) і B (експресують Her2/neu).

Для люмінального A (luminal A) (ІНС маркеры: ER/PR+, HER2–, KRT8/18+) характерні пізніший вік на момент діагнозу, високий ступінь диференціювання, частіше низький, рідше помірний і дуже рідко високий проліферативний індекс. У таких пацієнток значно знижений ризик виникнення рецидивів і збільшена загальна виживаність. Відмічають високу ефективність гормональної терапії (тамоксифен та інгібітори ароматази) та неоад'ювантної хіміотерапії (доксирубіцин, фторурацил, циклофосфамід).

Для люмінального B (luminal B) (ІНС маркери: ER/PR+; HER+; Ki-67 > 14%) характерні ранній вік, низьке диференціювання, великий розмір пухлини та залучення лімфовузлів. Пухлини цього типу мають значно гірший прогноз і більшу схильність до рецидивів. Вони часто не чутливі до тамоксифену та інгібіторів ароматази, але чутливі до трастузумабу. У цьому типі виділяють luminal B позитивний (ER+ або PR+, HER2/neu+, Ki-67 будь-яке значення понад 14%) і luminal B негативний (ER+ або PR+, HER2/neu–, Ki-67 високе значення). Встановлено, що люмінальні типи пов'язані з менш агресивним перебігом і хорошим прогнозом порівняно з HER2+ і ТН РМЗ.

HER2+ (ІНС маркери: ER–/PR–; HER2+; Ki-67 понад 14%) називають пухлини з гіперекспресією HER2/neu та відсутністю ER та PR. Агресивні пухлини з високим проліферативним індексом, характерне низьке диференціювання, великий розмір пухлини, залучення лімфовузлів. Ефективне ад'ювантне призначення трастузумабу, не чутливі до гормонотерапії. Висока ймовірність негативного (летального) наслідку захворювання.

Базальтоподібний або тричі-негативний (basal-like, triple-negative) (ІНС маркери: ER–/PR–; HER2–; CK5/6+, EFGR (HER1)+, віментин+; c-kit+). Характерні ранній вік діагнозу, протоковий або метапластичний гістологічний тип, низьке диференціювання, високий проліферативний індекс, великий розмір пухлини, залучення лімфовузлів, ядерний плейоморфізм, некрози, стромальна лімфатична відповідь. Базальні пух-

лини відрізняються високою агресивністю, великою ймовірністю розвитку місцевого поширення та метастатичних форм. У пацієнток із базальним РМЗ дуже погані перспективи одужання незалежно від ураження лімфовузлів. Виживання в цій групі нижче, ніж для будь-якого іншого молекулярного підтипу, включаючи HER2 позитивний. Незважаючи на гнітючий прогноз, відсутність реакції на гормонотерапію та трастузумаб, «тричі-негативні» пухлини чутливі до стандартних хіміотерапевтичних схем, включаючи антрациклін, і тих, які містять таксан. Дисфункція репаративних систем робить ракові клітини уразливими для таких агентів як препарати платини, інгібітори топоізомерази I і поліADP-рибополімераз (PARP).

Дослідження 135 гістологічних препаратів виявило інфільтративні форми РМЗ. Згідно з результатами достовірно частіше зустрічається протоковий рак – 81% ($P < 0,05$). Серед протокового раку превалює рак недиференційованого та помірнодиференційованого ступеня, тоді як за долькового більша частина пацієнток (80%) має помірнодиференційований рак ($P < 0,05$).

Виявлено зворотний кореляційний зв'язок між ступенем диференціювання та відсотком зустрічальності метастазів як за протокового, так і за долькового РМЗ.

Дольковий рак агресивніший: навіть за помірнодиференційованого ступеня у 31,2% жінок виявленні метастази, а за недиференційованого – в усіх випадках (100,0%).

Комбінований РМЗ зустрічається рідко, але в усіх випадках він із метастазами (табл. 2).

Таблиця 2

Гістологічні форми (протоковий, дольковий і комбінований) раку залежно від гістологічного диференціювання

Ступені диференціювання	Протоковий, 110 жінок – 81,0%				Дольковий, 20 жінок – 14,8%			Комбінований, 5 жінок – 3,7%
	високо	помірно	слабко	недиферен-ційований	високо	помірно	недиферен-ційований	
Кількість жінок	2	45	11	52	1	16	3	5
Кількість жінок, %	1,8	40,9	10,0	47,2	5,0	80,0	15,0	100,0
Метастазування, %	0,0	4,4	18,2	26,9	0,0	31,2	100,0	100,0
Слизоутворення, %	0,0	2,2	0,0	7,7	0,0	0,0	0,0	0,0

Високодиференційований РМЗ майже не зустрічається або виявляється випадково, оскільки немає перших ознак, а більшість людей не вважають за потрібне самостійно проходити профілактичні обстеження.

Результати та їх обговорення

Під час дослідження інфільтративних форм РМЗ у м. Дніпро виявилось, що основний пік захворювань припадає на вік 51–60 років. Кількість хворих віком 41–50 років майже зрівнялась із групою віком 71–80, що говорить про збільшення частоти захворювання молодших жінок (рис. 1).

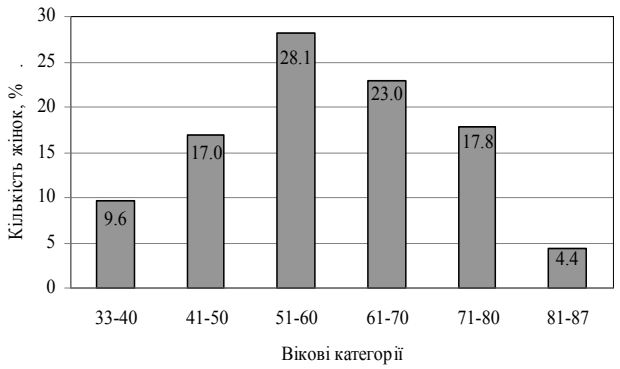


Рис. 1. Частота захворювань на РМЗ залежно від віку м. Дніпро

Після визначення онкомаркерів і поділу на молекулярні підтипи проведено ранжування, згідно з яким найчастіше виявлявся підтип Luminal A (гормонпозитивний, майже не метастазує, з хорошим прогнозом), далі Triple-negative (висока агресивність і здатність до метастазування, відсутність реакції на гормоно- та хіміотерапію, найгірший прогноз), HER2+ (висока метастатична здатність пухлини), та Luminal B (гормонпозитивна пухлина, яка часто метастазує, але добре лікується). Тобто у м. Дніпро найчастіше з інфільтративних форм РМЗ виявляється молекулярний підтип Luminal A, який має найліпший прогноз (рис. 2).

У жінок до 60 років переважають менш агресивні підтипи, які добре піддаються лікуванню, тоді як у старшому віці значно збільшується агресивність, що говорить про поганий прогноз розвитку захворювання та гіршу ефективність лікування.

Визначено маркер проліферації Кі-67 за різних молекулярних підтипів. Він дозволяє визначити «прихований» проліферативний потенціал пухлини (швидкість поділу клітин пухлини) та дозволяє судити про ступінь злоякісності, вірогідність метастазування. Він прямо корелює зі ступенем гістологічної злоякісності, розмірами пухлини та має зворотне взаємовідношення з ER і PR. Проліферативний індекс служить незалежним прогностичним показником виникнення рецидиву.

Якщо Кі-67 виявлено більше ніж у 14% пухлинних клітин, такий показник вважається агресивним і більш імовірно позитивним за хіміотерапії. За значень < 14% і позитивних ER та PR, пухлина більшою мірою відреагує на гормонотерапію (табл. 3).

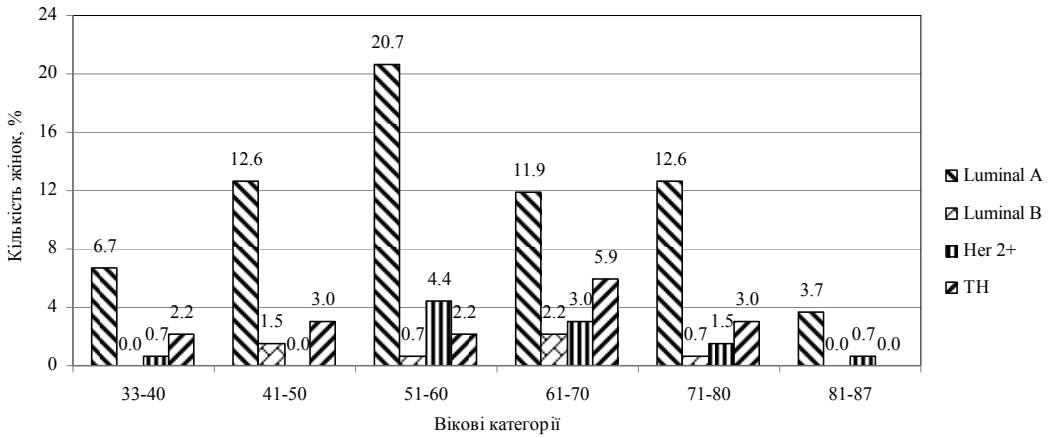


Рис. 2. Частота виявлення молекулярних підтипів залежно від віку жінок

Таблиця 3
Показник Кі-67 залежно від морфологічних типів

Морфологічні підтипи	Кількість жінок, %	Кількість жінок, абс.	Кі-67, %	Максимальне значення, %
		50	<14	–
Luminal A: ER+, PR+, HER2–	68,0	27	14–30	–
		15	>30	Max = 65
Luminal B: ER+, PR+ або –, HER2+	5,2	7	>14	Max = 48
HER2+: ER–, PR–, HER2+	10,4	14	>14	Max = 74
Triple negative: ER–, PR–, HER2–	6,3	22	>14	Max = 90

Таблиця 4
Тактика лікування залежно від молекулярного підтипу

Молекулярний підтип	Тактика лікування
Luminal A: ER+, PR+, HER2–	Ефективність гормональної терапії (тамоксифен та інгібітори ароматази) та неоад'ювантної хіміотерапії
Luminal B: ER+, PR+ або –, HER2+	Не чутливі до тамоксифену та інгібіторів ароматази, але чутливі до трастузумабу
HER2+: ER–, PR–, HER2+	Не чутливі до гормонотерапії, але чутливі до подальшої хіміотерапії (ад'ювантне призначення трастузумабу); герцептин ефективний тільки при HER2+ РМЗ
Triple negative: ER–, PR–, HER2–	Відсутність реакції на гормонотерапію та трастузумаб, але чутливі до стандартних хіміотерапевтичних схем, включаючи антрациклін, і тих, які містять таксан

Підтип Luminal A у більшості випадків неагресивний, що говорить про найліпший прогноз. Luminal B хоча і володіє невеликою агресивністю, що свідчить про більшу частоту метастазування, але завдяки ER+ або PR+ добре піддається гормонотерапії, що має позитивне значення у прогнозі. HER2+ та Triple negative відзначаються найвищою агресивністю (табл. 4).

Як додатковий метод для визначення молекулярного підтипу використовують FISH-діагностику.

Висновки

Серед інфільтруючих форм РМЗ більша частина – протоковий рак. Дольковий рак володіє більшою агресивністю, особливо за помірного диференціювання. Основна частина жінок м. Дніпро з інфільтративною формою мають вік 51–60 років. Відзначається збільшення кількості РМЗ серед молодих жінок. Після визначення онкомаркерів і поділу на молекулярні підтипи проведено ранжування інфільтративних форм РМЗ серед жінок м. Дніпро, згідно з яким найчастіше виявлявся підтип Luminal A, який має найліпший прогноз. Але відзначається досить велика кількість ТН, що говорить про високу агресивність пухлини, особливо в молодому віці. Підтверджено, що маркер Кі-67 прямо корелює зі ступенем гістологгічної злоякісності, має зворотне взаємовідношення з ER і PR та є додатковим показником для визначення молекулярних підтипів.

References

Badve, S., Dabbs, D. J., Schnitt, S. J., Baehner, F. L., Decker, T., Eusebi, V., Fox, S. B., Ichihara, S., Jacquemier, J., Lakhani, S. R., Palacios, J., Rakha, E. A., Richardson, A. L., Schmitt, F. C., Tan, P. H., Tse, G. M., Weigelt, B., Ellis, I. O., & Reis-Filho, J. S. (2011). Basal-like and triplenegative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists. Modern Pathology, 24, 158–167.

Bardou, V. J., Arpino, G., Elledge, R. M., Osborne, C. K., & Clark, G. M. (2003). Progesterone receptor status significantly improves outcome prediction over estrogen receptor status alone for adjuvant endocrine therapy in two large breast cancer databases. The Journal of Clinical Oncology, 2, 1974–1979.

Bertos, N. R., & Park, M. (2011). Breast cancer – one term, many entities. The Journal of Clinical Investigation, 121, 3788–3796.

Brenton, J. D., Carey, L. A., Ahmed, A. A., & Caldas, C. (2005). Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: Ready for clinical application. Clinical Oncology, 23, 7350–7359.

Castellano, I., Allia, E., Accortanzo, V., Vandone, A. M., Chiusa, L., Arisio, R., Durando, A., Donadio, M., Bussolati, G., Coates, A. S., Viale, G., & Sapino, A. (2010). Androgen receptor expression is a significant prognostic factor in estrogen receptor positive breast cancers. Breast Cancer Research and Treatment, 124(3), 607–616.

Cheang, M. C., Chia, S. K., Voduc, D., Gao, D., Leung, S., Snider, J., Watson, M., Davies, S., Bernard, P. S., Parker, J. S., Perou, C. M., Ellis, M. J., & Nielsen, T. O. (2009). Ki-67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. The Journal of the National Cancer Institute, 101(10), 737–750.

Clarke, R., Tyson, J. J., & Dixon, J. M. (2015). Endocrine resistance in breast cancer – an overview and update. Molecular and Cellular Endocrinology, 418, 221–234.

Fisher, B., Costantino, J., Redmond, C., Poisson, R., Bowman, D., Couture, J., Dimitrov, N. V., Wolmark, N., Wickerham, D. L., & Fisher, E. R. (1989). A randomized clinical trial evaluating tamoxifen in the treatment of patients with node-negative breast cancer who have estrogen-receptor-positive tumors. The New England Journal of Medicine, 320, 480–784.

Geyer, C. E., Forster, J., Lindquist, D., Chan, S., Romieu, C. G., Pienkowski, T., Jagiello-Gruszfeld, A., Crown, J., Chan, A., Kaufman, B., Skarlos, D., Campone, M., Davidson, N., Berger, M., Oliva, C., Rubin, S. D., Stein, S., & Cameron, D. (2006). Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer. The New England Journal of Medicine, 355, 2735–2742.

Gucalp, A., Isakoff, S. J., Tolaney, S. M., & Traina, T. A. (2013). Phase II trial of bicalutamide in patients with androgen receptor-positive, estrogen receptor-negative metastatic breast cancer. Clinical Cancer Research, 19, 5506–5511.

Haibe-Kains, B., Desmedt, C., Loi, S., Culhane, A. C., Bontempi, G., Quackenbush, J., & Sotiriou, C. (2012). A three-gene model to robustly identify breast cancer molecular subtypes. The Journal of the National Cancer Institute, 104, 312–324.

Holm, K., Hegardt, C., Staaf, J., Vallon-Christersson, J., Jönsson, G., Olsson, H., Borg, A.,& Ringnér, M. (2010). Molecular subtypes of breast cancer are associated with characteristic DNA methylation patterns. Breast Cancer Research, 12(3), 36.

Hu, Z., Fan, C., Oh, D. S., Marron, J. S., He, X., Qaqish, B. F., Livasy, C., Carey, L. A., Reynolds, E., Dressler, L., Nobel, A., Parker, J., Ewend, M. G., Sawyer, L.R., Wu, J., Liu, Y., Nanda, R., Tretiakova, M., Orrico, R. A., Dreher, D., Palazzo, J. P., Perreard, L., Nelson, E., Mone, M., Hansen, H., Mullins, M., Quackenbush, J. F., Ellis, M. J., Olopade, O. I., Bernard, P. S., & Perou, C. M. (2006). The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. BMC Genomics, 7, 96.

Isola, J. J. (1993). Immunohistochemical demonstration of androgen receptor in breast cancer and its relationship to other prognostic factors. The Journal of Pathology, 170(1), 32–35.

Jordan, V. C. (2014). Tamoxifen as the first targeted long-term adjuvant therapy for breast cancer. Endocrine-Related Cancer, 21, 236–245.

Kim, H. S., Park, I., Cho, H. J., Gwak, G., Yang, K., Bae, B. N., Kim, K. W., Han, S., Kim, H. J., & Kim, Y. D. (2012). Analysis of the potent prognostic factors in luminal-type breast cancer. Journal Breast Cancer, 15, 402–405.

Lehmann, B. D., Bauer, J. A., Chen, X., Sanders, M. E., Chakravarthy, A. B., Shyr, Y., & Pietenpol, J. A. (2011). Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. The Journal of Clinical Investigation, 121, 2751–2766.

Loi, S., Piccart, M., & Sotiriou, C. (2007). The use of gene-expression profiling to better understand the clinical heterogeneity of estrogen receptor positive breast cancers and tamoxifen response. Critical Reviews in Oncology/Hematology, 61, 188–193.

Loi, S., Sotiriou, C., Haibe-Kains, B., Lallemand, F., Conus, N. M., Piccart, M. J., Speed, T. P., & Mc Arthur, G. A. (2009). Gene expression

profiling identifies activated growth factor signaling in poor prognosis (Luminal-B) estrogen receptor positive breast cancer. BMC Medical Genomics, 2, 37.

Lonning, P. E. (2012). Poor-prognosis estrogen receptor–positive disease: Present and future clinical solutions. Therapeutic Advances in Medical Oncology, 4, 128–136.

Massarweh, S., Osborne, C. K., Creighton, C. J., Qin, L., Tsimelzon, A., Huang, S., Weiss, H., Rimawi, M., & Schif, R. (2008). Tamoxifen resistance in breast tumors is driven by growth factor receptor signaling with repression of classic estrogen receptor genomic function. Cancer Research, 68(3), 827–832.

Melchor, L., & Benítez, J. (2008). An integrative hypothesis about the origin and development of sporadic and familial breast cancer subtypes. Carcinogenesis, 29(8), 1476–1481.

Nadji, M., Gomez-Fernandez, C., Ganjei-Azar, P., & Morales, A. R. (2005). Immunohistochemistry of estrogen and progesterone receptors reconsidered: experience with 5,993 breast cancers. American Journal of Clinical Pathology, 123, 22–26.

Nishimura, R., Osako, T., Okumura, Y., Hayashi, M., Toyozumi, Y., & Arima, N. (2010). Ki-67 as a prognostic marker according to breast cancer subtype and a predictor of recurrence time in primary breast cancer. Expernal and Therapeutic Medicine, 1(5), 748–755.

Olopade, O. I., Grushko, T. A., Nanda, R., & Huo, D. (2008). Advances in breast cancer: Pathways to personalized medicine. Clinical Cancer Research, 14, 7987–7998.

Parker, J. S., Mullins, M., Cheang, M. U., Leung, S., Voduc, D., Vickery, T., Davies, S., Fauron, C., He, X., Hu, Z., Quackenbush, J. F., Stijleman, I. J., Palazzo, J., Marron, J. S., Nobel, A. N., Mardis, E., Nielsen, T. O., Ellis, M. J., Perou, C. M., & Bernard, P. S. (2009). Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. Journal of Clinical Oncology, 27, 1161–1166.

Perou, C. M., Sorlie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., Pollack, J. R., Ross, D. T., Johnsen, H., Akslen, L. A., Fluge, O., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S. X., Lonning, P. E., Borresen-Dale, A. L., Brown, P. O., & Botstein, D. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. Nature, 406, 748–751.

Polyak, K. (2011). Heterogeneity in breast cancer. The Journal of Clinical Investigation, 121, 3787–3788.

Prat, A., & Perou, C. M. (2011). Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. Molecular Oncology, 5, 6–21.

Prat, A., Pineda, E., Adamo, B., Galván, P., Fernández, A., Gaba, L., Díez, M., Viladot, M., Arance, A., & Muñoz, M. (2015). Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. The Breast, 24, 25–34.

Rakha, E. A., Elsheikh, S. E., Aleskandarany, M. A., Habashi, H. O., Green, A. R., Powe, D. G., El-Sayed, M. E., Benhasouna, A., Brunet, J. S., Akslen, L. A., Evans, A. J., Blamey, R., Reis-Filho, J. S., Foulkes, W. D., & Ellis, I. O. (2009). Triple-negative breast cancer: Distinguishing between basal and nonbasal subtypes. Clinical Cancer Research, 15, 2301–2309.

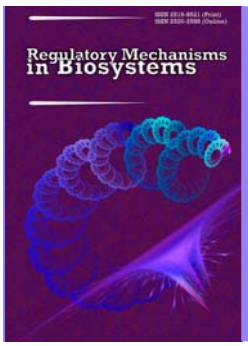
Schnitt, S. J. (2010). Classification and prognosis of invasive breast cancer: From morphology to molecular taxonomy. Modern Pathology, 23, 61–64.

Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2016). Cancer statistics, 2016. CA: A Cancer Journal for Clinicans, 66(1), 7–30.

Sorlie, T., Perou, C. M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M. B., Van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Thorsen, T., Quist, H., Matese, J. C., Brown, P. O., Botstein. D., Lonning, P. E., & Borresen-Dale, A. L. (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA, 98, 10868–10873.

Sorlie, T., Tibshirani, R., Parker, J., Hastie, T., Marron, J. S., Nobel, A., Deng, S., Johnsen, H., Pesich, R., Geisler, S., Demeter, J., Perou, C. M., Lonning, P., Brown, P. O., Borresen-Dale, A., & Botstein, D. (2003). Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA, 100, 8419–8422.

Wirapati, P., Sotiriou, C., Kunkel, S., Farmer, P., Pradervand, S., Haibe-Kains, B., Desmedt, C., Ignatiadis, M., Sengstag, T., Schütz, F., Goldstein, D. R., Piccart, M., & Delorenzi, M. (2008). Meta-analysis of gene expression profiles in breast cancer: Toward a unified understanding of breast cancer subtyping and prognosis signatures. Breast Cancer Research, 10, 65.



Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(2), 210–216
doi: 10.15421/021733

Recent epidemiological trends in HCV-infection in Ukraine

T. N. Shevchenko, M. B. Shcherbinina, S. A. Latsinska, T. V. Diklenko

Oles Honchar Dnipro National University, Dnipro, Ukraine

Article info

Received 29.03.2017
Received in revised form 20.04.2017
Accepted 27.04.2017

Oles Honchar Dnipro National University, Gagarin Ave., 72, Dnipro, 49010, Ukraine.
Tel. +38-056-372-58-76.
E-mail: klinlab@ua.fm

Shevchenko, T. N., Shcherbinina, M. B., Latsinska, S. A., & Diklenko, T. V. (2017). Recent epidemiological trends in HCV-infection in Ukraine. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(2), 210–216. doi:10.15421/021733

Today liver damage caused by Hepatitis C Virus (HCV) is widespread and included in the list of diseases of a social character. The aim of this research is to identify the peculiarities and summarize the epidemiological characteristics of HCV-infection in Ukraine, based on a retrospective analysis of detecting HCV based on antibodies, RNA and its genotyping, taking into account the sex and age of infected people in regions of Ukraine and particularly in Dnipro and Dnipropetrovs'k region. The research materials were provided by sampling the results of screening tests and qualitative detection of RNA-HCV genotyping (1a, 1b, 2 and 3). The survey involved 10,394 people from different regions of Ukraine (2014–2016). HCV-infection was detected in 3,436 of them, accounting on average for 32.5% of those surveyed. We analysed further 1,113 cases with positive RNA-HCV genotyping. Detection of infection by age periods was: 0–9 years old – 0.8%, 10–19 – 0.5%, 20–29 – 11%, 30–39 – 32%, 40–49 – 30%, 50–59 – 19.5%, 60–69 – 5.0% and 70–79 – 1.0%. 603 (54.2%) infected people belonged to genotype 1; 107 (9.6%) belonged to genotype 2; 403 (36.2%) belonged to genotype 3. Women were more frequently infected by genotype 1b, with increased percentage of 1ab; men often had genotype 3. 1,513 inhabitants of Dnipro and Dnipropetrovs'k region were sent to be tested for anti-HCV in 2011–2015. The percentage of positive anti-HCV showed a sharp increase from 28% to 64% over the observation period. Detection of HCV by age periods was: 0–9 years old – 0.9%, 10–19 – 1.5%, 20–29 – 9.5%, 30–39 – 27.6%, 40–49 – 27.8%, 50–59 – 23.2%, 60–69 – 8.8% and 70–79 – 0.7%. 1 genotype was identified in 262 (56.8%) infected patients among 461 HCV-infected, 38 (8.2%) had genotype 2, 61 (35%) had genotype 3. 2.6% were diagnosed 1ab. In both populations that were tested, the frequency of detection of HCV was similar among men and women. Gender differences in the spread of genotype 2 haven't been identified. The disease HCV remains one of the urgent problems of public health in Ukraine.

Keywords: genotype and subtype of HCV; age period; epidemiological indicators

Сучасні епідеміологічні тенденції розвитку HCV-інфекції в Україні

Т. М. Шевченко, М. Б. Щербиніна, С. А. Лацінська, Т. В. Дікленко

Дніпровський національний університет імені Олеся Гончара, Дніпро, Україна

Нині ураження печінки, викликані Hepatitis C Virus (HCV), дуже поширені та входять до переліку захворювань із соціальним статусом. Дослідження проведене з метою виявити особливості та узагальнити епідемічну характеристику HCV-інфекції в Україні, спираючись на ретроспективний аналіз виявлення HCV на підставі антитіл, РНК та її генотипування з урахуванням розподілу за статтю та віком інфікованих людей загалом у регіонах України та окремо у м. Дніпро та Дніпропетровській області. Матеріал дослідження – вибірки результатів скринінг-тестів та якісного визначення РНК-HCV із генотипуванням (1a, 1b, 2і 3). За результатами обстеження 10 394 особи із різних регіонів України (2014–2016 рр.) та 1 513 осіб із м. Дніпро та Дніпропетровської області (2011–2015 рр.) встановлено високі показники анти-HCV. Серед випадків позитивних РНК-HCV відповідно зазначеним популяціям (1 113 та 461 особи) частоту виявлення HCV порівняно серед чоловіків та жінок: найвищі показники зареєстровано для вікових груп 30–39 і 40–49 років. Підтверджено превалювання генотипів 1 та 3; у чоловіків – частіше 3, у жінок – 1b та 1ab. Гендерних відмінностей за поширенням генотипу 2 не виявлено. Захворювання на HCV продовжує залишатись однією з актуальних проблем сфери громадської охорони здоров'я в Україні.

Ключові слова: генотип гепатиту С; підтипи вірусу гепатиту С; віковий період; епідеміологічні показники

Вступ

Нині ураження печінки, викликані вірусом гепатиту С (англ. Hepatitis C Virus – HCV), входять до переліку захворювань із соціальним статусом і залишаються надзвичайно важливою проблемою охорони здоров'я в усьому світі. Така думка сформована за впливу фактів повсюдного поширення HCV і визнання його причиною найбільшої групи захворювань печінки. У значної частини HCV-інфікованих осіб (понад 85%) хвороба набуває хронічної форми з прогресуванням до цирозу та раку печінки. Останні – фінальні етапи природного перебігу хронічної HCV-інфекції; вони розвиваються протягом 15–25 років

після гострого процесу (Lee et al., 2014; Lingala and Ghany, 2015). Ці ускладнення, за даними Всесвітньої організації охорони здоров'я, щорічно позбавляють життя до 700 тис. людей. Вважають, що цей показник відбиває високий рівень захворюваності на HCV у середині минулого століття, який різко підвищився починаючи з 1940-х років через поширення парентеральних процедур та ін'єкційних наркотиків (Magiorkinis et al., 2009). Оскільки ускладнення HCV формуються тривалий час, зараз ідуть із життя особи, інфіковані приблизно три десятиліття тому. За відсутності розширення доступу до лікарських засобів високий рівень смертності від HCV може тривати ще декілька десятиліть.

HCV належить до родини Flaviviridae, невеликий за розмірами вірус, покритий ліпідною оболонкою, що містить одноланцюгову РНК. Розуміння масштабу проблеми HCV виникло у 1989 році з позначенням цього вірусу інфекційним агентом і відокремленням відповідної нової нозологічної форми гепатиту (Choo et al., 1989). У 1990 році створено діагностичні системи для визначення антитіл до HCV (анті-HCV). Це забезпечило початок епідеміологічних робіт, спрямованих на встановлення серопозитивності донорів крові та різних соціальних груп населення. Нині лабораторна діагностика та моніторинг інфекції засновані на виконанні двох категорій тестів: серологічних досліджень із визначення специфічних антитіл до вірусних білків HCV і прямих методів ідентифікації, що характеризують компоненти віріона – специфічну РНК-HCV та ядерний антиген. Саме ці лабораторні тести відіграють провідну роль у питаннях діагностики інфекційного процесу щодо HCV.

За даними офіційної статистики, на 2013 рік у світі налічувалося 185 млн осіб з історією хвороби, асоційованою з HCV-інфекцією (за наявності анти-HCV), серед яких близько 130–150 млн вважали хронічно інфікованими (РНК-HCV позитивні) (Mohd Hanafiah et al., 2013). Пізніші дослідження глобальної поширеності HCV доводять, що людей, які живуть із HCV, може бути менше. Є потрактування щодо епідеміологічної ситуації у світі з констатацією фактів про 110 млн осіб із позитивним результатом дослідження на анти-HCV та 80 млн хронічно інфікованих (РНК-HCV позитивні) (Gower et al., 2014). Але ці показники досить умовні. Загальне уявлення про відсоток серопозитивності найчастіше ґрунтується на результатах обстежень населення двох–трьох регіонів будь-якої країни, тоді як показник інфікованих навіть на територіях, розташованих поруч, може суттєво різнитися. Разом із цим, навіть такі орієнтовні дані викликають занепокоєння. Особливо це стосується показників Східної Європи (Mühlberger et al., 2009), на території якої зареєстровано як найбільший в Європі відсоток населення з наявністю анти-HCV (6,8%), так і хронічно інфікованих (РНК-HCV позитивні – 4,7%). Щодо України, за оцінкою епідеміологів, захворюваність вірусними гепатитами в 2016 році склала 7–9% від загальної кількості населення країни. Загалом, зважаючи на специфіку захворювання, реальна кількість хворих в Україні може бути значно більшою.

Проте нині HCV можна побороти. Такі оптимістичні прогнози стали реальними завдяки впровадженню у клінічну практику противірусних препаратів прямої дії. Застосування цієї групи препаратів цілком змінило погляди на HCV. Нова терапія передбачає пероральний прийом ліків, незначну тривалість лікування, показник одужання – понад 90%. При цьому реєструють незначну кількість побічних ефектів порівняно з попередніми препаратами, що містять інтерферон (WHO, Guidelines, April 2016).

Виходячи з цього, американські вчені з Університету Брауна на прикладі штату Род-Айленд шляхом математичного моделювання спрогнозували, що сучасна медицина може вирішити проблему HCV до 2030 року. За розрахунками, до вказаного часу кількість смертей від HCV зменшиться на 70%, і загалом HCV зникне на 90% (Soipe et al., 2016). Оскільки кількість осіб, які проходитимуть курс лікування щорічно, зростатиме, а число нових випадків цього захворювання буде знижуватися, можна говорити про остаточне зникнення HCV у світі. Ліквідація HCV як проблеми охорони здоров'я – пріоритетне завдання Всесвітньої асамблеї охорони здоров'я. Тому у травні 2016 року прийнято першу «Глобальну стратегію сектора охорони здоров'я з вірусного гепатиту на 2016–2021 рр.», згідно з якою планується скоротити виникнення нових випадків інфекцій на 90% і зменшити кількість смертей через це захворювання на 65% до 2030 року.

HCV – антропонозна інфекція з парентеральним (штучним та природним) механізмом передачі. Природного резервуару HCV не виявлено. Для HCV притаманна висока генетична мінливість, зумовлена частою заміною нуклеотидів у його геномі. Наслідок цього – утворення значної кількості генотипів, підтипів та їх мутантів (квазіваріантів). Виділяють шість генотипів вірусу (1–6), що, у свою чергу, поділяються на понад 80 підтипів. Інфікування одним генотипом не дає імунітету проти інфікування іншим, тому можливе одночасне інфікування двома або більшою кількістю штамів. У більшості цих випадків один із штамів домінує над іншими.

Територіальне розповсюдження генотипів HCV, вікові та статеві особливості HCV-інфікованих дозволяють правильно оцінити та спрогнозувати епідеміологічну ситуацію. Нині активно вивчають географічний розподіл, клініко-епідеміологічні особливості патологічного процесу та відповіді на етіотропне лікування гепатиту, викликаного різними генотипами HCV (WHO, Guidelines, April 2016).

Кожний із генотипів характерний для певних країн (територій). Генотипи 1, 2 і 3 найбільше поширені по всьому світу, генотипи 4 і 5 зустрічаються переважно в Африці, генотип 6 типовий для азіатського регіону. В Україні переважають генотипи 1b і 3a. Пацієнти, інфіковані під час переливання крові, зазвичай мають підтип 1b, а підтипи 1a і 1b частіше пов'язані з інфікуванням HCV статевим шляхом. Підтип 3a поширюється переважно артифіціальними шляхами (під час уведення наркотичних препаратів, нанесення татуювань). Генотип 2, як частково і підтип 1a, зазвичай реєструють у хворих із невиявленим фактором інфікування. Врахування генотипу разом із віковими та статевими особливостями дозволяє знаходити оптимальні шляхи для здійснення профілактичних заходів. Зміни співвідношень генотипів на окремих територіях свідчать про шлях міграції населення або вказують на інше джерело інфекції. Як приклад можна розглянути унікальну епідеміологічну ситуацію, що склалася в Єгипті. У цій країні реєструють найвищі у світі показники серопозитивності – до 20% загальної популяції. У людей віком понад 45 років частота виявлення анти-HCV може сягати 40–45%. Поширення захворювання стало наслідком проведення масових ін'єкцій нестерильними інструментами в межах отримання антишистосомної терапії, що застосовувалася в 1920–1980-ті роки. Частота проведення парентеральних маніпуляцій у тому або іншому регіоні Єгипту тісно корелює зі ступенем серопозитивності анти-HCV у цих областях (Miller et al., 2015).

Різні генотипи HCV мають деякі особливості клінічного перебігу за швидкістю формування печінкових (цироз і рак печінки) та позапечінкових ускладнень (Fiorino et al., 2015). У разі інфікування генотипом 3 частіше спостерігається розвиток стеатозу печінки (Lonardo et al., 2014). Підтип вірусу 1b характеризується як несприятливий щодо перебігу захворювання (Lee et al., 2014). У 40–45% хворих на HCV виявляють позапечінкові прояви, що можуть домінувати у клінічній картині хвороби, приховуючи класичні прояви HCV (Shcherbinina and Shevchenko, 2016). Відомо превалювання генотипу 2a у пацієнтів із HCV-асоційованою кріоглобулінемією (Cacoub and Comarmond, 2017) та цукровим діабетом другого типу (Guaraldi et al., 2017), генотипу 1b – у пацієнтів із HCV-асоційованою пізньою термальною порфірією та Неходжкинською В-клітинною лімфомою (Negro and Esmat, 2017). Статистичний аналіз дозволяє вважати доведеним зв'язок із хронічною HCV-інфекцією мембранопроліферативного гломерулонефриту, аутоімунного тиреоїдиту та деяких інших.

На генотипуванні HCV базується прогноз ефективності та визначення необхідної тривалості курсу антивірусного лікування. Це стосується як інтерферонотерапії, до якої низьку відповідь частіше спостерігають у випадку інфікування генотипами 1 та 4, так і безінтерферонових схем, на стратегію застосування яких також впливає генотип HCV (WHO, Guidelines, April 2016). Тому основа дій для вибору варіантів лікування – знання про ендемічні генотипи HCV і розуміння доступності цільових лікарських засобів.

Враховуючи економічну ситуацію, нині в Україні складно планувати широкі епідеміологічні дослідження. У той же час в архівах державних і комерційних лабораторій накопичено матеріал, який можна використовувати для отримання певної інформації. Це дозволить обговорювати сучасні закономірності та епідеміологічні тенденції розвитку HCV-інфекції в Україні.

Мета цієї статті – виявити особливості та узагальнити епідемічну характеристику HCV-інфекції в Україні, спираючись на ретроспективний аналіз виявлення HCV на підставі антитіл, РНК та її генотипування з урахуванням розподілу за статтю та віком інфікованих людей за регіонами України та окремо в м. Дніпро та Дніпропетровської області.

Матеріал і методи досліджень

За міжнародними нормами, результати лабораторних досліджень, відокремлені від персональних відомостей про пацієнта, можуть бути використані для цілей епідеміологічного, демографічного або іншого статистичного аналізу (National standard of Ukraine. Medical laboratories, 2015). Таку інформацію в різних регіонах України з урахуванням результатів як скринінг-тестів на HCV, так і якісного визначення РНК-HCV із генотипуванням надано Незалежною лабораторією «Інвітро»; період вибірки цих даних становив жовтень 2014 р. – червень 2016 р. включно. Окремо отримано матеріал із м. Дніпро та Дніпропетровської області із залученням показників скринінгових тестів на HCV із лабораторії КЗ Дніпропетровської обласної клінічної лікарні імені І. І. Мечникова ДОР і генотипування HCV, проведеним у лабораторії Лікувально-діагностичного центру медичної академії. Період вибірки – січень 2011 р. – грудень 2015 р. включно.

Отже, вихідні матеріали для аналізу – вибірки результатів специфічних лабораторних досліджень, що дозволяють виявити маркери, притаманні HCV-інфекції. Матеріалом для лабораторних досліджень служила плазма крові. За допомогою скринінгових тестів реєстрували сумарні антитіла до HCV (анти-HCV) методом імуноферментного аналізу. Чутливість і специфічність цих сучасних тест-систем перебуває в межах 96–98%. Підтвердження достовірності одержаних позитивних результатів проводили з використанням набору реагентів для якісного виявлення РНК-HCV і генотипування вірусу методом зворотної транскрипції та полімеразної ланцюгової реакції з детекцією методом гель-електрофорезу.

Враховуючи, що в Україні поширені три перші основні генотипи HCV, лабораторні центри зазвичай використовують діагностичні набори для визначення саме цих генотипів із підтипами 1a, 1b, 2 і 3. Такі дані наведені в цій статті.

Результати

У процесі оцінювання захворюваності на HCV серед населення різних регіонів України з жовтня 2014 по червень 2016 р. відзначено певну стабільність показників (табл. 1). За результатами обстеження з 10 394 осіб, які звернулись до Незалежної лабораторії «Інвітро» протягом указаного періоду за підозрою наявності HCV, виявлення інфекції склало в середньому 32,5% з незначним коливанням по роках. Відсоток виявлення HCV від загальної кількості проведених скринінг-тестів (анти-HCV) становив 35,2% у 2014, 32,8% – у 2015 та 29,5% – у 2016 році.

Щодо результатів по м. Дніпро та Дніпропетровській області за останні роки для скринінгу на HCV (анти-HCV) направлено 1 513 мешканців. Проаналізоване відношення потреб у цьому тесті до загальної кількості звернень щодо інших досліджень по роках (рис. 1). Кількість звернень із приводу виявлення HCV поступово збільшувалася з 14% (n = 198) у 2011 р. та 19% (n = 246) у 2012 р., досягла «плато» у 2013–2015 рр. (22%, n = 283; 22%, n = 283 та 23%, n = 289, відповідно). Зважаючи на зростання частки пацієнтів, направлених на тестування щодо HCV від загальної кількості досліджень, можна стверджувати, що потреба в діагностиці інфікування населення HCV також зростає.

Таблиця 1
Результати обстеження осіб за підозрою наявності інфікування HCV по регіонах України (2014–2016 рр.)

Рік	Загальна кількість обстежених	Кількість осіб, у яких виявлено анти-HCV	Відсоток виявлення анти-HCV
2014	3 595	1 267	35,2
2015	3 298	1 081	32,8
2016	790	233	29,5

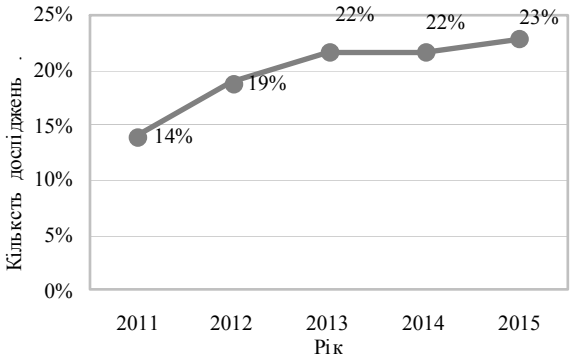


Рис. 1. Щорічна кількість скринінг-тестів на HCV (анти-HCV) відносно загальної кількості досліджень, виконаних протягом 2011–2015 рр.

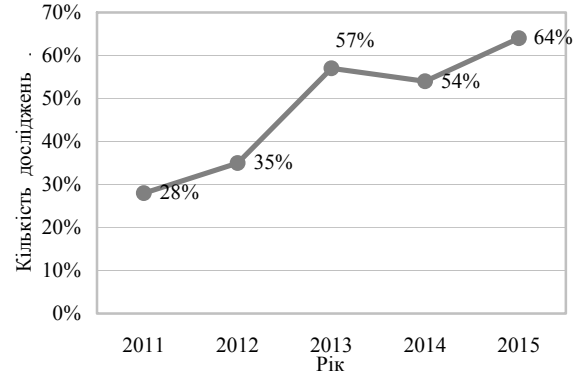


Рис. 2. Відсоток щорічних позитивних результатів відносно загальної кількості проведених скринінг-тестів на HCV (анти-HCV) серед населення м. Дніпро та Дніпропетровської області протягом 2011–2015 рр.

Щорічний відсоток позитивних відповідей із загальної кількості скринінг-тестів на HCV серед мешканців м. Дніпро та Дніпропетровської області за п'ятирічний період відрізняється порівняно з результатами по регіонах України (рис. 2). Кількість інфікованих HCV стрімко збільшується. У 2011 році виявлення HCV становило 28% від загальної кількості виконаних скринінг-тестів, а в 2015 р. – 64%.

Надалі із загальної кількості позитивних результатів (3 436 осіб), отриманих із різних регіонів України, для детальнішого аналізу відібрано 1 113 випадків. Вивчення залежності кількості інфікованих від статі доводить, що серед інфікованих

HCV переважають чоловіки, проте цей факт вельми суперечливий. За розподілом осіб із HCV (табл. 2) у середньому за весь період досліджень кількість чоловіків більша лише на 23,9%; зі збільшенням кількості досліджень така відмінність, можливо, буде нівельована, що, наприклад, спостерігається для показників 2015 року.

Подібного висновку діходимо і під час оцінювання розподілу за статтю інфікованих осіб серед мешканців м. Дніпро та Дніпропетровської області (n = 461). Серед них зазначено 242 чоловіки (52,5%) та 219 жінок (47,5%), тобто частота виявлення HCV серед чоловіків та жінок майже однакова.

Таблиця 2

Розподіл за статтю пацієнтів, інфікованих HCV, за даними з різних регіонів України

Рік	Чоловіки	Жінки	Разом
2014	66	48	114
2015	335	305	640
2016	215	144	359
Протягом усього періоду	616	497	1 113

Важливу інформацію дозволив отримати розподіл осіб із HCV за віком (рис. 3). Загалом за регіонами України виявлення інфекції в осіб до 20 років становило – 0,8% і 0,5% для двох перших десятиліть. Кількість інфікованих швидко зростає у віковому періоді 20–29 років (до 11%), досягаючи піку в два подальші десятиліття (30–39 років та 40–49 років) – відповідно 32% і 30%. Високий відсоток інфікованих зберігається у період 50–59 років (19,5%) із подальшим зниженням у 60–69 і 70–79 років (до 5% і 1%, відповідно). Подібні результати отримано і серед мешканців м. Дніпро та Дніпропетровської області (рис. 3). У вікових періодах 0–9 та 10–19 років HCV визначено відповідно 0,9% і 1,5% пацієнтів. У 20–29 років відзначено підйом до 9,5% із досягненням максимальних значень на відрізку 30–39 і 40–49 років (відповідно 27,6% і 27,8%). У період 50–59 років спостерігається високий показник інфікованих (23,2%) і значне падіння починаючи з 60-річного періоду (8,8% і 0,7%). Отже, до епідемічного процесу залучене переважно населення України молодого віку.

За даними з регіонів України, більше ніж у половини осіб HCV належить до генотипу 1 – 603 випадки (54,2%). 107 випадків (9,6%) припадає на генотип 2 і 403 (36,2%) – на генотип 3. Загалом за період 2014–2016 рр. кількість інфікованих генотипом 1 залишилась стабільною, складаючи відповідно по роках 55,3%, 51,7% і 55,5%.

Оцінювання співвідношення підтипів усередині групи генотипу 1 відкрило зростання частини підтипу 1a (до 4,2%) та мікст-форм у вигляді поєднання підтипів 1a та 1b (0,6–8,8%). Показники генотипу 3, що перебуває на другому місці за частотністю, коливались від 32,4% у 2014 р. до 40,4% у 2015 р., дещо знизились до 35,9% у 2016 році. Що стосується показників поширеності генотипу 2, вони мають тенденцію до збільшення, але поки перебувають у межах 7,8–12,3% (рис. 4).

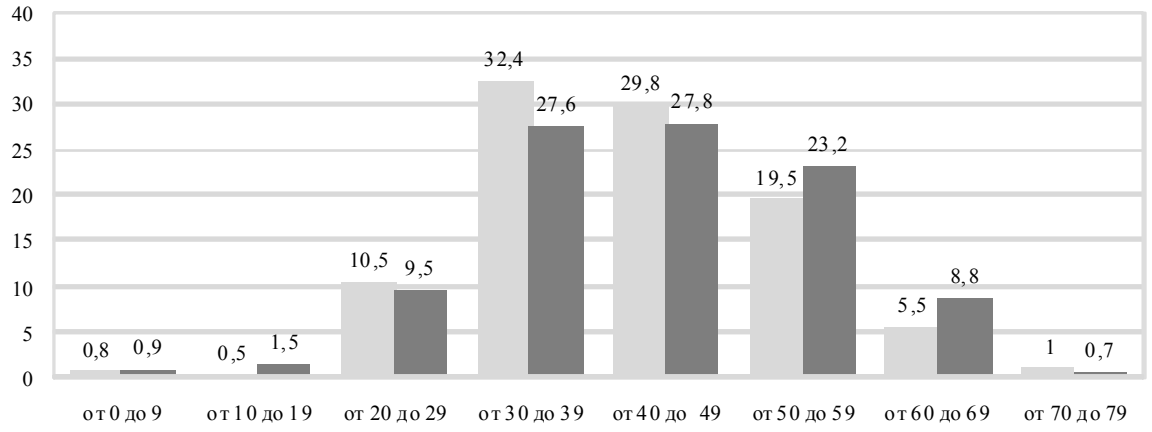


Рис. 3. Розподіл інфікованих HCV за віковими групами (%):
ліві стовпчики – дані по регіонах України (n = 1113); праві – дані для м. Дніпро та Дніпропетровської області (n = 461)

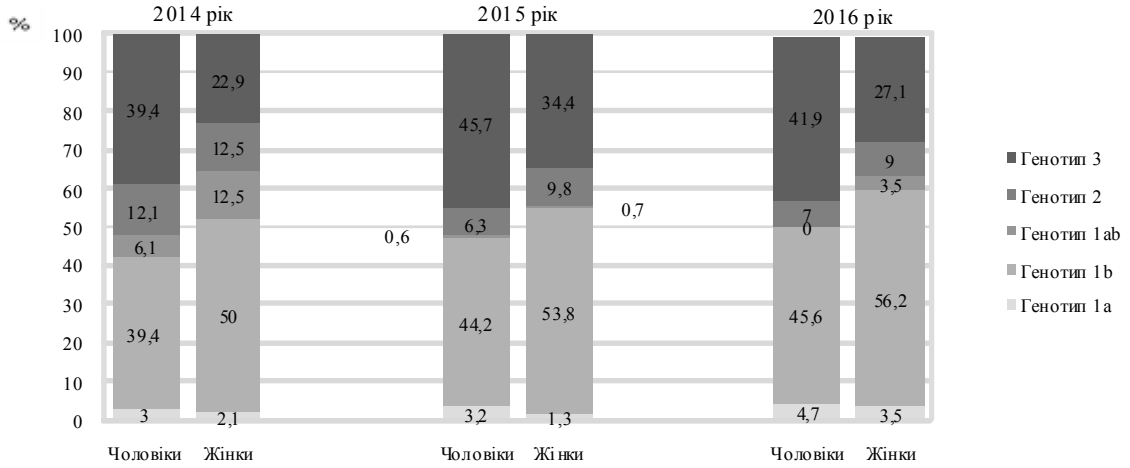


Рис. 4. Відсоткове співвідношення розподілу генотипів 1, 2 та 3 HCV серед чоловіків (n = 616) та жінок (n = 497): дані по регіонах України (n = 1 113)

Аналізом розподілу генотипів установлено певні гендерні особливості. Жінки частіше інфіковані HCV генотипу 1b, із деяким підвищенням відсотка мікст-форм 1ab; чоловіки – генотипом 3. Відмінностей за поширеністю генотипу 2 у чоловіків та жінок не виявлено. Така сама епідеміологічна ситуація спостерігається і серед мешканців м. Дніпро та Дніпропетровської області (n = 461): генотип 1 HCV виявлено у 262 осіб (56,8%), у 38 (8,2%) випадків установлено генотип 2 і в 61

(35%) – на генотип 3. У 2,6% інфікованих генотипом 1 було діагностовано мікст-форму підтипів 1a та 1b (рис. 5).

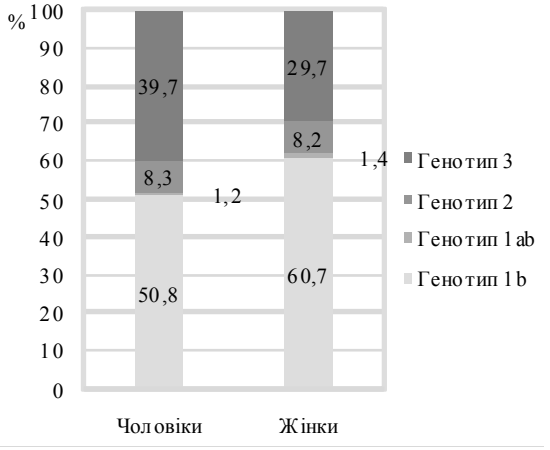


Рис. 5. Відсоткове співвідношення розподілу генотипів 1, 2 та 3 HCV серед чоловіків (n = 242) та жінок (n = 219): дані по м. Дніпро та Дніпропетровській області (n = 461)

Обговорення

Необхідно акцентувати, що своєчасна діагностика гострої HCV-інфекції дотепер суттєво утруднена, оскільки у багатьох випадках захворювання має асимптоматичний перебіг. Лабораторні дослідження для встановлення відповіді організму людини на інфікування HCV (одужання після гострого гепатиту чи хронізація хвороби) здійснюють лише у країнах із високим рівнем системи охорони здоров'я. У більшості країн, у тому числі в Україні, дослідження на наявність маркерів HCV лише реєструють випадки хронічної інфекції з невстановленими термінами та шляхами інфікування. Частоту розповсюдженості вірусу серед різних категорій населення визначають, головним чином, шляхом виявлення антитіл (анти-HCV). Надійний серологічний маркер інфекції – визначення РНК-HCV. Але через складність проведення самої реакції та її високу вартість вона поки що не може бути широко застосована у практиці охорони здоров'я як скринінговий тест.

У 2013 році масштабне всеукраїнське експрес-тестування, проведене на вулицях різних міст країни всім бажаючим під егідою «Міжнародного альянсу з ВІЧ/СНІД в Україні», продемонструвало виявлення позитивних результатів у середньому в 13,0% протестованих за всіма регіонами та в 25,7% серед мешканців м. Дніпро та Дніпропетровської області. Результати за останні роки, отримані в нашому дослідженні, теж підтвердили значний відсоток осіб із наявністю анти-HCV: у середньому 32,5% по всіх регіонах країни та стрімке зростання з 28% до 64% за п'ятирічний період у м. Дніпро та Дніпропетровській області. Отримані нами результати характеризують осіб, обстежених не за власним бажанням, а направлених лікарем із підозрою на інфекційний процес. Зрозуміло, що на таке обстеження найчастіше направляють людей, які належать до категорій високого ризику інфікування, потенційних донорів і пацієнтів, скарги та результати огляду яких дають підстави підозрювати розвиток гепатиту. Проте швидкість збільшення відсотка хворих все одно викликає занепокоєння. Наше дослідження ще раз підтвердило серйозну загрозу для здоров'я населення в Україні та особливо у м. Дніпро та Дніпропетровській області через захворювання населення на HCV.

Під час дослідження не встановлено гендерних відмінностей за кількістю інфікованих. Кількість HCV-інфікованих чоловіків вельми умовно переважала групу жінок. Разом із цим у світі існує думка, що серед чоловіків більший відсоток інфікованості HCV, ніж у жінок (2,5% і 1,2%, відповідно). Саме цим фактом аргументують утричі вищу захворюваність на рак печінки в чоловіків (Matsumura et al., 2013). Можливо, особливості гендерного розподілу зараженості HCV залежать від територіальної належності осіб, які підлягають обстеженню.

Ми проаналізували віковий склад HCV-інфікованих. Висновки зазначеного вище всеукраїнського експрес-тестування підтверджують, що в 2013 р. у середньому в країні кожна десята людина віком 19–35 років була інфікована HCV. За нашими даними, серед тих, кому проведено діагностику, виявлено небагато дітей і підлітків. Кількість хворих збільшується серед осіб віком понад 20 років. Та найбільше HCV-інфікованих зареєстровано серед людей 30–49 років – відповідно 32% і 30%. При цьому для пацієнтів чоловічої статі характерна наявність сплеску захворюваності у віці 30–39 років, для жінок – протягом усього цього 20-річного проміжку. У віці 50–59 років HCV-інфікованість населення ще на високому рівні (19,5%), а далі знижується. Після 60 років цей діагноз установлюють набагато рідше.

Така вікова динаміка пояснюється особливостями шляхів передачі та перебігу хвороби. Вертикальна передача HCV від матері до дитини – надзвичайно рідкісне явище (не перевищує 2,8–4,2% випадків, Tovo et al., 2016). Перинатальна передача HCV можлива, але зустрічається теж рідко і має місце у 5,7% дітей, народжених матерями-носіями HCV, а це в 3,5 раза менше, ніж за вірусного гепатиту B (El-Shabrawi and Kamal, 2013; Sokal and Nannini, 2017). У дорослих людей протягом життя виявляється більше обставин, що несуть ризик інфікування. Крім того, навіть за інфікування в ранньому віці перші прояви хвороби та необхідність обстеження можуть виникнути лише через роки. Високі показники, зареєстровані зараз у віці 30–49 років, обумовлені інфікуванням цих осіб не менше ніж десятиліття тому. Зменшення відсотка хворих у категоріях осіб похилого віку пов'язують зі значним скороченням тривалості життя людини за відсутності лікування HCV.

Отже, основна соціально-вікова група, яка активно залучається до епідемічного процесу, – особи молодого працездатного віку у репродуктивному періоді життя, що узгоджується з даними фахової літератури. Зазначене вище наштовхує на вирішення низки соціально-медичних питань. На підставі цих даних можна прогнозувати, що без лікування у більшості HCV-інфікованих латентний перебіг захворювання протягом 15–20 років спричинить формування цирозу без або з розвитком раку печінки. Фінальні стадії захворювання зумовлюють значні фінансові збитки для системи охорони здоров'я щодо діагностування та лікування, збільшують смертність у вікових групах починаючи з 40 років. Тому так гостро постають питання своєчасного діагностування, ефективного антивірусного лікування та профілактики виникнення нових випадків HCV.

На території України виявлено циркуляцію декількох генотипів HCV, що збігається з присутністю цих генотипів у Східній Європі. У популяції хворих на території України превалюють підтип 1b (понад половину інфікованих) і генотип 3 (понад третину інфікованих). Останніми роками намітилася тенденція до витіснення генотипу 1b за рахунок зростання частки генотипів 3 та 2. Вважають, що генотип 3 збільшує частотність через розширення внутрішньовенної наркоманії серед молодих людей. Цей шлях зараження набуває великого значення. З усіх куточків світу надходить невтішна інформація про те, що наркомани – найбільша група ризику серед тих, хто може бути інфікований HCV. На жаль, найактивніше до епідемічного процесу долучаються підлітки 15–17 років і молодь, віком 18–29 років. Ризик зараження HCV серед осіб, які вживають наркотики шляхом внутрішньовенного введення, становить 38–56% випадків (Larsen et al., 2010; Smith et al., 2015). Генотип 2 HCV, за оцінками експертів ВООЗ, переміщується до нас із Північної та Центральної Європи.

Гендерні особливості дозволяють зазначити, що чоловіки частіше інфіковані генотипом 3, жінки – генотипом 1b та мікст-формою 1ab, що, можливо, пов'язано з переважними шляхами зараження: внутрішньовенне уведення наркотиків у

чоловіків і артифіціальний шлях у жінок. Деяке підвищення відсотка мікст-форм у жінок свідчить про обтяження перебігу хвороби через додатковий негативний вплив на функцію печінки (Wedemeyer et al., 2015).

У нашому дослідженні проаналізовано контингент хворих за статтю, віком і генотипом HCV за результатами обстежень понад 1,5 тис. людей за п'ятирічний період. Аналіз та зіставлення даних по регіонах України та окремо в м. Дніпро та Дніпропетровській області дозволив отримати низку важливих показників, підтвердив певну типовість епідемічного процесу HCV.

У нашій країні офіційна реєстрація HCV розпочата у 2009 році. Проте досі має місце лише розрізнена інформація по областях згідно з локальними реєстрами та окремі праці, зокрема, лабораторії епідеміології парентеральних вірусних гепатитів та ВІЛ-інфекції ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб імені Л. В. Громашевського НАМН України»; інформація, отримана «Міжнародним альянсом із ВІЧ/СНІД в Україні» та небагато інших відомостей. В Україні дотепер немає даних, які дозволили б мати об'єктивну картину щодо кількості інфікованих осіб у країні, кількості пролікованих пацієнтів, оцінити кількість тих, хто одужав і тих, кому необхідне додаткове лікування. За міжнародними рекомендаціями, всі пацієнти з гострим і хронічним гепатитом, асоційованим із HCV, повинні вважатися потенційними кандидатами щодо противірусного лікування.

Розуміння епідеміологічного процесу надзвичайно важливе для планування та здійснення програм ранньої діагностики, прогнозування перебігу, вибору оптимальних препаратів для лікування та здійснення профілактичних заходів у боротьбі з інфекцією HCV. Безумовно, важливо знати представництво генотипів HCV на території країни з урахуванням мікст-інфекції, наприклад, вірусний гепатит В і HCV або HCV у ВІЛ-інфікованих тощо. Коінфекція HCV і вірусного гепатиту В тягне за собою збільшення ризику важкої форми гепатиту з блискавичною печінковою недостатністю, незалежно від того, чи є це гострим процесом під час одночасного зараження двома вірусними інфекціями або ж гострий HCV нашаровується на перебіг хронічного вірусного гепатиту В (Caccamo et al., 2014). В Україні зафіксовано випадки HCV генотипу 4, який раніше вважали поширеним лише на території Єгипту.

Отже, рівень захворюваності HCV на території України вказує на необхідність цілеспрямованого епідеміологічного нагляду за даною інфекцією.

Висновки

За останні роки серед населення різних регіонів України зберігається високий відсоток осіб із наявністю анти-HCV (у середньому 32,5%). Проте під час обстеження цільових груп у м. Дніпро та Дніпропетровській області виявлено стрімке зростання цього показника з 28% до 64%.

Найбільша кількість HCV-інфікованих реєструється серед груп населення віком 30–49 років, без значних відмінностей за статтю. За генотипами HCV превалюють підтип 1b (понад половину інфікованих) і генотип 3 (понад третину інфікованих) із тенденцією до витискання генотипу 1b за рахунок зростання частоти генотипів 3 та 2. При цьому чоловіки частіше інфіковані генотипом 3, жінки – генотипом 1b та мікст-формою 1ab, що, можливо, пов'язано з переважними шляхами зараження.

Захворювання на HCV продовжують залишатися однією з актуальних проблем охорони здоров'я України.

Автори щиро вдячні керівництву та співробітникам Незалежної лабораторії «Інвітро», лабораторії КЗ Дніпропетровської обласної клінічної лікарні імені І. І. Мечникова ДОР і лабораторії Лікувально-діагностичного центру медичної академії за надану допомогу в отриманні матеріалів для дослідження.

References

Caccamo, G., Saffioti, F., & Raimondo, G. (2014). Hepatitis B virus and hepatitis C virus dualinfection. World Journal of Gastroenterology, 20(40), 14559–14567.

Cacoub, P., & Comarmond, C. (2017). New insights into HCV-related rheumatologic disorders: A review. Journal Advanced Research, 2, 89–97.

Choo, Q. L., Kuo, G., Weiner, A. J., Overby, L. R., Bradley, D. W., & Houghton, M. (1989). Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. Science, 244(4902), 359–362.

Derzhstandart Ukrai'ny. Medychni laboratorii'. Vymogy dlja jakosti ta kompetentnosti [National standard of Ukraine. Medical laboratories. Requirements for quality and competence] (EN ISO 15189:2012, IDT) DSTU EN ISO 15189: 2015, DP UkrNDNC, Kyiv (in Ukrainian).

El-Shabrawi, M. H., & Kamal, N. M. (2013). Burden of pediatric hepatitis C. World Journal of Gastroenterology, 19(44), 7880–7888.

Fiorino, S., Bacchi-Reggiani, L., de Biase, D., Fornelli, A., Masetti, M., Tura, A., Grizzi, F., Zanello, M., Mastrangelo, L., Lombardi, R., Acquaviva, G., di Tommaso, L., Bondi, A., Visani, M., Sabbatani, S., Pontoriero, L., Fabbri, C., Cuppini, A., Pession, A., & Jovine, E. (2015). Possible association between hepatitis C virus and malignancies different from hepatocellular carcinoma: A systematic review. World Journal of Gastroenterology, 21(45), 12896–12953.

Gower, E., Estes, C., Blach, S., Razavi-Shearer, K., & Razavi, H. (2014). Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection. Journal Hepatology, 61, S45–57.

Guaraldi, G., Lonardo, A., Maia, L., & Palella Jr., F. J. (2017). Metabolic concerns in aging HIV-infected persons: From serum lipid phenotype to fatty liver. AIDS, 31, S147–S156.

Larsen, C., Bousquet, V., Delarocque-Astagneau, E., Pioche, C., Roudot-Thoraval, F., & Desenclos, J. C. (2010). Hepatitis C virus genotype 3 and the risk of severe liver disease in a large population of drug users in France. Journal of Medical Virology, 82(10), 1647–1654.

Lee, M. H., Yang, H. I., Lu, S. N., Jen, C. L., You, S. L., Wang, L. Y., L'Italien, G., Chen, C. J., & Yuan, Y. (2014). Hepatitis C virus genotype 1b increases cumulative lifetime risk of hepatocellular carcinoma. International Journal of Cancer, 135(5), 1119–1126.

Lee, M. H., Yang, H. I., Yuan, Y., L'Italien, G., & Chen, C. J. (2014). Epidemiology and natural history of hepatitis C virus infection. World Journal of Gastroenterology, 20(28), 9270–9280.

Lingala, S., & Ghany, M. G. (2015). Natural history of hepatitis C. Gastroenterology Clinics of North America, 44(4), 717–734.

Lonardo, A., Adinolfi, L. E., Restivo, L., Ballestri, S., Romagnoli, D., Baldelli, E., Nascimbeni, F., & Loria, P. (2014) Pathogenesis and significance of hepatitis C virus steatosis: An update on survival strategy of a successful pathogen. World Journal of Gastroenterology, 20(23), 7089–7103.

Magiorkinis, G., Magiorkinis, E., Paraskevis, D., Ho, S. Y. W., Shapiro, B., Pybus, O. G., Allain, J.-P., & Hatzaki, A. (2009). The global spread of hepatitis C virus 1a and 1b: A phylodynamic and phylogeographic analysis. PLOS Medicine, 6(12), e1000198.

Matsumura, H., Nirei, K., Nakamura, H., Higuchi, T., Arakawa, Y., Ogawa, M., Tanaka, N., & Moriyama, M. (2013). Histopathology of type C liver disease for determining hepatocellular carcinoma risk factors. World Journal of Gastroenterology, 19(30), 4887–4896.

Miller, F. D., Elzalabany, M. S., Hassani, S., & Cuadros, D. F. (2015). Epidemiology of hepatitis C virus exposure in Egypt: Opportunities for prevention and evaluation. World Journal of Gastroenterology, 7(28), 2849–2858.

Mohd Hanafiah, K., Groeger, J., Flaxman, A. D., & Wiersma, S. T. (2013). Global epidemiology of hepatitis C virus infection: New estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. Hepatology, 57(4), 1333–1342.

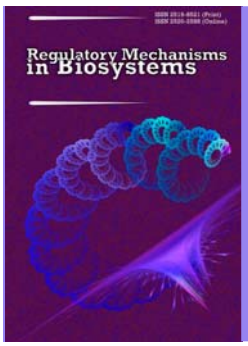
Mühlberger, N., Schwarzer, R., Lettmeier, B., Sroczynski, G., Zeuzem, S., & Siebert, U. (2009). HCV-related burden of disease in Europe: A systematic assessment of incidence, prevalence, morbidity, and mortality. Bio Med Central Public Health, 9, 34.

Negro, F., & Esmat, G. (2017). Extrahepatic manifestations in hepatitis C virus infection. Journal Advanced Research, 2, 85–87.

Shcherbinina, M. B., & Shevchenko, T. N. (2016). Vnepechenochnye projavlenija hronicheskogo virusnogo gepatita C: svoevremennaja diagnostika uluchshaet prognoz [Extrahepatic manifestations of chronic hepatitis C: early diagnosis improves prognosis]. Ukraïns'kij Terapevtichnij Zhurnal, 3, 93–99 (in Russian).

Smith, D. J., Combellick, J., Jordan, A. E., & Hagan, H. (2015). Hepatitis C virus (HCV) disease progression in people who inject drugs (PWID): A systematic review and meta-analysis. International Journal of Drug Policy, 10, 911–921.

Soipe, A. I., Razavi, H., Razavi, D., Galárraga, O., Taylor, L. E., & Marshall, B. D. L. (2016). Chronic hepatitis C virus (HCV) burden in Rhode Island: Modelling treatment scale-up and elimination. Epidemiology and Infection, 144(16), 3376–3386.
Sokal, E., & Nannini, P. (2017). Hepatitis C virus in children: The global picture. Archives of Disease in Childhood.
Tovo, P. A., Calitri, C., Scolfaro, C., Gabiano, C., & Garazzino, S. (2016). Vertically acquired hepatitis C virus infection: Correlates of transmission and disease progression. World Journal of Gastroenterology, 22(4), 1382–1392.
Wedemeyer, H., Dore, G. J., & Ward, J. W. (2015). Estimates on HCV disease burden worldwide – filling the gaps. Journal of Viral Hepatitis, Suppl. 1, 1–5.
WHO (2016). Guidelines for the screening, care and treatment of persons with chronic hepatitis C infection. Updated version.



Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(2), 217–223
doi: 10.15421/021734

Effect of Pb exposure on the cells and matrix of the intervertebral disc of rats

V. Maltseva

Sytenko Institute of Spine and Joint Pathology, Academy of Medical Science, Kharkiv, Ukraine

Article info

Received 29.03.2017
Received in revised form 21.04.2017
Accepted 25.04.2017

Sytenko Institute of Spine and Joint Pathology of Academy of Medical Science of Ukraine, Pushkinskaya Str., 80, Kharkiv, 61024, Ukraine. Tel.: +38-095-741-35-55. E-mail: maltseva.val.evg@gmail.com

Maltseva, V. (2017). Effect of Pb exposure on the cells and matrix of the intervertebral disc of rats. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(2), 217–223. doi:10.15421/021734

Degenerative spine diseases are common throughout the world. There are many factors that lead to these diseases. One of these exogenous factors may be Pb exposure. Most of the fundamental investigations about the negative effects of the Pb exposure have investigated the impact of high doses of Pb, while Pb exposure in low concentrations has been insufficiently studied. The nutrition of the intervertebral disc is provided by the vessels that grow into the vertebral bodies and the paravertebral tissue. This suggests the possibility that Pb penetrates from the bone to the intervertebral disc together with nutrients. This article reports an experimental study which was performed in rats aged 1.5 months age (n = 40). Rats in the experimental group received lead acetate solution (230 mg of Pb per 1 liter of distilled water) as drinking water and the animals in the control group received distilled water for 10 weeks. In the isolated intervertebral discs, the content of Pb was determined by X-ray fluorescence spectrometry. The effect of lead on the structural organization of the intervertebral disc was investigated by light microscopy. The ultrastructural features of cells and the matrix intervertebral disc were studied by transmission electron microscopy. In the young animals after Pb exposure, a significant increase was found in the content of Pb in the intervertebral disc tissue, of 4.6 times compared to the control group. The histological analysis showed degenerative changes in the annulus fibrosus (AF) of the intervertebral disc. In the outer region cracks and defibration of the lamellae were observed. Large isogenic groups were detected in the inner region of the intervertebral disc. A decrease in the height by 12.2% in the outer parts and by 10% in the central part of the intervertebral disc was recorded. Also a reduction in the width of the lamellae by 8% was shown. Cell density of the annulus fibrous decreased by 12% and in the gelatinous nucleus pulposus (NP) by 24.2%. Electron microscopic analysis of the inner region of the AF of the intervertebral disc showed chondrocytes with electron-dense mitochondria, vacuolization of the cytoplasm, fragmented nuclei and destructive cavities. The matrix of the lamellae of the AF had a diverse electron density, so areas with the high electron density of various sizes were observed. Collagen fibrils of the AF had blurred outlines, sometimes the transverse striation disappeared or it was irregular, which can indicate the matrix mineralization and possibly the accumulation of Pb in these areas. In the NP, the most notochordal cells revealed the formation of myelin figures. The effect of Pb at low concentration results in its accumulation in the tissues of the intervertebral disc of rats and causes degenerative changes in the intervertebral disc structure, leading to the reduction in the height of the intervertebral disc, decrease in the width of the lamellae and in cell density, thereby violating both the structures of matrix and cells. Future investigations of the collagen content of intervertebral disc after Pb exposure are needed.

Keywords: degenerative disc; histology; transmission electron microscopy; lead

Introduction

An important research problem of our time is the reduction of the incidence of various diseases in the population. Degenerative diseases are a significant cohort of diseases which are associated with the influence of various factors, both the environment and the characteristics of the organism itself. The degeneration of the intervertebral disc is considered an unsolved problem of modern medicine, due to the huge number of factors causing it, as well as the peculiarity of the mechanisms of cartilage tissue regeneration. This pathology leads to back pain, both episodic and permanent, in many individuals (Smith et al., 2011; Clarençon et al., 2015; Izzo et al., 2015). In this regard, studies are being conducted, which consider both the different treatment options for this group of diseases and the factors that cause them. Given the probability of the influence of environmental factors on the occurrence of degeneration of the intervertebral disc, it can be assumed that one of them may be the toxic effect of Pb.

The high content of Pb in the earth's crust, as well as its frequent use in various industries, has led to its its presence in the life of every person, as well as its more or less pronounced effect on the body. Every year there is a decrease in the amount of Pb in the environment, and in the industrial enterprises. However, as a result of clinical studies, it has been established, that even in a sufficiently low concentration in the blood Pb causes various disorders such as the decrease of the intellectual capacity in children (Reuben et al., 2017), hypertension (Almeida Lopes et al., 2017), coronary heart disease (Ding et al., 2016), kidney dysfunction (Buser et al., 2016), dental caries (Wiener et al., 2015), and psychiatric disorders (Modabbernia et al., 2016, 2017). Thus, the problem of studying the influence of the low concentrations of Pb on the human body seems to be significant.

It is known that the maximum absorption of Pb is observed in children and pregnant women (up to 50% with food), and is involved in the process of growth in the case of children, and the formation of the embryo skeleton in pregnant women (Warm, 2013). Thus, the bodies of children are very susceptible to the effects of Pb due to its active accumulation in the body. In the case of the increasing rates of the bone resorption which occurs after

menopause or in the various diseases associated with the remodeling process, Pb embedded in the structure of bone tissue is released into the blood and its negative effect on the body can increase (Theppeang et al., 2008; Brito et al., 2014). As a conesquence, the recent decrease of the level of Pb in the environment and, correspondingly, in the blood, does not reduce its stable content in the bone tissue and, therefore, it continues to exert a stable long-term negative effect on the body (Hu et al., 2007).

In connection with the established decrease of Pb in the environment, special attention is paid to the study of the effect of this element on the organism, especially considering that earlier studies aimed to study the effect of Pb at higher doses, which was due to the higher level of Pb in the human environment at the time of those studies. Consequently, the influence of Pb in the concentration accepted as normal (10 μg/dl, in the blood) has not been sufficiently studied. Moreover researchers face the question that there may not be a safe level of Pb (Grandjean, 2010).

The vertebrae is a kind of depot for the accumulation of Pb and due to the long half-life term (25 years) of Pb, bones are also a source of it in the blood during remodeling even with no direct impact on the environment. It is known that the nutrition of the intervertebral disc is provided by a few blood vessels permeating the vertebral bodies and paravertebral tissue. This suggests the possibility that Pb penetrates from the bone to the intervertebral disc together with nutrients. Pb has an affinity to many elements contained in the human organism and affects the formation and metabolism of bone tissue (Pemmer et al., 2013). The main component of the bone is hydroxyapatite, the main constituent elements of which are calcium and phosphorus. It is known that Pb can replace calcium in the structure of hydroxyapatite whereby it violates the biomechanical properties of the bone matrix. In the study of samples of degenerative intervertebral discs, obtained after discectomy, it was found that Pb level increases with age (Nowakowski et al., 2015). Furthermore, there is evidence that microscopic calcification occurs in the intervertebral discs in the norm, namely in the NP (Rutges et al., 2010). This indicates the possibility of the accumulation of Pb in the nucleus pulposus (NP) of the intervertebral disc by replacing calcium in the structure, as in the bone tissue.

In most clinical and experimental studies, the effect of Pb on bone tissue was studied at an early stage during the growth of the skeleton. However, some researchers suggest that Pb can affect the cartilaginous tissue (Brodziak-Dopierała et al., 2011; Meirer et al., 2011; Holz et al., 2012; Roschger et al., 2013; Tomaszewska et al., 2016). Currently, in such studies a relationship between the level of Pb in the blood in women and the development of osteoarthritis has been found, which suggests that Pb can be involved in the pathogenesis of this disease (Jordan et al., 2007; Nelson et al., 2011).

The aim of the study was to reveal the characteristic features of the influence of Pb on the structural organization of cells and the matrix of the intervertebral disc of laboratory rats.

Materials and methods

The experimental research was conducted on white laboratory rats. The animals were housed in groups of 5 individuals in a vivarium cage. The rats had access to the normal balanced diet for rodents with a 12 hour day/night schedule. The experimental investigation was carried out with the approval of the Committee of Bioethics of Sytenko Institute of Spine and Joint Pathology, Academy of Medical Science, Kharkiv, Ukraine (protocols No 127 of 24 February 2014; No 159 from 19 December 2016) and conducted in accordance with European legislation and the law of Ukraine "On protection of animals from cruelty".

Rats aged 1.5 months (n = 40) were separated randomly into two groups of twenty animals each (the experimental group and the control group). The rats in the experimental group received Pb acetate solution (230 mg of Pb per 1 liter of distilled water) as drinking water and in the control group the animals received distilled water for 10 weeks. The choice of the concentration is due to researches of other authors, where it was found to be the closest environmentally equipment to the level of human exposure (Carmouche et al., 2005). The animals were removed from the experiment by decapitation under ether anesthesia at the age of 4 months.

The fragments of lumbar spine LI-LIV were harvested for further analysis.

Samples of intervertebral discs were removed, washed with phosphate buffered saline, fixed in 96° alcohol and dried at 60 °C overnight. After that, X-ray fluorescence spectrometry was conducted on the samples intervertebral discs in an energy dispersive spectrometer "Sprut"-K (Ukrrenthen, Ukraine) with SDD detector X-123 (Amptek, USA) to determine the Pb content in the samples of the intervertebral disc.

After removal, fragments of the lumbar spine were fixed in 10% neutral formalin overnight and decalcified in 10% solution of formic acid for two weeks. Fragments of the spine after decalcification were washed in running water and were dehydrated in a series ethanol solutions with increasing concentrations and chloroform and were embedded in paraffin (An and Martin, 2003). Histological sections (5 μm) were made in the slide microtome "Reichert" and were stained with Weigert's iron hematoxylin and eosin. The analysis of the histological sections was performed using a light microscope Olympus BX-63 (Japan). Measurements were carried out on photos which were made from 3 slices in 4 fields of view under ×10, ×20, ×40 objectives and using ImageJ software and cellSens (Olympus BX-63). The height of the intervertebral disc in the outer regions (μm) and central region (μm), the width of lamellae (μm) of collagen fibers of AF were measured. Also, the density of the fibrochondrocytes in the AF and notochordal cells in the NP was evaluated in mm^2.

The isolated fragments of the intervertebral disc were cut into pieces the size ≈ 1 mm^3 and processed by the standard method of electron microscopy in accordance with the recommendations of B. Weekly. The collected samples were prefixed in 5% Karnovsky fixator, after which we performed additional fixation in 1% osmium tetroxide solution (OsO_4) and dehydration in ethanol solutions of increasing concentration (from 50° to 96°) and acetone. Thereafter specimens were embedded in a mixture of epon and araldite epoxy resins.

Semi-thin (1–2 mm) and ultra-thin sections (0.05–0.09 μm) were made using glass knives on the ultramicrotome UMPT-3M (Sumy, Ukraine). The differential staining of semi-thin sections were performed in 1% solution of methylene blue solution and 1% solution of basic fuchsin by the method of Aparicio (1969). Ultra-thin sections were contrasted in Pb citrate and uranil acetate by the method of Reynolds (1963). Ultrastructural analysis was provided by using transmission electron microscope EMR-100BR (Sumy, Ukraine).

The mean value (x) and the standard error (SE) were determined for each of the measured parameters in the study. The comparison of mean values for identification of the impact of certain factors in case of the normal distribution and equality of group variances of two independent samples were performed using t-Student test. In the statistical analysis we calculated the achieved significance level (P) and the critical level of significance in this study was accepted as 0.05.

Results

X-ray fluorescent spectrometry. In young animals, after Pb exposure, we found a significant increase in the content of Pb in the intervertebral disc tissue which was 4.6 times (P = 0.02) that of the control group (Table 1).

Table 1
Mass fraction of Pb in the intervertebral discs of rats (%)

Groups	Mass fraction of Pb	P*
Experimental group	$(0{,}37 \pm 0{,}093) \cdot 10^{-2}$	0,02
Control group	$(0{,}08 \pm 0{,}031) \cdot 10^{-2}$	

Note: * – t-Student test.

During the histological analysis, the signs of degenerative changes in the annulus fibrosus (AF) of rats after Pb exposure were shown. The defibration of collagen fibers in the lamellae of AF and gaps between bundles of collagen fibers in the longitudinal and transverse directions were observed in the animals' intervertebral discs (Fig. 1). Especially large cracks were located in areas bordering the NP. Partial necrosis of the tissue areas was noted. chondrocytes with pyknotic nuclei were located in the regions with the disturbance structure of collagen fibers of lamellae of AF (Fig. 1).

In addition, among the fibrochondrocytes there were typical cartilaginous cells – chondrocytes in capsules. It indicates a violation of the specific cell phenotype of the intervertebral disc in the outer region of AF. The chondrocytes, located in the inner region of AF, had the typical structure of the normal intervertebral disc in the control and experimental groups of rats.

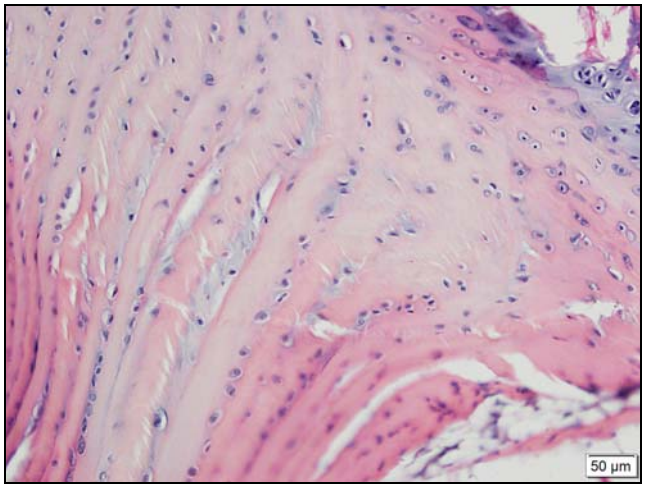


Fig. 1. The outer region of AF of the intervertebral disc of a rat: defibration of bundles of collagen fibers in the lamellae; pyknotic nuclei in chondrocytes near the cracks in lamellae; Pb exposure; hematoxylin and eosin

Measuring of the height of the intervertebral disc of rats allowed us to establish a decrease of this index by 12.2% in outer departments and by 10% in the central region after Pb exposure (Table 2). Also a reduction in the width of the lamellae of collagen fibers in the annulus fibrous by 8% was shown compared to the control group (Table 3). The density of fibrochondrocytes in the lamellae of the experimental animals was lower by 12% than equivalent indices in the control animals (Table 3).

The lamellar structure of the inner region of AF of the rats was less pronounced. Among thin lamellae of collagen fibers cracks were observed and near them some chondrocytes had piknotic nuclei (Fig. 1).

Table 2
Height of the intervertebral disc of rats (x ± SE, n = 40)

Regions	Control group	Experimental group	P*
Outer region, µm	898,8 ± 13,8	789,4 ± 14,4	0,01
Central region, µm	720,8 ± 15,0	648,7 ± 17,8	0,01

Note: * – t-Student test.

Table 3
Morphometrical parameters of the intervertebral disc of rats (x ± SE, n = 40)

Parameters	Control group	Experimental group	P*
Width of lamellae of AF, µm	36,3 ± 0,2	33,4 ± 0,2	0,01
Density of fibrochondrocytes of AF, mm^{-2}	1897,8 ± 35,7	1669,4 ± 28,2	0,01
Density of notochordal cells in the NP, mm^{-2}	4693,5 ± 87,5	3557,0 ± 45,8	0,01

Note: * – t-Student test.

Destruction of intercellular substance in the areas with cracks was less pronounced. Alongside these areas single large groups of isogenic cells were observed. Also the overgrowth of cartilage on the border of the annulus fibrous and NP was observed (Fig. 2).

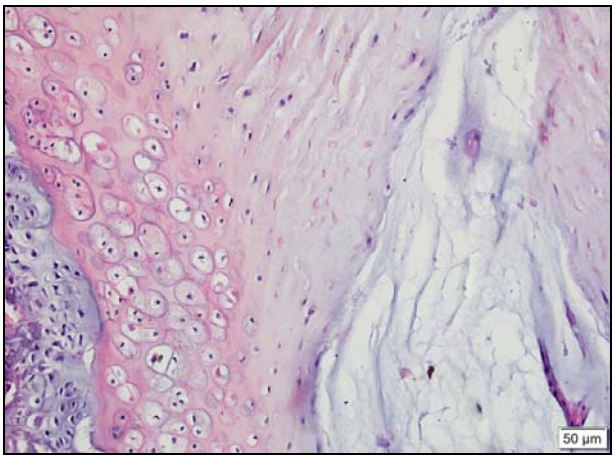


Fig. 2. The inner region of AF of the intervertebral disc of a rat: defibration of matrix; Pb exposure; hematoxylin and eosin

In this area of the intervertebral disc chondrocytes formed large isogenic groups with 5–8 cells, each of which was surrounded by a matrix typical for hyaline cartilage matrix.

The matrix had slight eosinophilic staining, the fibrous structure did not have clear contours. Cells in these isogenic groups were with different characteristics. Some of them had pyknotic nuclei or vacuolization of cytoplasm. Also cells with large hypochromic nuclei surrounded by a narrow rim of cytoplasm were observed (Fig. 3).

The fragmentation of the syncytium structure was found in rats of the experimental group. In addition, clusters of notochordal cells were observed (Fig. 3). Among them was a significant amount of cells with pyknotic nuclei, which indicated degenerative changes. There was a decrease in the density of notochordal cells by 24.2% after Pb exposure compared with the control group (Table 3).

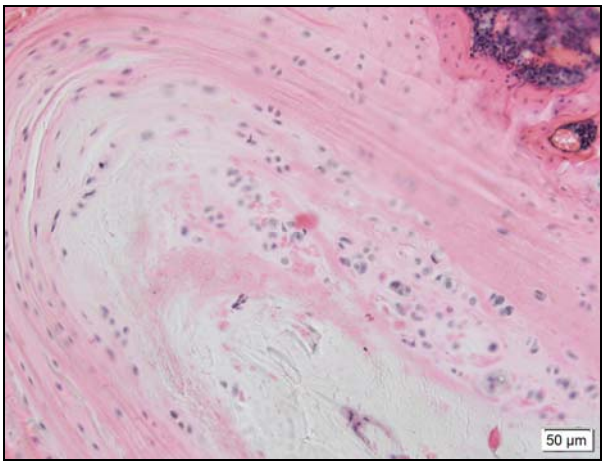


Fig. 3. The inner region of AF of the intervertebral disc of a rat: great isogenic groups of chondrocytes; the fragmentation on syncytium in NP; Pb exposure; hematoxylin and eosin

Thus, decrease in the height of the outer regions of the intervertebral disc occurs due to violation of the structure of the lamellae in the annulus fibrous. We hypothesize that changes in the central region of the intervertebral disc were manifested mainly by decrease in the density of notohordal cells. These cells synthesize of glycosaminoglycans, which are structural components of the NP and indirectly ensure the preservation of the volume of intervertebral disc (Erwin and Hood 2014).

Single fibrochondrocytes in the outer region of the annulus fibrous of the intervertebral disc in the experimental group were identified. Most cells had a characteristic phenotype. The vacuoles and individual electron-dense granules were revealed in the cytoplasm of some cells (Fig. 4).

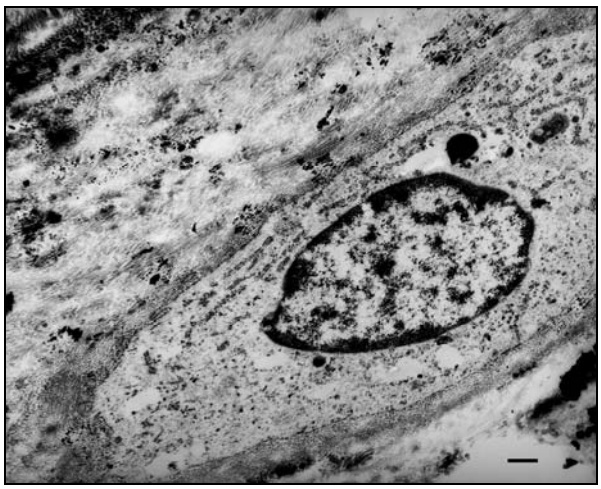


Fig. 4. The outer region of AF: chondrocyte with single profiles of rough endoplasmic reticulum and vacuolization of cytoplasm; Pb exposure; contrasted by Reynolds; electron micrograph; scale bar: 1 μm

In addition, cells containing electron-dense mitochondria along with vacuolization of cytoplasm and individual profiles of rough endoplasmic reticulum were located in the isogenic groups of chondrocytes. Some cells in isogenic groups had fragmented nuclei, indicating apoptosis. In these cells against a background of preservation of the plasma membrane individual profiles of rough endoplasmic reticulum among large vacuoles were found (Fig. 5).

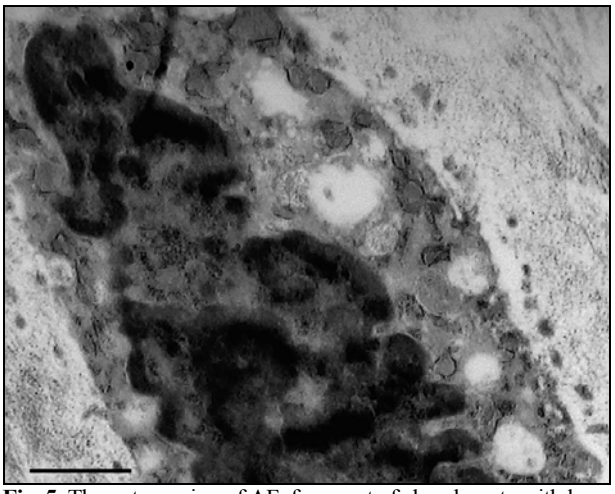


Fig. 5. The outer region of AF: fragment of chondrocyte with large vacuoles in cytoplasm and electron-dense nucleus; Pb exposure; contrasted by Reynolds; electron micrograph; scale bar: 1 μm

Matrix of lamellae of AF had a diverse electron density. Areas with high electron density of various sizes were observed (Fig. 6).

Collagen fibrils of lamellae had blurred outlines, sometimes the transverse striation disappeared or it was irregular (Fig. 7). Also the electron-dense circular structures, consisting of densely arranged collagen fibrils, were located in these areas. Most chondrocytes had large round nuclei, sometimes with nucleoli and single profiles of rough endoplasmic reticulum in the cytoplasm in the inner region of AF of the experimental animals.

Also chondrocytes with two nuclei were observed and they corresponded to each other as the key to the lock. It can be evidence of a recent division by the amitosis of these cells. The cytoplasm of these chondrocytes was less differentiated compared to other chondrocytes, it can suggest of the immaturity of these cells. Chondrocytes were distributed in groups of 2–4 isogenic cells sometimes 5. Some chondrocytes had lysosomes in the cytoplasm, possibly with enzymes destroying the degenerative matrix. Also, some cells with exocytosis phenomenon were found. In the cytoplasm of most cells of the inner region of AF, the varying size of destructive cavities and its location or the formation of very large vacuoles were located. Similar changes are observed in chondrocytes in the articular cartilage in osteoarthritis (Pascarelli et al., 2015). As was observed, some of these cells had an electron-dense outline around the cell membrane, which is possibly due to a violation of the forming of the matrix structure or the cell capsule formation and the death of mitochondria.

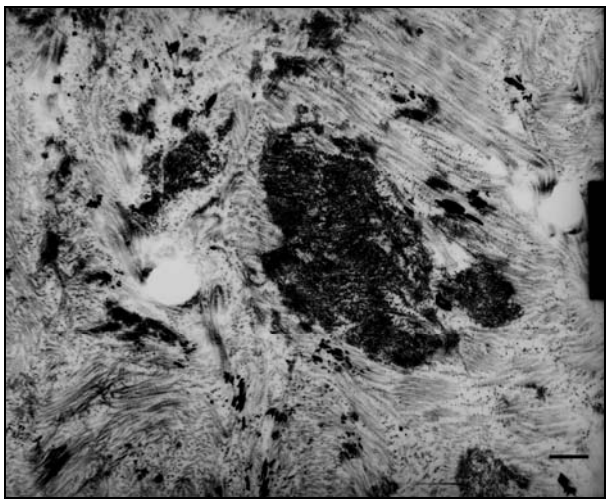


Fig. 6. The outer region of AF: irregular density of collagen fibers in matrix: the area of possible calcification or Pb accumulation in the matrix; Pb exposure; contrasted by Reynolds; electron micrograph; scale bar: 1 μm

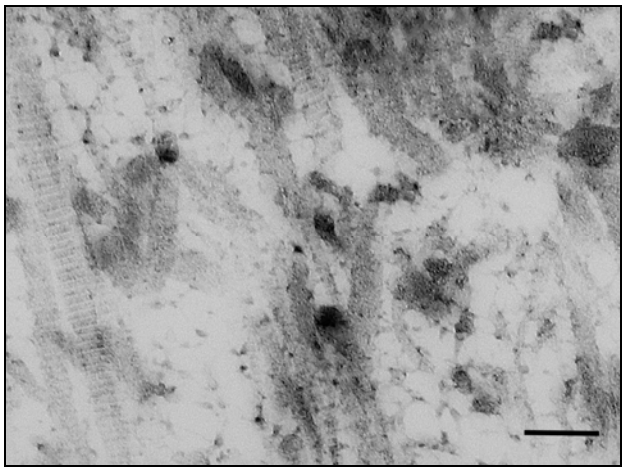


Fig. 7. The outer region of AF: the collagen fibrils with different range of destructive changes in the structure and electron-dense structures in the matrix; Pb exposure; contrasted by Reynolds; electron micrograph; scale bar: 0,5 μm

Notochordal cells with heterochromatic nuclei were found in the NP of rats both in the experimental group and in the control group. In the cytoplasm of some notochordal cells of rats in the experimental group large vacuoles were observed, probably filled with the products of biosynthesis. Additionally, some cells had a hyperchromic electron-dense nucleus, indicating degenerative changes in the cells. Also, myelin figures were revealed in most notochordal cells (Fig. 8).

Discussion

Degenerative diseases of the spine are often found among the populations of the different countries of the world. However, there is still a wide range of unidentified factors which cause this pathology. In particular, the influence of Pb on the structure of the intervertebral disc has not been determined. Rats are one of the generally accepted models for the reproduction and studying of degenerative intervertebral disc diseases, due to their availability,

low cost, and structural features (Norcross et al., 2003, Gebhard et al., 2011). Nevertheless, the distinctive feature of the structure of the intervertebral disc of rats is the absence of differentiation of the notochordal cells into chondrocytes. As a result, these cells remain in the gelatinous nucleus throughout the lifetime of the rats, whereas in humans they almost entirely disappear at the age of 4–10 years due to bipedalism. According to a recent study, the preservation of notochordal cells in the gelatinous core of rats does not prevent their use as a model of the degeneration of the intervertebral disc due to the fact that the chondrocyte-like cells, which are the result of the differentiation of the noctochordal cells, due to axial load on the upright, appear in the jelly nucleus of a person with ageing. Accordingly, the pathological or physiological stages of ageing or the degeneration of the notochordal cells are displayed. The content of collagen, glycosaminoglycans and water in the annulus fibrous of rats corresponds to that of humans (Showalter et al., 2012).

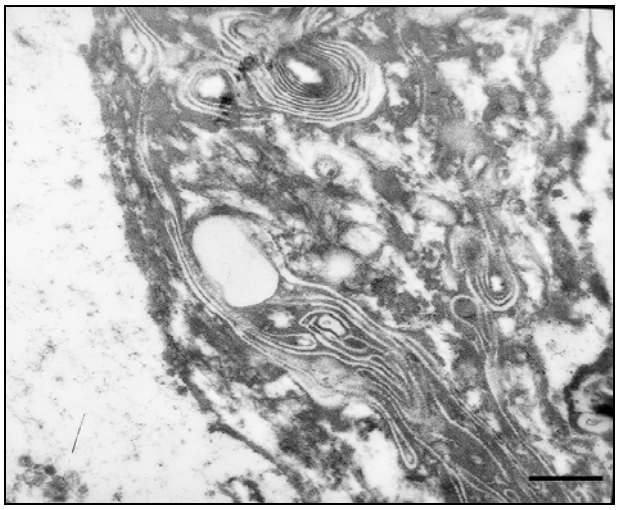


Fig. 8. Myelin figures in the cytoplasm of notochordal cell; Pb exposure; contrasted by Reynolds; electron micrograph; NP; scale bar: 1 μm

In the intervertebral discs of young rats after exposure of Pb we found a decrease the height of the intervertebral disc and the width of lamellae, along with the decrease in the cell density as in the annulus fibrous as in the NP. If decrease in the height of the intervertebral disc was observed to be almost the same in the outer region as in the central region, the cell density is reduced more in the NP. The presence of signs of the degeneration in notochordal cells of the NP after Pb exposure, such as the chromatin condensation and the formation of myelin figures in the cytoplasm which are associated with the cell membrane and the destruction of its structure as a result of certain negative factors (Fig. 5) is a sign of cell death (Majno et al., 2004). Probably it indicates the possibility of the penetration of this element with nutrients into the NP and the inhibition of the biosynthetic functions of the notochordal cells by disturbance of their structure as result of Pb which leads to their death. The presence of the electron-dense mitochondria in the chondrocytes of the experimental groups of rats probably indicates their death due to the accumulation of Pb. It is known that the accumulation in the mitochondria of cationic metals, including Pb, is mainly due to the presence of calcium in the transport channels (Meyer et al., 2013). One can also mention the possibility of the accumulation of Pb in the endoplasmatic reticulum through its close relationship with the functioning mitochondria, it can also support the accumulation of Pb in the mitochondria.

In chondrocytes of the outer region of the annulus fibrous after Pb exposure vacuolisation of the cytoplasm and the condensation of chromatin in the nucleus were found, indicating the disruption of cells, namely their biosynthetic functions, and this is consistent with our finding that Pb exposure causes an increase in the content of collagen fibers of collagen type III, which is uncharacteristic for the structure matrix of the intervertebral disc (Maltseva, 2016).

In separate experimental studies in vivo and in vitro, conducted to identify the mechanisms of action of Pb on the articular cartilage, the authors also discovered changes in the biosynthetic characteristics of chondrocytes, as well as their phenotype. Zuscik et al. (2006) found that the action of Pb on the articular chondrocytes contributes to the disruption of the basic characteristics of these cells, in connection with their hypertrophy, which subsequently causes the degradation of the articular matrix and its mineralization. An in vitro study on chondrocytes of articular cartilage of chickens also confirmed that the action of Pb causes chondrocyte hypertrophy, leading to inhibition of the synthesis of proteoglycans and type II collagen, which are the main permanent components of the cartilage matrix (Holz et al., 2012). However, the mechanisms of the appearance of the established changes under the action of Pb in the cartilaginous tissue remain undisclosed. Probably, a similar process occurs in the intervertebral disk, causing the inhibition of biosynthesis in the chondrocytes of matrix components.

We have noted the division of chondrocytes in the inner region of AF of intervertebral discs along with the destructive changes in cells in the form of the cavities in the cytoplasm. It indicates the presence of a compensatory mechanism for repairing the structural homeostasis of the tissue. Increase of the cell proliferative activity through the formation of the large isogenic groups of chondrocytes, which was confirmed histologically, is a standard sign of the degenerative process in the intervertebral disc (Rutges et al., 2010; Majeed et al., 2016). According to Majeed et al. (2016) it is caused by a violation of biomechanical qualities of the intervertebral disc. The described changes in the inner region of the AF indicate cartilage matrix degeneration, namely changing its structure to the fibrous structure reminiscent of the structure of the hyaline cartilage. According to the opinion of Tsyvyan and Buruhin (1988) the transformation of the matrix of AF leads to local stresses in the areas of tissue heterogeneity, which in turn lead to further cracking of the matrix and enlargement of the zone of necrotic decay. Reorganization of the structure of the annulus fibrous and its transformation into an excellent cartilaginous structure reduces the strength properties of the disc and its elasticity, which negates its main function – to bear load. Such a restructuring is supposedly an adaptation reaction in response to a violation of the organizational characteristics of the cartilage matrix, but it does not appear to be a complete replacement for the structure of the AF due to the inability of normal functioning.

Degenerative changes were observed in the form of cracks between and within the plates on the histological level and local destruction of collagen fibrils on electron-microscopic level in the matrix of the outer and the inner regions of the AF. The revealed features of the change in the structure of the matrix indicate the destruction of the intercellular substance of the cartilage of the AF. The formation of electron-dense areas in the structure of the matrix of AF can be evidence of the presence of calcification and is one of the signs of the degeneration of the tissue structure of the annulus fibrous of the intervertebral disc (Fig. 6) (Rutges et al., 2010; Hristova et al., 2011). Also, it can confirm accumulation of Pb. The disarrangement of the structure of the matrix in the outer region possibly is caused by the changes of its support function in response to stress, which in turn causes the degenerative restructuring in the inner region of AF. According to Jin et al. (2014) the balance of catabolic and anabolic processes is disturbed in the degenerative disc, so negatively changing the synthesis and degrading the matrix components, which in turn leads to degenerative changes.

The accumulation of Pb and other elements in the intervertebral disc was studied in a clinical study where this process was associated with the mineralization of cartilage tissue of the intervertebral disc with ageing (Niedźwiedzki et al., 1997). In addition, the authors have identified the two types of mineralization of the intervertebral disc: visible and invisible. The visible mineralization is characterized by the presence of crystals of minerals during the microscopic examination of tissue of the intervertebral disc and invisible mineralization, considered by the authors as a primary

stage of the visible mineralization which could be determined only by chemical analysis of tissues. Our histological examination of rats' disc tissue after exposure to Pb did not reveal signs of the tissue mineralization, so we can assume that the established Pb content in the intervertebral disc is a sign of invisible mineralization, but may serve as the primary link in the degeneration of the disc.

Moreover the accumulation of Pb can occur not only in the cartilage matrix, but also in the cells, probably in chondrocytes. So by the electron-microscopic study of chondrocytes in the outer region of annulus fibrous we have revealed electron-dense mitochondria, which can be a kind of cellular depot for the accumulation of heavy metals (Meyer et al., 2013) and residual bodies in cells,which perhaps can be a sign of the accumulation of Pb in chondrocytes. The formation of residual bodies in cells is the result of autophagy which occurs in normal and as the adaptive response to the impact of various factors on the intervertebral disc, but its expression increases in the chondrocytes with age in the case of the intervertebral disc degeneration (Jiang et al., 2014). According to the results of research Gruber et al. (2014), autophagy in chondrocytes of the AF is necessary for the elimination of dead mitochondria because this dysfunction occurs in disc degeneration. In the outer region of the AF matrix of the intervertebral disc we noted the formation of electron-dense sites with signs of calcification, which probably serves as the places of accumulation of Pb.

Conclusion

The study has found accumulation of Pb in tissues of the intervertebral disc of young rats and an increase in its content by 4.6 times compared with the control. Histology has shown a reduction in the intervertebral disc height in the central region by 10%, and in the outer regions by 12.2%, caused by the cracks and defibration of lamelae in the AF and significant reduction of the cell density. The violations dectected in the central part of the disc can be explained by the presence of degenerative changes in the notochordal cells. Pb exposure leads to similar degenerative changes in the chondrocytes of outer and inner regions of the AF such as the formation of the destructive cavities, the vacuolization of cytoplasm and the degradation of organelles. In the inner region of AF the formation of large isogenic groups of chondrocytes was marked, probably associated with the adaptive response to the degenerative changes in the intervertebral disc. In the matrix of AF of rats we noted the presence of the electron-dense areas, which could indicate a matrix mineralization and possible the accumulation of Pb in these areas.

Thus, Pb exposure leads to change in the phenotype of chondrocytes of the intervertebral disc and leads to the degenerative changes in the structure of the cartilage matrix in rats. Future investigations of the collagen content of the intervertebral disc after Pb exposure are needed.

References

Almeida Lopes, A. C., Silbergeld, E. K., Navas-Acien, A., Zamoiski, R., Martins, A. D. Jr., Camargo, A. E., Urbano, M. R., Mesas, A. E., & Paoliello, M. M. (2017). Association between blood lead and blood pressure: A population-based study in Brazilian adults. Environmental Health, 16(1), 27–37.

An, Y. H., & Martin, K. (2003). Handbook of histology methods for bone and cartilage. Humana Press Inc., New York.

Aparicio, S. R., & Marsden, P. (1969) A rapid methylene blue-basic fuchsin stain for semi-thin sections of peripheral nerve and other tissues. Journal of Microscopy, 89, 139–141.

Brito, J. A., Costa, I. M., E Silva, A. M., Marques, J. M., Zagalo, C. M., Cavaleiro, I. I., Fernandes, T. A., & Gonçalves, L. L. (2014). Changes in bone Pb accumulation: Cause and effect of altered bone turnover. Bone, 64, 228–234.

Brodziak-Dopierała, B., Kowol, J., Kwapuliński, J., Kusz, D., & Cieliński, Ł. (2011). Lead and calcium content in the human hip joint. Biological Trace Element Research, 144, 6–16.

Buser, M. C., Ingber, S. Z., Raines, N., Fowler, D. A., & Scinicariello, F. (2016). Urinary and blood cadmium and lead and kidney function: NHANES 2007–2012. International Journal of Hygiene and Environmental Health, 219(3), 261–217.

Carmouche, J. J., Puzas, J. E., Zhang, X., Tiyapatanaputi, P., Cory-Slechta, D. A., Gelein, R., Zuscik, M., Rosier, R. N., Boyce, B. F., O'Keefe, R. J., & Schwarz, E. M. (2005). Lead exposure inhibits fracture healing and is associated with increased chondrogenesis, delay in cartilage mineralization, and a decrease in osteoprogenitor frequency. Environmental Health Perspectives, 113(6), 749–755.

Civjan, J. L., & Buruhin, A. A. (1988). Patologija degenerirujushhego mezhpozvonkovogo diska [Pathology of the degenerating intervertebral disc]. Nauka, Novosibirsk (in Russian).

Clarençon, F., Law-Ye, B., Bienvenot, P., Cormier, É., & Chiras, J. (2016) The degenerative spine. Magnetic Resonance Imaging Clinics of North America, 24(3), 495–513.

Ding, N., Wang, X., Weisskopf, M. G., Sparrow, D., Schwartz, J., Hu, H., & Park, S. K. (2016). Lead-related genetic loci, cumulative lead exposure and incident coronary heart disease: The normative aging study. PLoS One, 11, 9.

Erwin, W. M., & Hood, K. E. (2014). The cellular and molecular biology of the intervertebral disc: A clinician's primer. The Journal of the Canadian Chiropractic Association, 58(3), 246–257.

Gebhard, H., James, A. R., Bowles, R. D., Dyke, J. P., Saleh, T., Doty, S. P., Bonassar, L. J., & Härtl, R. (2011). Biological intervertebral disc replacement: an *in vivo* model and comparison of two surgical techniques to approach the rat caudal disc. Evidence Based Spine-Care Journal, 2(1), 29–35.

Grandjean, P. (2010). Even low-dose lead exposure is hazardous. Lancet, 376(9744), 855–856.

Gruber, H. E., Watts, J. A., Riley, F. E., Fulkerson, M. B., Norton, H. J., & Hanley, E. N. Jr. (2013). Mitochondrial bioenergetics, mass, and morphology are altered in cells of the degenerating human annulus. Journal of Orthopaedic Research, 31(8), 1270–1275.

Holz, J. D., Beier, E., Sheu, T. J., Ubayawardena, R., Wang, M., Sampson, E. R., Rosier, R. N., Zuscik, M., & Puzas, J. E. (2012). Lead induces an osteoarthritis-like phenotype in articular chondrocytes through disruption of TGF-β signaling. Journal of Orthopaedic Research, 30(11), 1760–1766.

Hristova, G. I., Jarzem, P., Ouellet, J. A., Roughley, P. J., Epure, L. M., Antoniou, J., & Mwale, F. (2011). Calcification in human intervertebral disc degeneration and scoliosis. Journal of Orthopaedic Research, 29(12), 1888–1895.

Hu, H., Shih, R., Rothenberg, S., & Schwartz, B. S. (2007). The epidemiology of lead toxicity in adults: Measuring dose and consideration of other methodologic issues. Environmental Health Perspectives, 115(3), 455–462.

Izzo, R., Popolizio, T., D'Aprile, P., & Muto, M. (2015). Spinal pain. European Journal of Radiology, 84, 746–756.

Jiang, L., Yuan, F., Yin, X., & Dong, J. (2014). Responses and adaptations of intervertebral disc cells to microenvironmental stress: A possible central role of autophagy in the adaptive mechanism. Connective Tissue Research, 55(5–6), 311–321.

Jin, L., Liu, Q., Scott, P., Zhang, D., Shen, F., Balian, G., & Li, X. (2014). Annulus fibrosus cell characteristics are a potential source of intervertebral disc pathogenesis. PLoS One, 9, 5.

Jordan, J. M., & Callahan, L. F. (2007). Community and environmental factors and arthritis outcomes. North Carolina Medical Journal, 68(6), 439–443.

Majeed, S. A., Seshadrinath, N. A., Binoy, K. R., & Raji, L. (2016). Lumbar disc herniation: Is there an association between histological and magnetic resonance imaging findings? Indian Journal of Orthopaedics, 50(3), 234–242.

Majno, G., & Joris, I. (2004). Cells, tissues, and disease: principles of general pathology. Oxford University Press, New York.

Maltseva, V. (2016). Vplyv svyntsyu na vmist kolaheniv u mizhkhrebtsevomu dysku ta hubchastiy kistkoviy tkanyni til khrebtsiv shchuriv riznoho viku [The influence of lead on the content of collagens in the intervertebral disc and trabecular bone tissue of vertebral bodies of rats of different ages]. Visnyk Problem Biolohiyi i Medytsyny, 131, 211–215 (in Ukrainian).

Meirer, F., Pemmer, B., Pepponi, G., Zoeger, N., Wobrauschek, P., Sprio, S., Tampieri, A., Goettlicher, J., Steininger, R., Mangold, S., Roschger, P., Berzlanovich, A., Hofstaetter, J. G., & Streli, C. (2011). Assessment of chemical species of lead accumulated in tidemarks of human articular cartilage by X-ray absorption near-edge structure analysis. Journal of Synchrotron Radiation, 18(2), 238–244.

Meyer, J. N., Leung, M. C., Rooney, J. P., Sendoel, A., Hengartner, M. O., Kisby, G. E., & Bess, A. S. (2013). Mitochondria as a target of environmental toxicants. Toxicological Sciences, 134(1), 1–17.

Modabbernia, A., Velthorst, E., & Reichenberg, A. (2017). Environmental risk factors for autism: An evidence-based review of systematic reviews and meta-analyses. Molecular Autism, 8, 13–28.

Modabbernia, A., Velthorst, E., Gennings, C., De Haan, L., Austin, C., Sutterland, A., Mollon, J., Frangou, S., Wright, R., Arora, M., & Reichenberg, A. (2016). Early-life metal exposure and schizophrenia: A proof-of-concept study using novel tooth-matrix biomarkers. European Psychiatry, 36, 1–6.

Nelson, A. E., Chaudhary, S., Kraus, V. B., Fang, F., Chen, J. C., Schwartz, T. A., Shi, X. A., Renner, J. B., Stabler, T. V., Helmick, C. G., Caldwell, K., Poole, A. R., & Jordan, J. M. (2011). Whole blood lead levels are associated with biomarkers of joint tissue metabolism in African American and white men and women: the Johnston County Osteoarthritis Project. Environmental Research, 111(8), 1208–1214.

Niedźwiedzki, T., Pawlikowski, M., Brudnicki, J., & Palka, E. (1997). Zmiany mineralogiczne zachodzace w krazku miedzykregowym i stawach kregosłupa w czasie starzenia sie [Mineral changes in the intervertebral disc and facet joints during aging]. Chirurgia Narzadow Ruchu i Ortopedia Polska, 62(1), 39–45 (in Polish).

Norcross, J. P., Lester, G. E., Weinhold, P., & Dahners, L. E. (2003). An in vivo model of degenerative disc disease. Journal of Orthopaedic Research, 21, 183–188.

Nowakowski, A., Kubaszewski, Ł., Frankowski, M., Wilk-Frańczuk, M., Zioła-Frankowska, A., Czabak-Garbacz, R., Kaczmarczyk, J., & Gasik, R. (2015). Analysis of trace element in intervertebral disc by atomic absorption spectrometry techniques in degenerative disc disease in the Polish population. Annals of Agricultural and Environmental Medicine, 22(2), 362–367.

Pascarelli, N. A., Collodel, G., Moretti, E., Cheleschi, S., & Fioravanti, A. (2015). Changes in ultrastructure and cytoskeletal aspects of human normal and osteoarthritic chondrocytes exposed to interleukin-1β and cyclical hydrostatic pressure. International Journal of Molecular Sciences, 16(11), 26019–26034.

Pemmer, B., Roschger, A., Wastl, A., Hofstaetter, J. G., Wobrauschek, P., Simon, R., Thaler, H. W., Roschger, P., Klaushofer, K., & Streli, C. (2013). Spatial distribution of the trace elements zinc, strontium and lead in human bone tissue. Bone, 57(1), 184–193.

Reuben, A., Caspi, A., Belsky, D. W., Broadbent, J., Harrington, H., Sugden, K., Houts, R. M., Ramrakha, S., Poulton, R., & Moffitt, T. E. (2017). Association of childhood blood lead levels with cognitive function and socioeconomic status at age 38 years and with IQ change and socioeconomic mobility between childhood and adulthood. Journal of the American Medical Association, 317(12), 1244–1251.

Reynolds, E. S. (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. The Journal of Cell Biology, 17, 208–212.

Risbud, M. V., Schoepflin, Z. R., Mwale, F., Kandel, R. A., Grad, S., Iatridis, J. C., Sakai, D., & Hoyland, J. A. (2015). Defining the phenotype of young healthy NP cells: Recommendations of the Spine Research Interest Group at the 2014 annual ORS meeting. Journal of Orthopaedic Research, 33(3), 283–293.

Roschger, A., Hofstaetter, J. G., Pemmer, B., Zoeger, N., Wobrauschek, P., Falkenberg, G., Simon, R., Berzlanovich, A., Thaler, H. W., Roschger, P., Klaushofer, K., & Streli, C. (2013) Differential accumulation of lead and zinc in double-tidemarks of articular cartilage. Osteoarthritis Cartilage, 21(11), 1707–1715.

Rutges, J. P., Duit, R. A., Kummer, J. A., Oner, F. C., van Rijen, M. H., Verbout, A. J., Castelein, R. M., Dhert, W. J., & Creemers, L. B. (2010) Hypertrophic differentiation and calcification during intervertebral disc degeneration. Osteoarthritis Cartilage, 18(11), 1487–1495.

Showalter, B. L., Beckstein, J. C., Martin, J. T., Beattie, E. E., Orías, A. A., Schaer, T. P., Vresilovic, E. J., & Elliott, D. M. (2012). Comparison of animal discs used in disc research to human lumbar disc: Torsion mechanics and collagen content. Spine, 37(15), E900–907.

Smith, L. J., Nerurkar, N. L., Choi, K. S., Harfe, B. D., & Elliott, D. M. (2011). Degeneration and regeneration of the intervertebral disc: Lessons from development. Disease Models and Mechanisms, 4(1), 31–41.

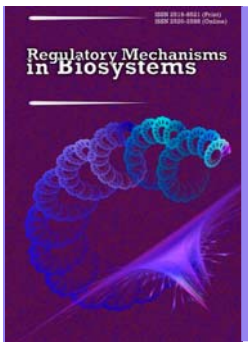
Teplaya G. A. (2013). Tjazhelye metally kak faktor zagrjaznenija okruzhajushhej sredy [Heavy metals as a factor of environmental pollution]. Astrahanskij Vestnik Jekologicheskogo Obrazovanija, 23, 182–192 (in Russian).

Theppeang, K., Glass, T. A., Bandeen-Roche, K., Todd, A. C., Rohde, C. A., & Schwartz, B. S. (2008). Gender and race/ethnicity differences in lead dose biomarkers. American Journal of Public Health, 98(7), 1248–1255.

Tomaszewska, E., Dobrowolski, P., Winiarska-Mieczan, A., Kwiecień, M., Tomczyk, A., Muszyński, S., & Radzki, R. (2016). Alteration in bone geometric and mechanical properties, histomorphometrical parameters of trabecular bone, articular cartilage, and growth plate in adolescent rats after chronic co-exposure to cadmium and lead in the case of supplementation with green, black, red and white tea. Environmental Toxicology and Pharmacology, 46, 36–44.

Wiener, R. C., Long, D. L., & Jurevic, R. J. (2015). Blood levels of the heavy metal, lead, and caries in children aged 24–72 months: NHANES III. Caries Research, 49(1), 26–33.

Zuscik, M. J., Puzas, E., O'Keefe, R. J., Sheu, T., Holz, J. D., Schwarz, E. M., Rosier, R. N., & Ubayawardena R. (2006). Pb exposure regulates a complex interplay of signaling pathways in articular chondrocytes that ultimately leads to phenotypic changes resembling osteoarthritis. The Toxicologist CD – An Official Journal of the Society of Toxicology, 90, 3–12.



Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(2), 224–230
doi: 10.15421/021735

Effect of 3-substituted 1,4-benzodiazepin-2-ones on maximal normalized rate of bradykinin-induced smooth muscle contraction in the presence of calcium channel blockers

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

**Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine*
***O. V. Bogatsky Physico-Chemical Institute, National Academy of Sciences of Ukraine, Odessa, Ukraine*

Article info

Received 12.04.2017
Received in revised form 11.05.2017
Accepted 13.05.2017

Taras Shevchenko National University of Kyiv, Glushkova Str., 2, Kyiv, 03022, Ukraine. Tel.: +38-096-702-80-44. E-mail: sphaenodon@ukr.net

O. V. Bogatsky Physico-Chemical Institute, National Academy of Sciences of Ukraine, Lustdorfska Doroga, 86, Odessa, 65080, Ukraine. Tel.: +38-097-905-92-97. E-mail: victor_pavlovsky@ukr.net

Virych, P. A., Shelyuk, O. V., Kabanova, T. A., Khalimova, O. I., Martynyuk, V. S., Pavlovsky, V. I., & Andronati, S. A. (2017). Effect of 3-substituted 1,4-benzodiazepin-2-ones on maximal normalized rate of bradykinin-induced smooth muscle contraction in the presence of calcium channel blockers. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(2), 224–230. doi:10.15421/021735

The development of modern organic chemistry and molecular modeling technologies simplify the search for potential inhibitors of various receptor systems and biological processes. The one of the directions is the development of analgesics of broad spectrum and low toxicity. It is important to search for inhibitors of the kinin-kallikrein system that regulates many functions: inflammation, pain, carcinogenesis, vascular tone, smooth muscle contraction and other. Derivatives of 3-substituted 1,4-benzodiazepine-2-ones have a unique spatial conformation that allows one to simulate β-structures of bioactive peptides. The functional activity of compounds is determined by properties of their peripheral chemical radicals. We analyzed the effect of 3-substituted 1,4-benzodiazepin-2-ones derivatives on the normalized maximal rate of bradykinin-induced smooth muscle contraction and relaxation of the stomach in the presence of calcium channel blockers: verapamil (1 μM), gadolinium (300 μM) and 2-aminoethyl diphenylborinate (0.1 μM). The levels of bradykinin and 3-arylamino-1,2-dihydro-3H-1,4-benzodiazepine-2-ones in incubation solution were 10^{-6} M. Data processing on dynamics of contraction was performed according to the method of Burdyha and Kosterin. Compounds MX-1775 and MX-1925 reduced maximal normalized rate (V_n) of bradykinin-induced smooth muscle contraction in the presence of Gd^{3+} by 21.2% and 31.0% respectively. Compound MX-1925 increased V_n of relaxation by 11.6%. A similar effect is typical for MX-2011, where there is an increase by 34.6%. In the presence of verapamil this compound additionally decreased V_n contraction by 20.5%. Substances MX-1775, MX-2004 and MX-1925 restored maximal normalized rate of relaxation to original values of bradykinin-induced contraction. In the presence of 2-aminoethyldiphenylborinate MX-1775 additionally reduced V_n of contractions by 7.5%. 3-substituted 1,4-benzodiazepine-2-ones did not change the maximal normalized rate of contraction and relaxation of carbachol- and potential-induced smooth muscle contraction. Based on the results and previous investigations, the MX-1775 is a potential blocker of kinin B_2-receptors. Effects obtained for other compounds require additional research.

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

Вплив 3-заміщених 1,4-бензодіазепін-2-онів на максимальну нормовану швидкість брадикінін-індукованого скорочення гладеньких м'язів за присутності блокаторів кальцієвих каналів

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

**Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна*
***Фізико-хімічний інститут імені О. В. Богатського НАН України, Одеса, Україна*

Пошук антагоністів кінінових рецепторів – перспективне завдання, оскільки кінін-калікреїнова система бере участь у багатьох процесах, що включають регуляцію розвитку запалення, тиску крові, канцерогенезу, больових відчуттів тощо. Похідні 3-заміщених 1,4-бензодіазепін-2-онів володіють унікальною просторовою конформацією, що дозволяє імітувати β-структури біологічно активних пептидів. Формування особливої структури сполук досягається зміною радикалів, що визначають їх активність. Проаналізовано вплив

похідних 3-заміщених 1,4-бензодіазепін-2-онів на максимальну нормовану швидкість (V_n) брадикінін-індукованого скорочення та розслаблення гладеньких м'язів за присутності верапамілу (1 мкМ), іонів Gd^{3+} (300 мкМ) та 2-аміноетилдифенілборіату (0,1 мкМ). Речовини МХ-1775 та МХ-1925 сприяють додатковому зниженню максимальної швидкості скорочення на 21,2 % та 31,0% відповідно за наявності в розчині Gd^{3+}. Сполука МХ-1925 здатна збільшувати V_n розслаблення на 11,6%. Подібний ефект характерний для МХ-2011, де спостерігається зростання V_n на 34,6%. За присутності верапамілу ця сполука додатково інгібує V_n скорочення на 20,5%. Усі вибрані речовини, окрім МХ-2011, відновлюють V_n розслаблення до початкових значень брадикінін-індукованих скорочень. На фоні присутності 2-аміноетилдифенілборіату МХ-1775 додатково знижує V_n скорочення на 7,5%. Проведені дослідження зі впливу 3-заміщених 1,4-бензодіазепін-2-онів на потенціал- і карбахолін-індуковане скорочення гладеньких м'язів шлунка щурів не виявили статистично достовірних змін максимальної нормованої швидкості скорочення та розслаблення. Виходячи з попередніх досліджень і отриманих результатів, МХ-1775 можна вважати потенційним блокатором кінінових B_2-рецепторів. Ефекти, отримані для інших сполук, потребують додаткових досліджень.

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

Вступ

Біль – складне багатовимірне сенсорно-перцептивне явище, що важко піддається визначенню. Поняття болю трактується як неприємне сенсорне та емоційне переживання, пов'язане з фактичним або потенційним пошкодженням тканин. Як відомо, за пошкодження нервових волокон виникає спонтанна електронна збудливість і надчутливість, що виявляється зміною експресії нейромедіаторів, факторів росту, рецепторів і нейроактивних молекул первинних аферентних нейронів (Baron et al., 2010). Така периферична сенсибілізація посилює ноцицепцію, що спричиняє больову гіперчутливість (Gierthmuhlen et al., 2014; Puretić and Demarin, 2012), у тому числі до виникнення спонтанного болю та гіпералгезивного підвищення температури. Важлива умова боротьби з больовими відчуттями – з'ясування механізмів їх виникнення. Насамперед це стосується периферичних складових, не пов'язаних із нервовою системою. Як вважається, одна з них – кінін-калікреїнова система. Вона складається з неактивних попередників – кініногенів, калікреїнів плазми крові та тканин, а також специфічних активаторів цих субстратів, що продукують вазоактивні пептиди – брадикінін і калідин. За дії брадикініну відбувається ініціація клітинної відповіді відбувається через низку поверхневих рецепторів клітини. Брадикінінові рецептори спряжені з G-білками, мають 7 трансмембранних доменів (7TM). Існує два їх підтипи (B_1 та B_2), що підтверджено з використанням специфічних високоафінних непептидних антагоністів, радіолігандне зв'язування та клонування самих рецепторів із подальшою їх експресією. Різниця в афінності антагоністів рецепторів B_2, які включають [DPhe7]-брадикінін, D-Arg-[Hyp3, Thi5, D-Tic7, Oic8]-брадикінін та непептидний WIN64338, дозволила визначити деякі гомологи даного рецептора, у тому числі трахеальний B_3 (Hall, 1997).

Рецептори B_1 та B_2 – важливі медіатори серцево-судинного гомеостазу, запалення та ноцицепції. У той час як B_2 конститутивно експресується у багатьох тканинах, синтез B_1 індукується лише за прозапальних умов. Ранні дослідження впливу кінінів на травну систему, особливо на гладенькі м'язи, проведено в 1960–1970-і роки. Показано, що очищений м'язовий шар тонкого кишечника чутливий до наднизьких доз кінінів (0,1 нг/мл) і відповідає на них скороченням. Також додавання брадикініну сприяє збільшенню цитозольного кальцію міоцитів клубової кишки.

Дослідження скоротливої активності шлунка щурів у відповідь на аплікацію брадикініну та його аналогів виявило, що скорочення має двофазний характер: перша фаза скорочення з незначною релаксацією та наступна – повільного скорочення з остаточним розслабленням (Calixto and Medeiros, 1992). Присутність кінінових рецепторів різних типів у шлунково-кишковому тракті дозволяє використовувати їх як моделі дослідження модифікаторів активності кінін-калікреїнової системи, у тому числі інгібіторів або активаторів B_1 та B_2 брадикінінових рецепторів. Підтвердженням такого припущення стали паралельні радіолігандні дослідження зв'язування агоністів і антагоністів брадикінінових рецепторів (Meini et al., 2007).

Вивчення популяції кінінових рецепторів у інтерстиціальних клітинах Кахаля показало відсутність рецепторів B_1 і присутність B_2 (Choi et al., 2006). Ці рецептори опосередковують інгібування перистальтичної активності клубової кишки морської свинки (Chan and Rudd, 2006). Природні речовини деяких рослин після незначної хімічної модифікації структури можуть стати перспективними модифікаторами активності кінін-калікреїнової системи, що доведено експериментально на скоротливій здатності шлунка мишей (Alves et al., 2015). Під час розвитку запальних процесів у шлунково-кишковому тракті відбувається продукування активних кінінів, що діють на конститутивно присутні B_2 рецептори, які швидко десенситизуються та індукують вивільнення запальних цитокінів і експресію рецептора B_1, резистентного до сенситизації.

Тканинні калікреїни кишечника здатні гідролізувати фактори росту та інші пептиди, у той час як кініни відповідають за проникність капілярів, розвиток больових відчуттів, синтез цитокінів і молекул адгезії нейтрофілів. Вивільнення калікреїнів відбувається в келихоподібних клітинах тонкого кишечника під час розвитку запальних процесів. Використання блокаторів B_2 рецепторів дозволяє зменшити перистальтику кишечника, у той час як інгібування B_1 рецепторів сприяє зниженню запалення. Активація обох рецепорів спричиняє розвиток діареї (Stadnicki, 2011). Схожі дослідження проведено для вивчення ролі B_1 та B_2 кінінових рецепторів у розвитку колітів (Marcon et al., 2013).

Взаємодія брадикініну зі специфічним поверхневим рецептором клітини викликає зміни рівнів цитоплазматичного кальцію із залученням різних систем, таких як фосфоліпаза С, простагландини, протеїнкінази та фосфоліпаза A_2. Розвиток сучасної органічної хімії дозволяє синтезувати антагоністи непептидної природи, що потенційно можуть застосовуватись як блокатори активності кінін-калікреїнової системи кишечника (Kam Ro et al., 2005; Fattori et al., 2007). Для створення речовин, здатних взаємодіяти з рецепторним апаратом кінін-калікреїнової системи, використовують бензодіазепінове ядро, здатне набувати структури β-згину біологічно активних пептидів. Приклад такої речовини – антагоніст B_2 рецепторів HOE 140, який лежить в основі розробки непептидних B_2 антагоністів (Dziadulewicz et al., 1999). Тому пошук непептидних модифікаторів активності кінінових рецепторів на основі бензодіазепінового ядра – перспективний напрям досліджень фармакологічно активних сполук даного класу. Їх застосування дозволить боротись із запальними процесами, регулювати функціональний стан серцево-судинної системи, долати больові відчуття тощо.

Науковий колектив Фізико-хімічного інституту НАН України імені О. В. Богатського розробив новий клас перспективних сполук на основі 3-заміщених 1,4-бензодіазепінів, які володіють анальгетичною дією. Експериментальні дані демонструють здатність деяких похідних бенздіазепінів проявляти чітку антигіперальгезивну активність відносно запального та невропатичного болю на тваринних моделях. Деякі похідні бензодіазепінів можуть викликати глибоку анальгезію у тварин (Andronati et al., 2009).

Попередні дослідження активності спектра похідних 3-заміщених 1,4-бензодіазепін-2-онів дозволили ідентифікувати декілька сполук, здатних виявляти біологічну активність та змінювати механо-кінетичні параметри брадикінін-індукованого скорочення гладеньких м'язів (Virych et al., 2017). Шляхи трансдукції сигналу брадикінінових рецепторів включають також

активацію кальцієвих каналів різного типу, які забезпечують зростання концентрації іона в цитоплазмі клітини та ініціацію скорочення. Застосування верапамілу дозволяє заблокувати потенціалчутливі кальцієві канали Т- і L-типів, у результаті чого змінюється швидкість і амплітуда викликаного скорочення. Іони гадолінію здатні конкурувати за селективний фільтр, тому також спричиняють зміни механо-кінетичних параметрів скорочення гладеньких м'язів. До одного з посередників індукції скоротливої відповіді міоцитів належать рецептори інозитол-1,4,5-трифосфату, локалізовані на ендоплазматичному ретикулумі. Їх активація спричиняє викидання кальцію з внутрішньоклітинних депо, тому вони відіграють важливу роль у сигнальному каскаді кінінових рецепторів.

Беручи за основу модель брадикінін-індукованого скорочення гладеньких м'язів шлунка щурів, за мету цього дослідження обрали перевірку активності похідних 3-заміщених 1,4-бензодіазепін-2-онів за присутності блокаторів кальцієвих каналів (верапамілу, іонів гадолінію та 2-аміноетилдифенілборіату), а також визначення їх впливу на механокінетичні параметри потенціал- і карбахолін-індукованих скорочень гладеньких м'язів.

Матеріал і методи досліджень

Ізометричні дослідження скоротливої активності гладеньких м'язів проведено під час інкубування в нормальному розчині Кребса такого складу (мМ): 120,4 NaCl, 5,9 KCl, 15,5 $NaHCO_3$, 1,2 NaH_2PO_4, 1,2 $MgCl_2$, 2,5 $CaCl_2$, 11,5 глюкоза; pH розчину становив 7,4. Відбирали щурів-самців масою 240–260 г, утримували їх в умовах віварію ННЦ «Інститут біології та медицини». Усі маніпуляції з тваринами проводили згідно з Міжнародною конвенцією про роботу з тваринами та Законом України «Про захист тварин від жорстокого поводження». Після швидкої декапітації вилучали шлунок. Очищений м'язовий шар антральної частини шлунка нарізали на смужки розміром 1,5 x 20 мм. Інкубували в камері зі швидкістю потоку 1,5 мл/хв та сталою температурою +37 ºС. Препарату надавали пасивний натяг силою 10 мН і витримували протягом однієї години до появи спонтанних скорочень або сталих механо-кінетичних параметрів у відповідь на стимуляцію гіперкалієвим розчином (80 мМ). Останній готували на основі розчину Кребса шляхом заміни Na^+ на еквівалентну кількість K^+.

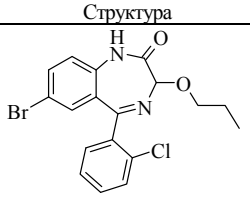
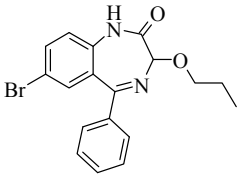
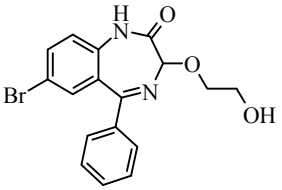
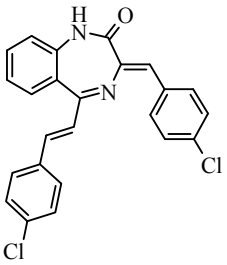
Реєстрували за допомогою модуля збирання даних m-DAQ12 (Holit Data Systems Ltd., Україна) та програмного забезпечення PowerGraph Professional 3.3.

Необхідну концентрацію брадикініну (10^{-6} М) для стимуляції скорочень створювали під час додавання аліквоти маточного розчину (1 мМ) в інкубаційну камеру. Дослідження впливу похідних 3-заміщених 1,4-бензодіазепін-2-онів проводили за конститутивної їх присутності у розчині Кребса. Кінцева концентрація становила 10^{-6} М. Дію досліджуваних речовин вивчали за однаковим протоколом експерименту, сполуки вносили в розчин Кребса за 30 хв до реєстрації механічної активності препаратів. Перелік використаних речовин та їх хімічну структуру наведено в таблиці 1.

Використання блокаторів кальцієвих каналів дозволяє вимкнути окремі ланки ланцюга трансдукції сигналу від брадикінінових рецепторів та виявити можливий синергізм чи антагонізм їх дії з 3-заміщеними 1,4-бензодіазепін-2-онами. Іони гадолінію здатні блокувати селективний фільтр кальцієвих каналів, перешкоджаючи тим самим руху Ca^{2+} (Malasics et al., 2010). Верапаміл – класичний блокатор потенціал-активованих кальцієвих каналів Т- і L-типів (Bergson et al., 2011). Кінцева концентрація Gd^{3+} у розчині інкубації становила 300 мкМ, верапамілу – 1 мкМ. Відповідний блокатор постійно присутній в омивальному розчині Кребса. 2-аміноетилдифенілборіат застосовують для блокування виходу кальцію з внутрішньоклітинних депо. Сполука виступає антагоністом рецепторів інозитол-1,4,5-трифосфату та TRP-каналів (Bon and Beech 2013; Bencze et al., 2015; Seidlmayer et al., 2016). У дослідженнях використали концентрацію 100 нМ для запобігання виходу кальцію з саркоплазматичного ретикулуму та активації TRP-каналів.

Як нульові значення обрано показники гладеньком'язового скорочення за присутності в розчині Кребса 1% ДМСО, що пов'язано з низькою розчинністю 3-заміщених 1,4-бензодіазепін-2-онів у воді.

Таблиця 1
Хімічна структура похідних 3-заміщених 1,4-бензодіазепін-2-онів

№	Шифр	Mm	Структура
1	МХ-2011	407.70	
2	МХ-2004	373.25	
3	МХ-1775	375.22	
4	МХ-1925	419.31	

Афінність дії 3-заміщених 1,4-бензодіазепін-2-онів на брадикінін-індуковане скорочення передбачає відсутність впливу на інші системи регуляції гладеньком'язового скорочення, насамперед потенціал- і карбахолін-індуковане. Для перевірки цієї гіпотези використали 80 мМ гіперкалієвий розчин і 10 мкМ розчин карбахоліну. Кінцева концентрація 3-заміщених 1,4-бензодіазепін-2-онів становила 10^{-6} М. Для оцінювання використано дві послідовні стимуляції: перша – у звичайному розчині Кребса, друга – на фоні додавання аліквоти досліджуваної речовини (кінцева концентрація 10^{-6} М).

Аналіз механокінетичних параметрів скорочення гладеньких м'язів проводили методом Burdyga and Kosterin (1991) із розрахунком максимальної нормованої швидкості скорочення та розслаблення. Статистичну обробку даних проводили за допомогою пакетів програм Statistica 8.0 та OriginLab 8.0. Результати перевіряли на нормальність розподілу за допомогою тесту Шапіро – Вілка. Розрахунок різниці між контрольними та дослідними значеннями проводили за допомогою ANOVA (Шеффе-тест) для незалежних вибірок. Якщо дані не відповідали закону нормального розподілу, порівняння незалежних вибірок проводили за критерієм Краскела – Уолліса. Різницю між вибірками вважали достовірною за $P < 0,05$.

Результати

Ефективність визначали шляхом розрахунку різниці між брадикінін-індукованими скороченнями за присутності та відсутності відповідних інгібіторів. Нульовим показником виступають значення брадикінін-індукованого скорочення за відсутності блокаторів (рис. 1, 2). Присутність у розчині Gd^{3+} у кіль-

кості 300 мкМ забезпечує зниження максимальної нормованої швидкості скорочення на 23,1%, що вибрано контролем. Відносно цього значення здійснювали порівняння дії дослідних сполук. Присутність в інкубаційному розчині МХ-1775 додатково знижує V_n скорочення на 21,2%, МХ-1925 – на 31,0%. Статистично достовірних змін не виявлено для МХ-2004 та МХ-2011 (рис. 1А). Отриманий ефект можливий внаслідок двох процесів: здатності речовин взаємодіяти з B_2-рецептором або мати додаткові мішені, залучені до ланцюга трансдукції сигналу. Варто зазначити, що попередньо ці сполуки виявляли схожість дії з конкурентним інгібітором B_2-рецепторів – des-Arg9-брадикінін ацетатом, сприяючи зростанню V_n скорочення у міру збільшення концентрації брадикініну в діапазоні 10^{-10}–10^{-6} М.

Максимальна нормована швидкість розслаблення за присутності Gd^{3+} зростає на 7,4% (рис. 1Б). Статистично достовірних відхилень від цього показника для МХ-1775 та МХ-2004 не спостерігали. Показник зростає відносно контролю на 11,6% за присутності МХ-1925 та на 34,6% – МХ-2011 (рис. 1Б). Зміни цього показника вказують на тривалість підтримання високого рівня іонів кальцію в цитоплазмі клітин і ефективності роботи кальцієвих помп.

Присутність у розчині верапамілу забезпечує зниження V_n брадикінін-індукованого скорочення на 49,3%. Для МХ-1775, МХ-2004 та МХ-1925 статистично достовірні відхилення від цього показника відсутні. МХ-2011 виявляє додаткове інгібування на 20,5% (рис. 2А).

Максимальна нормована швидкість розслаблення за таких умов для МХ-1775, МХ-2004 та МХ-1925 перебуває в межах нульового значення, тобто показників брадикінін-індукованого скорочення за відсутності модифікаторів. МХ-2011 сприяє зниженню показника на 9,9% відносно контролю. Отже, ми спостерігаємо відновлення початкових показників брадикінін-індукованого скорочення за присутності 3-заміщених 1,4-бензодіазепін-2-онів.

Використання 2-аміноетилдифенілборіату як інгібітора TRP-каналів і рецепторів IP3 дозволяє виключити одну з останніх ланок трансдукції сигналу брадикінінових рецепторів: взаємодії вивільненого фосфоліпазою С інозитол-1,4,5-трифосфату з відповідними рецепторами саркоплазматичного ретикулуму, тим самим заблокувавши вихід Ca^{2+} із внутрішньоклітинних депо. На фоні цього перевірили вплив досліджуваних сполук на максимальну нормовану швидкість скорочення та розслаблення (рис. 3). Ефект повністю відсутній для V_n розслаблення вибраних сполук на фоні зменшення показника за дії 2-аміноетилдифенілборіату на 9,4% (рис. 3Б). V_n скорочення за таких умов також не піддається змінам для МХ-2011, МХ-2004, МХ-1925 відносно контрольного показника 44,5%. Сполука МХ-1775 дозволяє додатково знизити параметр на 7,5% (рис. 3А).

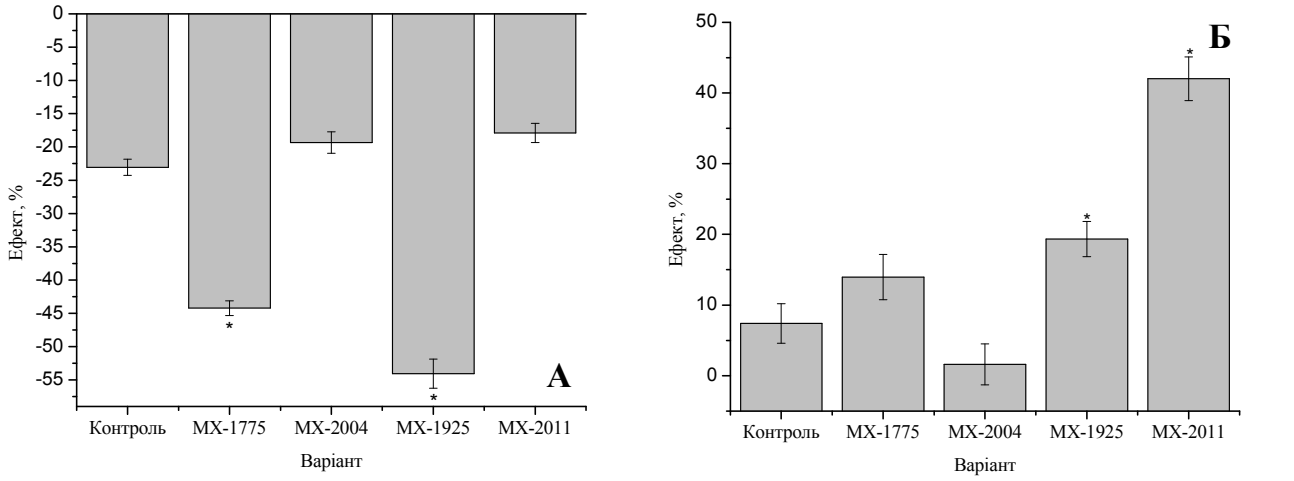


Рис. 1. Вплив 3-заміщених 1,4-бензодіазепін-2-онів на максимальну нормовану швидкість скорочення (*А*) та розслаблення (*Б*) за присутності Gd^{3+} (300 мкМ): «0» – V_n брадикінін-індукованого скорочення, контроль – за присутності Gd^{3+}; M ± m, n = 10, * – P < 0,05

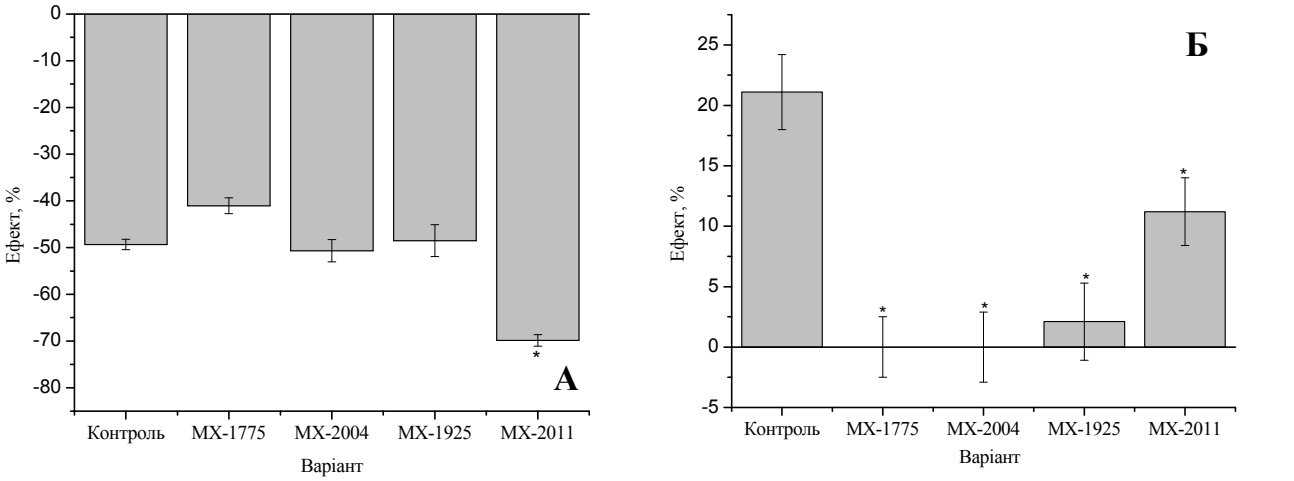


Рис. 2. Вплив 3-заміщених 1,4-бензодіазепін-2-онів на максимальну нормовану швидкість скорочення (*А*) та розслаблення (*Б*) за присутності верапамілу (1 мкМ): «0» – V_n брадикінін-індукованого скорочення, контроль – за присутності верепамілу; M ± m, n = 10, * – P < 0,05

Дослідження впливу 3-заміщених 1,4-бензодіазепін-2-онів на потенціал-індуковане скорочення не виявили статистично достовірних змін максимальної нормованої швидкості скорочення та розслаблення (рис. 4). Можна припустити, що вибрані сполуки не здатні взаємодіяти з потенціал-чутливими каналами мембрани, залученими до активації скоротливого процесу. Аналогічні дослідження проведено для карбахолін-індукованого скорочення. Ацетилхолін – один з основних нейромедіаторів контролю перистальтики шлунково-кишкового тракту з боку нервової системи. Порушення нормального функціону-

вання однієї з ланок шляху, що залучений до цього процесу, спричинює важкі патології. Перевірка взаємодії досліджуваних сполук із холінергічною системою контролю функціонування гладеньких м'язів кишечника стає важливим етапом тестування.

Вибрані 3-заміщені 1,4-бензодіазепін-2-они статистично достовірно не змінюють максимальної нормованої швидкості скорочення та розслаблення карбахолін-індукованого скорочення (рис. 5).

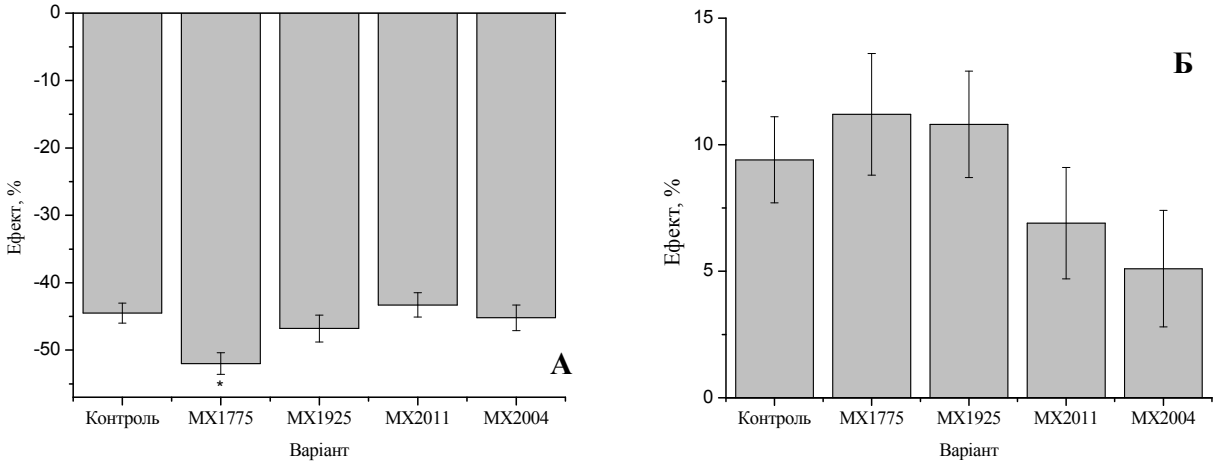


Рис. 3. Вплив 3-заміщених 1,4-бензодіазепін-2-онів на максимальну нормовану швидкість скорочення (*А*) та розслаблення (*Б*) за присутності 2-аміноетилдифенілборіат (0,1 мкМ): «0» – V_n брадикінін-індукованого скорочення, контроль – за присутності 2-аміноетилдифенілборіату; M ± m, n = 10, * – P < 0,05

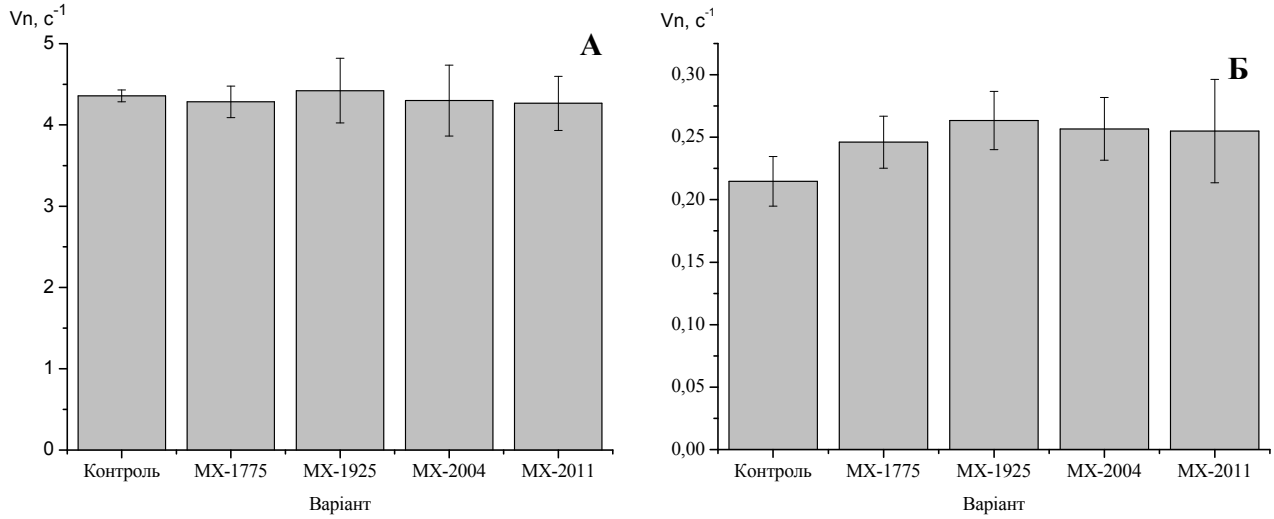


Рис. 4. Вплив 3-заміщених 1,4-бензодіазепін-2-онів на максимальну нормовану швидкість потенціал-індукованого скорочення (*А*) та розслаблення (*Б*): M ± m, n = 10, * – P < 0,05

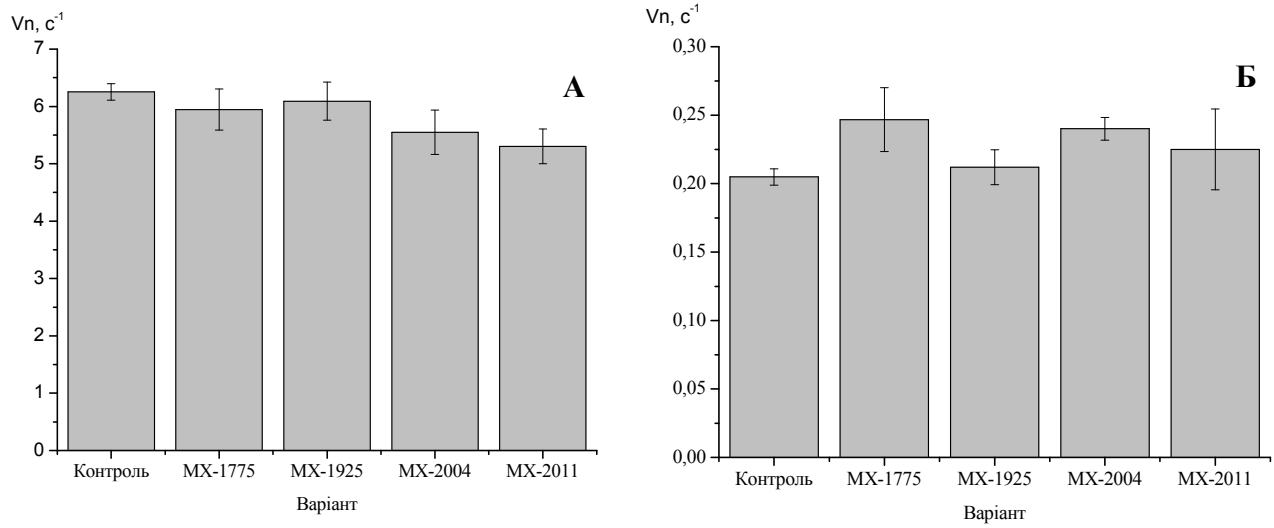


Рис. 5. Вплив 3-заміщених 1,4-бензодіазепін-2-онів на максимальну нормовану швидкість карбахолін-індукованого скорочення (*А*) та розслаблення (*Б*): M ± m, n = 10, * – P < 0,05

Обговорення

Сполуки на основі бензодіазепінів являють широкий спектр речовин, які впливають на різні біохімічні процеси. Забезпечується це особливостями просторової структури, яка формує аналог β-згину біологічно активних пептидів. За рахунок хімічної модифікації основного ядра молекули вдається досягти необхідних характеристик розчинності та стійкості отриманої структури до дії тканинних оксидаз та естераз. Але метаболізм має відбуватися досить швидко, для уникнення накопичення та створення токсичного ефекту. Процес здійснюється у три стадії: гідроксилювання, деметилювання та глюуронізація (Persona et al., 2015). Реакції біотрансформації, в яких такі похідні 1,4-бензодіазепінів як діазепам, нордіазепам (нордазепам) і темазепам виводяться з організму у вигляді оксазепаму або оксазепам глюкоуроніду належать до найвідоміших. Також за наркотичного сп'яніння або передозування у сечі найчастіше знаходять цей метаболіт (Persona et al., 2015).

Класично 3-заміщені 1,4-бензодіазепіни використовуються для модифікації активності GABA-рецепторів, але з часом з'явились повідомлення про їх застосування як блокаторів інших типів рецепторів, біохімічних процесів і протипаразитарних засобів. Периферичні бензодіазепінові рецептори беруть участь у захисті клітин від кисневих радикалів. Використання агоністів цих рецепторів, наприклад Ro5-4864, дозволяє активувати їх та знизити таким чином негативний вплив вільних радикалів на серцевий м'яз (Jaiswal et al., 2010).

Останні дослідження фармакологічних особливостей похідних бензодіазепінів виявили здатність селективно інгібувати лізиндезацетилазу людини. Біологічно активні сполуки ефективно знижували активність ізоформ ензиму 1, 3 та 6 за наномолярних кількостей, і мікромолярних для ізоформи 8 (Reddy et al., 2017).

За останні два десятиліття похідні бензодіазепінів застосовують для боротьби із запальними процесами тканин. Основні їх мішені представлені кініновими рецепторами двох класів B_1 та B_2. Важливо розуміти їх взаємозв'язок: перший тип – індуковані кінінові рецептори, що експресуються у відповідь на пошкодження тканини, активацію рецепторів B_2, продукцію запальних цитокінів та інших прозапальних медіаторів; рецептори B_2 конститутивно присутні у більшості тканин організму, за активації відбувається їх швидка десенситизація та поступова заміна на тип B_1. Такий процес відбувається протягом 5–6 годин (Zhang et al., 2015; Prado et al., 2002).

Досліджені нами сполуки мають структуру класичних аналгетичних засобів: гідрофобне ядро та гідрофільні периферичні радикали. Властивості молекули дозволяють їй проникати через мембрану та взаємодіяти з мішенями як у самій мембрані, так і всередині клітини.

Попередньо проведені дослідження активності сполук МХ-2011, МХ-2004, МХ-1775 та МХ-1925 виявили їх інгібувальну дію на брадикінін-індуковане скорочення. Ми припустили, що вони здатні змінювати активність кінінових рецепторів, та використали низку інгібіторів, що вимикали окремі ланки ланцюга трансдукції. Попередньо ідентифіковано речовину МХ-1775, яка виявляла активність, схожу до конкурентного інгібітора рецепторів B_2 – des-Arg9-брадикінін ацетату за некумулятивного збільшення концентрації брадикініну як активатора скорочення, але всі сполуки здатні знижувати V_n скорочення. Використання блокаторів різних ланок трансдукції сигналу від рецепторів дозволяє виявити сполуки, які взаємодіють із рецептором або ланцюгом передачі сигналу. Причому слабкі взаємодії не сприятимуть додатковим змінам V_n, а сполуки, які виявлятимуть спрямовану активність за присутності різних блокаторів, стають потенційними кандидатами на роль антагоністів рецепторів B_2. Для речовини МХ-1775 визначено таку поведінку, що виявляється у додатковому зниженні V_n скорочення за присутності іонів Gd^{3+} та 2-аміноетилдифенілборіату, а також схожості до des-Arg9-брадикінін ацетату. Додаткове зниження максимальної нормованої швидкості скорочення на 31,2% за присутності іонів Gd^{3+} виявлено для МХ-1925, але за додавання інших блокаторів ефект зникає. Ми припускаємо слабкі взаємодії цієї сполуки із шляхом трансдукції сигналу від кінінових рецепторів. Також МХ-1925 володіє високою загальною анальгетичною активністю, яку попередньо визначали за допомогою методу «оцтовокислих кущів».

Для пошуку інгібіторів важливо враховувати їх дію на інші шляхи активації скорочення гладеньких м'язів. Проведені нами дослідження впливу 3-заміщених 1,4-бензодіазепін-2-онів на потенціал- і карбахолін-індуковані скорочення гладеньких м'язів шлунка щурів не виявили змін максимальної нормованої швидкості скорочення та розслаблення. Можна припустити, що сполуки не впливають на потенціал-чутливі канали мембрани міоцитів і адренергічну регуляцію скорочення. Ці результати важливі для розроблення інгібіторів кінінових рецепторів і анальгетичних засобів комплексної дії.

Висновки

Дослідження дії 3-заміщених 1,4-бензодіазепін-2-онів на брадикінін-індуковане скорочення гладеньких м'язів за присутності іонів гадолінію дозволило ідентифікувати сполуки МХ-1775 та МХ-1925, які додатково знижують V_n скорочення на 21,2% і 31,0%, відповідно. При цьому МХ-1925 здатна збільшувати V_n розслаблення на 11,6%. Подібний ефект характерний для МХ-2011, де спостерігається зростання V_n на 34,6%. За присутності верапамілу ця сполука додатково інгібує V_n скорочення на 20,5%. Усі обрані речовини, крім МХ-2011, здатні відновлювати V_n розслаблення до початкових значень брадикінін-індукованих скорочень. За присутності 2-аміноетилдифенілборіату сполука МХ-1775 додатково знижує V_n скорочення на 7,5%. Не виявлено впливу досліджуваних 3-заміщених 1,4-бензодіазепін-2-онів на потенціал- і карбахолін-індуковане скорочення. Виходячи з попередніх досліджень і отриманих результатів, МХ-1775 – потенційний блокатор кінінових рецепторів B_2. Ефекти, отримані для інших сполук, потребують подальших досліджень.

References

Alves, F., Oliva, M., & Miranda, A. (2015). Conformational and biological properties of *Bauhinia bauhinioides* kallikrein inhibitor fragments with bradykinin-like activities. Journal of Peptide Science, 21(6), 495–500.

Baron, R., Binder, A., & Wasner, G. (2010). Neuropathic pain: Diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment. The Lancet Neurology, 9(8), 807–819.

Bencze, M., Behuliak, M., Vavřínová, A., & Zicha, J. (2015). Broad-range TRP channel inhibitors (2-APB, flufenamic acid, SKF-96365) affect differently contraction of resistance and conduit femoral arteries of rat. European Journal of Pharmacology, 765(15), 533–540.

Bergson, P., Lipkind, G., Lee, S., Duban, M., & Hanck, D. (2011). Verapamil block of T-type calcium channels. Molecular Pharmacology, 79(3), 411–419.

Bon, R., & Beech, D. (2013). In pursuit of small molecule chemistry for calcium-permeable non-selective TRPC channels – mirage or pot of gold? British Journal of Pharmacology, 170(3), 459–474.

Burdyga, T., & Kosterin, S. (1991). Kinetic analysis of smooth muscle relaxation. General Physiology and Biophysics, 10, 589–598.

Calixto, J., & Medeiros, Y. (1992). Bradykinin-induced biphasic response in the rat isolated stomach fundus: Functional evidence for a novel bradykinin receptor. Life Sciences, 50(7), PL47-PL52.

Chan, S., & Rudd, J. (2006). Role of bradykinin B_2 receptors in the modulation of the peristaltic reflex of the guinea pig isolated ileum. European Journal of Pharmacology, 539, 108–115.

Choi, S., Park, D. Y., Yeum, C. H., Chang, I. Y., You, H. J., Park, C. G., Kim, M. Y., Kong, I. D., So, I., Kim, K. W., & Jun, J. Y. (2006). Bradykinin modulates pacemaker currents through bradykinin B_2 receptors in cultured interstitial cells of Cajal from the murine small intestine. British Journal of Pharmacology, 148(7), 918–926.

Dziadulewicz, E., Brown, M., Dunstan, A., Lee, W., Said, N., & Garratt, P. (1999). The design of non-peptide human bradykinin B_2 receptor antagonists employing the benzodiazepine peptidomimetic scaffold. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 9(3), 463–468.

Fattori, D., Rossi, C., Fincham, C. I., Caciagli, V., Catrambone, F., D'Andrea, P., Felicetti, P., Gensini, M., Marastoni, E., Nannicini, R., Paris, M., Terracciano, R., Bressan, A., Giuliani, S., Maggi, C. A., Meini, S., Valenti, C., & Quartara, L. (2007). Design and synthesis of novel sulfonamide-containing bradykinin hB_2 receptor antagonists. 2. Synthesis and structure-activity relationships of alpha,alpha-cycloalkylglycine sulfonamides. Journal of Medicinal Chemistry, 50(3), 550–565.

Gierthmuhlen, J., Binder, A., & Baron, R. (2014). Mechanism-based treatment in complex regional pain syndromes. Nature Reviews Neurology, 10(9), 518–528.

Hall, J. (1997). Bradykinin receptors. General Pharmacology: The Vascular System, 28(1), 1-6.

Jaiswal, A., Kumar, S., Enjamoori, R., Seth, S., Dinda, A., & Maulik, S. (2010). Peripheral benzodiazepine receptor ligand Ro5-4864 inhibits isoprenaline-induced cardiac hypertrophy in rats. European Journal of Pharmacology 644, 146–153.

Kam, Y., Ro, J., Kim, H., & Choo, H. (2005). Antagonistic effects of novel non-peptide chlorobenzhydryl piperazine compounds on contractile response to bradykinin in the guinea-pig ileum. European Journal of Pharmacology, 523, 143–150.

Ludwig, J., & Baron, R. (2004). Complex regional pain syndrome: An inflammatory pain condition? Drug Discovery Today: Disease Mechanisms, 4(1), 449–455.

Malasics, A., Boda, D., Valiskó, M., Henderson, D., & Gillespie, D. (2010). Simulations of calcium channel block by trivalent cations: Gd^{3+} competes with permeant ions for the selectivity filter. Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes, 1798(11), 2013–2021.

Marcon, R., Claudino, R., Dutra, R., Bento, A., Schmidt, E., Bouzon, Z., Sordi, R., Morais, R., Pesquero, J., & Calixto, J. (2013). Exacerbation of DSS-induced colitis in mice lacking kinin B1 receptors through compensatory up-regulation of kinin B_2 receptors: The role of tight junctions and intestinal homeostasis. British Journal of Pharmacology, 168(2), 389–402.

Meini, S., Cucchi, P., Bellucci, F., Catalani, C., Giuliani, S., Santicioli, P., & Maggi, C. (2007). Comparative antagonist pharmacology at the native mouse bradykinin B_2 receptor: Radioligand binding and smooth muscle contractility studies. British Journal of Pharmacology, 150(3), 313–320.

Persona, K., Madej, K., Knihnicki, P., & Piekoszewski, W. (2015). Analytical methodologies for the determination of benzodiazepines in biological samples. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 239(10), 239–264.

Prado, G., Taylor, L., Zhou, X., Ricupero, D., Mierke, D., & Polgar, P. (2002). Mechanisms regulating the expression, self-maintenance, and signaling-function of the bradykinin B_2 and B_1 receptors. Journal of Cellular Physiology, 193, 275–286.

Reddy, D., Ballante, F., Zhou, N., & Marshall, G. (2017). Design and synthesis of benzodiazepine analogs as isoform-selective human lysine deacetylase inhibitors. European Journal of Medicinal Chemistry, 127, 531–553.

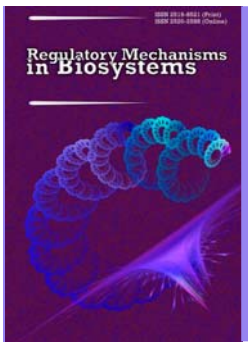
Seidlmayer, L., Kuhn, J., Berbner, A., Arias-Loza, P. A., Williams, T., Kaspar, M., Czolbe, M., Kwong, J. Q., Molkentin, J. D., Heinze, K. G., Dedkova, E. N., & Ritter, O. (2016). Inositol 1,4,5-trisphosphate-mediated sarcoplasmic reticulum-mitochondrial crosstalk influences adenosine triphosphate production via mitochondrial Ca^{2+} uptake through the mitochondrial ryanodine receptor in cardiac myocytes. Cardiovascular Research, 112(1), 491–501.

Stadnicki, A. (2011). Intestinal tissue kallikrein–kinin system in inflammatory Bowel disease. Inflammatory Bowel Diseases, 17(2), 645–654.

Virych, P., Sheljuk, O., Kabanova, T., Halimova, O., Martynjuk, V., Pavlovs'kyj, V., & Andronati, S. (2017). Vplyv 2-arylamino-1,2-dygidro-3N-1,4-benzdiazenip-2-ioniv na bradykinin-indukovane skorochennja gladen'kyh m'jaziv. Regulatory Mechanism in Biosystems, 8(1), 30–35 (in Ukrainian).

Virych, P., Shelyuk, O., Kabanova, T., Khalimova, E., Martynyuk, V., Pavlovsky, I., & Andronati, S. (2017). Effect of 3-substituted 1,4-benzodiazepin-2-ones on bradykinin-induced smooth muscle contraction. Ukrainian Biochemical Journal, 89(1), 31–37.

Zhang, X., Brovkovych, V., Zhang, Y., Tan, F., & Skidgel, R. (2015). Downregulation of kinin B_1 receptor function by B_2 receptor heterodimerization and signaling. Cell Signalling, 27(1), 90–103.



Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(2), 231–238
doi: 10.15421/021736

The interaction between lipid exchange and thyroid status in the conditions of prolonged influence of small doses of radiation

V. L. Sokolenko, S. V. Sokolenko

Bohdan Khmelnytsky Cherkasy National University, Chercasy, Ukraine

Article info

Received 29.04.2017
Received in revised form 14.05.2017
Accepted 15.05.2017

Bohdan Khmelnytsky Cherkasy National University, Shevchenko Str., 81, Chercasy, 18031, Ukraine. Tel.: +38-067-869-17-91. E-mail: sokolenko@ukr.net

Sokolenko, V. L., & Sokolenko, S. V. (2017). The interaction between lipid exchange and thyroid status in the conditions of prolonged influence of small doses of radiation. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(2), 231–238. doi:10.15421/021736

We studied the interaction between the indicators of lipid exchange and thyroid status among the inhabitants of radiation contaminated territories under additional psycho-emotional load. We observed 170 students aged between 18–24 and divided them into a control group of students who were from areas unaffected by radiation (70 people) and the main experimental group of students from territories of increased radio-ecological load (IV radiation zone, 100 people). We determined the content of thyrotropic hormone (TTH), triiodothyronine (T_3), thyroxin (T_4), total cholesterin (TC), triglycerides (TG), cholesterin of lipoproteins of high density (Ch-LPHD) and cholesterin of lipoproteins of low density (Ch-LPLD). We found that people who had lived since birth in territories which were contaminated with radionuclides and were affected by prolonged influence of small doses of ionizing radiation had significant fluctuations of indicators of concentrations of TTH, T_3 and T_4, forming manifestations of hypothyroidism and hyperthyrosis among some of those tested. Independently from hyperthyrosis, the effect was accompanied by growth in the level of TH, TG, Ch-LPHD and Ch-LPLD. Persons with manifestations of hypothyroidism had the content of TH above the upper limit of the homeostatic norm and the level of Ch-LPLD was higher than the norm in sub-groups with features of hypo- and hyperthyrosis. All those tested from the main group showed a significant positive correlation connection between the level of TTH and levels of TH and Ch-LPLD. The subgroup with manifestations of hyperthyrosis had a positive correlation between the levels of TTH and TG, the subgroups with manifestations of euthyroidism and hyperthyrosis had a negative correlation between the levels of TTH and Ch-LPHD. The hyperthyrosis subgroup had a significant positive correlation connection between T_3 and TH and Ch-LPLD. The euthyroidism and hypothyroidism subgroups had a significant negative correlation between T_3 concentration and Ch-LPLD. The cortisol indicator positively correlated with levels of TH and Ch-LPLD in all subgroups divided according to thyroid status. In the conditions of additional psycho-emotional load (examinations), those tested had an increased level of TP (higher than the norm in the subgroups of hyperthyrosis and hypothyroidism) caused by the increase in cortisol level and a tendency of decrease in TTH. At the same time, the level of Ch-LPLD increased (higher than the upper norm) as a result of decrease in the content of Ch-LPHL. The coefficient of correlation between the level of TTH and levels of TH and Ch-LPLD lost statistical significance in all subgroups divided according to thyroid status. In the hyperthyrosis subgroup, the effect of loss of correlation with TH and Ch-LPLD was also observed for T_3. Thus, the individuals tested from territories polluted by radionuclides, had proaterogenic changes dependant on thyroid status,which can become a precondition for the development of metabolic syndrome. The risk of dyslipidemia increases in the conditions of additional psycho-emotional load, when the regulatory effect of the thyroid gland's hormones is reduced.

Keywords: ChNPP; IV zone; fractions of cholesterol; hormones of thyroid gland; emotional stress

Взаємозв'язок ліпідного обміну та тиреоїдного статусу за пролонгованого впливу малих доз радіації

В. Л. Соколенко, С. В. Соколенко

Черкаський національний університет імені Богдана Хмельницького, Черкаси, Україна

Охарактеризовано взаємозв'язок між окремими показниками ліпідного обміну та тиреоїдного статусу осіб віком 18–24 роки, які тривалий час проживали на територіях, забруднених радіонуклідами внаслідок аварії на ЧАЕС, і зазнали пролонгованого впливу малих доз іонізуючого випромінювання. Обстежених поділено на три групи: еутиреозу, гіпертиреозу, гіпотиреозу. Виявлено варіювання рівня загального холестерину та холестерину ліпопротеїнів низької щільності залежно від тиреоїдного статусу, з можливим виходом за межі гомеостатичної норми. В усіх обстежених із дослідної групи наявний підвищений вміст загального холестерину (ЗХ), тригліцеридів (ТГ), холестерину ліпопротеїнів високої щільності (Хс-ЛПВЩ) та холестерину ліпопротеїнів низької щільності (Хс-ЛПНЩ). За стресу на фоні

зростання рівня кортизолу рівень ЗХ демонстрував тенденцію до підвищення, рівень Хс-ЛПНЩ достовірно зростав, Хс-ЛПВЩ – знижувався. Виявлено достовірні кореляційні зв'язки між аналізованими показниками, зокрема, позитивні між ТТГ і ЗХ, ТТГ і Хс-ЛПНЩ, які нівелювалися за додаткового емоційного стресу. З'ясовано наявність в осіб із радіаційно забруднених територій проатерогенних змін ліпідного профілю, залежних від тиреоїдного статусу, найбільше виражених за додаткового психоемоційного навантаження, коли знижується регуляторний ефект гормонів щитоподібної залози.

Ключові слова: ЧАЕС; IV зона; фракції холестерину; гормони щитоподібної залози; емоційний стрес

Вступ

Населення територій, забруднених радіонуклідами внаслідок аварії на ЧАЕС, продовжує зазнавати пролонгованого впливу малих доз іонізуючого випромінювання. Вважають, що щоденне споживання продуктів харчування, вирощених у зоні посиленого радіоекологічного контролю, залишається основним джерелом внутрішнього радіаційного опромінення, у першу чергу цезієм-137 (^{137}Cs). Хоча наслідки тривалого внутрішнього накопичення радіонуклідів досліджені поверхово, є дані про порушення у такому випадку обміну ліпідів, зокрема, метаболізму холестерину (Racine et al., 2009). Порушення ліпідного профілю та нейроендокринні форми ожиріння, зумовлені особливостями ендокринної регуляції під час пубертатного періоду, вважають вагомими причинами зростання частоти захворювань різної етіології в мешканців радіаційно забруднених територій (Korenev et al., 2009).

Одна з найуразливіших через чорнобильську катастрофу – тиреоїдна система, що пояснюється її істотним опроміненням ^{131}I (Popovych et al., 2003). Незважаючи на тривалий час, що минув із тих пір, ризик розвитку патологій щитоподібної залози визнається досить високим як науковцями, так і медичними працівниками. Досвід Фукусіми підтвердив: навіть за малих доз опромінення зростає рівень тривожності населення щодо раку щитоподібної залози. Це вимагає постійного скринінгу груп ризику (Cardis and Hatch, 2011; Takamura et al., 2016; John et al., 2017; Rumiantsev et al., 2017).

Найвища частка раку щитоподібної залози спостерігається серед ліквідаторів, які працювали в аварійній зоні у квітні – травні 1986 року (Rahu et al., 2013). Серед цивільного населення збільшення захворюваності на рак щитоподібної залози зареєстроване у дітей, які проживали у безпосередній близькості від зони інциденту. Особливу групу ризику склали особи, яким на час аварії було менше 5 років, що свідчить про високу уразливість даної вікової групи до радіаційного опромінення. Останні дані вказують на можливість віддалених тиреоїдних патологій, як наслідок тривалого низькодозового опромінення за відсутності прямого впливу радіоактивного йоду (Abou-El-Ardat et al., 2012; Fushiki, 2013; Takamura et al., 2016). Часто вони поєднуються зі станом підвищеної тривожності – типової ознаки наявності стресової ситуації (Contis and Foley, 2015).

Для багатьох населених пунктів України, забруднених радіонуклідами внаслідок аварії на ЧАЕС, не проведено оцінки величини накопиченого ^{131}I. Пряма сучасна дозиметрія такого накопичення неможлива через короткий період розпаду радіонукліда. Проте математичні моделі, розроблені на основі вимірювань 1986 року, дають можливість теоретично розрахувати показник на основі нинішніх даних про забруднення території ^{129}I та ^{137}Cs. Виявлено досить значну кореляцію між накопиченням радіоактивного йоду та цезію – головного фактора забруднення територій із тривалим періодом розпаду (Michel et al., 2015).

Тиреоїдні гормони, регулюючи експресію метаболічних генів, чинять вагомий вплив на ліпідний обмін, особливо на катаболізм ліпідів (Mustafina et al., 2010; Sinha et al., 2014). Вони знижують рівень холестерину у плазмі крові та підвищують експресію рецепторів до ліпопротеїнів низької щільності (ЛПНЩ-Р) у печінці, цей ефект опосередковується рецептором до тиреоїдних гормонів (TRβ). Селективні модулятори TRβ-рецепторів також беруть участь у зворотному транспорті холестерину та можуть знизити рівень холестерину в сироватці крові, незалежно від рецепторів до ліпопротеїнів низької щільності, за рахунок збільшення синтезу жовчних кислот у печінці (Kannisto et al., 2014; Lindemann et al., 2014). Вагому роль у зв'язку ліпідного обміну та тиреоїдного статусу відіграють певні хімічні елементи, зокрема, магній і залізо (Moncayo and Moncayo, 2017). Клінічні стани, пов'язані з дисрегуляцією метаболізму ліпідів у печінці, зокрема, неалкогольні жирові хвороби печінки та цукровий діабет II типу, можуть зумовлюватися змінами внутрішньоклітинної дії тиреоїдних гормонів, особливо за вираженого гіпотиреозу (Sinha et al., 2014; van den Berg et al., 2016). Ліпідний статус жінок із гіперплазією щитоподібної залози найбільшою мірою детермінується саме тиреоїдним статусом (Beyhan et al., 2006).

Для лікування дисліпідемій використовують селективні агоністи рецепторів гормона щитоподібної залози (Taub et al., 2013). Перинатальний гіпотиреоз впливає на нейростероїдогенез у головному мозку (Chang et al., 2012). Відомі випадки впливу ліпідного обміну на тиреоїдний статус (van Tienhoven-Wind, 2015). Підвищений рівень тригліцеридів у сироватці крові – фактор ризику раку щитоподібної залози (Radišauskas et al., 2016). Поширеність аутоімунних захворювань щитоподібної залози та гіпотиреозу досить висока серед осіб з ожирінням (Agbaht et al., 2014).

Дисфункції щитоподібної залози навіть в еутиреоїдному діапазоні зумовлюють низку проблем зі здоров'ям, включаючи розвиток атеросклерозу; це біохімічний маркер підвищеного ризику серцево-судинних порушень (van den Berg et al., 2016). Проатерогенні зміни ліпідного спектра відмічені вже за субклінічного гіпотиреозу, який виявляється нині у 5–15% загальної людської популяції та асоціюється з підвищенням смертності від кардіоваскулярних захворювань (Beyhan et al., 2006; Barter et al., 2007; Mustafina et al., 2010; Benetti-Pinto et al., 2013). Серед факторів, що беруть участь у регуляції ліпідного обміну за субклінічного гіпотиреозу (зокрема, за рахунок зміни продукції ТТГ), вказують вік, стать, расу, спосіб життя (Duntas and Brenta, 2012).

Субклінічний гіпотиреоз асоціюється з підвищеним ризиком розвитку ішемічної хвороби серця та інфаркту міокарда, особливо у пацієнтів із підвищеним рівнем ТТГ (Badawy and Ghonium, 2013). Поєднання дисліпідемій із тиреоїдними дисфункціями можуть стати причинами серцево-судинних ускладнень у пацієнтів, які перебувають на гемодіалізі (Shoji et al., 2015). Важлива проблема – неможливість установлення критичних значень тиреоїдних дисфункцій, за яких виникають дисліпідемії та супутні серцево-судинні патології (Terán and Calle, 2012). Для серцево-судинної системи небезпечні як субклінічний гіпотиреоз, пов'язаний із підвищеним ризиком розвитку атеросклерозу та інфаркту міокарда, так і субклінічний тиреотоксикоз, що корелює із «серцевою» смертністю (Garasto et al., 2017).

Збільшення індексу вісцерального ожиріння супроводжується не лише несприятливими кількісними змінами ліпідного спектра сироватки крові, а й концентрації кортикостероїдів (Kushnarova et al., 2016). Ефект посилюється за тривалого хронічного стресу, що викликає дисліпідемію, гіпотиреоїдизм, зниження загального обміну, накопичення абдомінального жиру, посилення катаболізму білків (Davis et al., 2008). Кортизолемія – визнаний антитиреоїдний і атерогенний фактор (Bul'ba et al., 2006). У свою чергу, метаболічні порушення, зокрема, гіперхолестеринемію, вважають можливими причинами формування депресивних станів, особливо у жінок (Rhee et al., 2014). Ожиріння та зміни ліпідного профілю на тлі гіпотиреозу поширені серед осіб із біполярними розладами (Ezzaher et al., 2011).

Хронічне нервово-психічне навантаження та вплив несприятливих екологічних, виробничих, соціальних факторів,

які викликають гормонально-метаболічні зміни, спрямовані на підвищення енергоутворення з метою забезпечення пристосувальних процесів, можуть зумовити формування метаболічного синдрому (Beckham et al., 2003). Типовий приклад – гіперхолестеринемія та гіперкортизолемія на фоні зниженої концентрації трийодтироніну у воїнів-інтернаціоналістів та ліквідаторів наслідків аварії на ЧАЕС віком від 40 років (Balaeva-Tikhomirova, 2014). Серед синів ліквідаторів наслідків аварії на ЧАЕС характерні зміни рівня ліпопротеїнів найбільше виражені в осіб із нейроендокринним ожирінням, поширеність якого серед цієї когорти у декілька разів перевищує показники в популяції (Korenev et al., 2009). Як наслідок, в осіб, які тривалий час проживали на територіях, забруднених радіонуклідами, спостерігається зростання частоти атеросклерозу та інших серцево-судинних порушень (Bruno et al., 2013).

Взаємодія ліпідного та тиреоїдних показників за емоційного стресу досить детально вивчена на лабораторних тваринах (Zhigulina, 2015). Дослідження зв'язку між ліпідним обміном і тиреоїдним статусом мешканців радіаційно забруднених районів стосуються в основному дітей або осіб похилого віку, чи пацієнтів із вираженими патологіями, тому вимагають подальшого аналізу.

Мета статті – з'ясувати особливості взаємозв'язку між основними показниками ліпідного обміну та тиреоїдного статусу в мешканців радіаційно забруднених територій за відсутності та наявності додаткового психоемоційного навантаження.

Матеріал і методи досліджень

Обстежено 170 осіб, серед яких виділили групу мешканців радіаційно незабруднених районів (контрольна група, 70 осіб) і мешканців територій посиленого радіоекологічного контролю (IV радіаційна зона, щільність забруднення ґрунтів ізотопами ^{137}Cs $3{,}7\cdot10^4$ – $18{,}5\cdot10^4$ Бк/м^2, 100 осіб). Усі обстежені – студенти Черкаського національного університету віком 18–24 роки, які на час обстеження не мали гострих захворювань. Між показниками волонтерів різних статей (осіб жіночої статі обстежували у фолікулярну стадію менструального циклу) не спостерігали статистично вірогідної різниці, тому надалі їх розглядали як єдину сукупність.

Роль додаткового стресового фактора, що зумовив розвиток психоемоційного навантаження, відіграла зимова екзаменаційна сесія. В обстежених вранці (до вживання їжі) відбирали 15 мл венозної крові. Перший аналіз показників проводили в міжсесійний період, другий – після першого іспиту.

Вміст кортизолу у сироватці крові визначали імуноферментним методом із використанням набору «BIO-RAD» (Росія). Вміст тиреотропного гормона (ТТГ) визначали за допомогою тест-набору РІА-ТТГ (Immunotech, Чехія). Вміст тироксину (T_4) у сироватці крові досліджували за допомогою тест-набору ріо-т4-іПр, трийодтироніну (T_3) – ріо-т3-іПр (Інститут біоорганічної хімії Національної академії наук Республіки Білорусь). Рівень загального холестерину (ЗХ), тригліцеридів (ТГ), холестерину ліпопротеїнів високої щільності (Хс-ЛПВЩ) визначали методом Лібермана – Бурхарда. Вміст холестерину ліпопротеїнів низької щільності (Хс-ЛПНЩ) визначали за формулою Фрідвальда: Хс-ЛПНЩ = ЗХ – (Хс-ЛПВЩ + ТГ/2,2) (Zak, 1980).

У межах дослідної групи виділили підгрупу еутиреозу (31 особа), підгрупи з ознаками гіпертиреозу (48 осіб) та гіпотиреозу (21 особа). Діагноз про наявність синдрому ВСД ставили лікарі студентського санаторію-профілакторію «Едем» при університеті.

Статистичну обробку результатів проводили методами варіаційної статистики. Дані наведені у вигляді: середнє арифметичне ± похибка середнього арифметичного (M ± m). Достовірність різниці між показниками визначали за t-критерієм Стьюдента, попередньо перевіривши вибірки на нормальність розподілу. Кореляційний аналіз проводили з використанням коефіцієнта кореляції Пірсона.

Результати

В обстежених контрольної групи більшість показників перебувала в межах гомеостатичної норми (Zak, 1980), показники ліпідного профілю зміщені до нижньої межі норми, що могло зумовлюватися особливостями харчування студентів (табл.).

В осіб, які зазнали пролонгованого впливу малих доз іонізуючого випромінювання, спостерігали значне варіювання показників концентрації ТТГ, T_3 та T_4 у периферичній крові. Проте серед них досить чітко виділили підгрупу еутиреозу, а також підгрупи з ознаками гіпертиреозу та гіпотиреозу. Поділ робили за вмістом трийодтироніну, чия біологічна ефективність вища, ніж у T_4 (Klein, 2004).

За відсутності додаткового психоемоційного навантаження в обстежених із підгрупи еутиреозу рівень T_3 і T_4 статистично не відрізнявся від контрольних значень. В осіб з ознаками гіпертиреозу показники достовірно вищі контролю, з ознаками гіпотиреозу – нижчий вміст T_3. Концентрація ТТГ в обстежених з ознаками гіпотиреозу та гіпертиреозу вища контролю (табл.).

За результатами медичного анамнезу серед обстежених відсутні особи з клінічними проявами патології щитоподібної залози. Проте у 17 осіб з ознаками гіпотиреозу (81% від обстежених у підгрупі), 26 осіб з ознаками гіпертиреозу (54% від обстежених у підгрупі) та 7 із підгрупи еутиреозу (23% від обстежених у підгрупі) спостерігалися ознаки синдрому вегето-судинної дистонії.

В усіх обстежених із територій посиленого радіоекологічного контролю, незалежно від тиреоїдного статусу, рівень загального холестерину, тригліцеридів, холестерину ліпопротеїнів високої та низької щільності вищий, ніж у контролі. В осіб з ознаками гіпотиреозу тенденція до зростання рівнів загального холестерину та холестерину ліпопротеїнів низької щільності виражена найбільше, і показники достовірно вищі, порівняно з отриманими для підгрупи еутиреозу (табл.). У цій підгрупі вміст холестерину перевищив верхню межу гомеостатичної норми, вказаної в літературі (Zak, 1980). Рівень Хс-ЛПНЩ вийшов за верхню межу норми у підгрупах з ознаками гіпо- та гіпертиреозу.

Кореляційний аналіз показав, що у мешканців територій, забруднених радіонуклідами, незалежно від тиреоїдного статусу, спостерігається достовірний позитивний зв'язок між рівнем ТТГ і рівнями ЗХ та Хс-ЛПНЩ. Також виявлено позитивну кореляцію між рівнями ТТГ і тригліцеридів у підгрупі з ознаками гіпертиреозу; негативну кореляцію – між рівнями ТТГ і Хс-ЛПВЩ у підгрупах з ознаками еутиреозу та гіпертиреозу (рис. 1–3).

Рівні T_4 і T_3 демонстрували негативну кореляцію з рівнем загального холестерину, тригліцеридів, Хс-ЛПВЩ у підгрупах еутиреозу та гіпотиреозу, проте вона не мала статистичної значущості. У підгрупі гіпертиреозу для трийодтироніну виявлено достовірний позитивний кореляційний зв'язок із рівнем загального холестерину та Хс-ЛПНЩ. У підгрупах еутиреозу та гіпотиреозу – достовірна негативна кореляція концентрації T_3 із рівнем Хс-ЛПНЩ (рис. 1–3).

В осіб із дослідної групи навіть за відсутності додаткових стресових чинників спостерігали достовірне підвищення рівня кортизолу порівняно з контролем. Показник позитивно корелював із рівнями ЗХ та Хс-ЛПНЩ у всіх підгрупах (рис. 1–3), негативно – із рівнем Хс-ЛПВЩ у підгрупі гіпертиреозу (рис. 2). Під час екзаменаційної сесії як фактора психоемоційного навантаження для студентів рівень кортизолу достовірно зростав порівняно з міжсесійним періодом і в контрольній, і в дослідних групі (табл.).

У студентів, які приїхали на навчання з територій, забруднених радіонуклідами, стрес-індукований ефект зростання концентрації кортизолу проявлявся незалежно від тиреоїдного статусу. Паралельно спостерігали тенденцію до зниження вмісту ТТГ, в осіб з ознаками гіпертиреозу достовірно знизився вміст T_3, T_4 залишився без змін. В осіб із підгрупи еутиреозу T_3 демонстрував тенденцію до зниження, з підгрупи гіпотиреозу –

істотні коливання показника відсутні (табл.). Рівень загального холестерину демонстрував тенденцію до зростання в усіх трьох підгрупах (у підгрупах гіпертиреозу та гіпотиреозу вийшов за верхню межу норми, за еутиреозу досяг цієї межі), при цьому достовірно підвищувався рівень холестерину ліпоротеїнів низької щільності (з виходом за верхню межу норми) на фоні зниження вмісту холестерину ліпопротеїнів високої щільності. Тригліцериди демонстрували лише тенденцію до зростання, у підгрупі гіпотиреозу показник став вищим порівняно з підгрупою еутиреозу (табл.).

Таблиця

Показники вмісту кортизолу, ліпідного обміну та тиреоїдного статусу в обстежених
(до емоційного стресу – верхній рядок, під час емоційного стресу – нижній рядок, M ± m)

Показники	Контроль, n = 70	Дослідна група: особи, які зазнали пролонгованого впливу малих доз радіації, n = 100		
		еутиреоз, n = 31	гіпертиреоз, n = 48	гіпотиреоз, n = 21
Кортизол, нмоль/л	349,0 ± 9,86 691,2 ± 12,13**	629,5 ± 18,01* 881,1 ± 15,21*,**	633,8 ± 19,01* 890,1 ± 18,65*,**	624,9 ± 17,36* 877,4 ± 20,01*,**
Загальний холестерин (ЗХ), ммоль/л	3,05 ± 0,265 3,29 ± 0,315	4,75 ± 0,489* 5,99 ± 0,725*	5,84 ± 0,710* 7,05 ± 0,584*	7,13 ± 0,810*, # 7,48 ± 0,518*
Тригліцериди (ТГ), ммоль/л	0,52 ± 0,063 0,55 ± 0,072	0,81 ± 0,071* 0,96 ± 0,059*	0,91 ± 0,072* 1,09 ± 0,061*	1,01 ± 0,081* 1,16 ± 0,074*, #
Холестерин ліпопротеїнів високої щільності (Хс-ЛПВЩ), ммоль/л	1,05 ± 0,065 0,97 ± 0,085	1,63 ± 0,081* 1,13 ± 0,071**	1,50 ± 0,071* 0,95 ± 0,069**	1,44 ± 0,079* 0,91 ± 0,075**, #
Холестерин ліпопротеїнів низької щільності (Хс-ЛПНЩ), ммоль/л	1,81 ± 0,114 2,05 ± 0,134	2,81 ± 0,317* 4,39 ± 0,389*,**	3,94 ± 0,499* 5,62 ± 0,245*,**, #	5,22 ± 0,256*, # 6,05 ± 0,199*,**, #
Тиреотропний гормон (ТТГ), мкОД./мл	2,31 ± 0,212 2,32 ± 0,351	3,05 ± 0,416 2,44 ± 0,275	3,67 ± 0,245* 2,74 ± 0,458	3,74 ± 0,210* 2,81 ± 0,490
Трийодтиронін (T_3), нмоль/л	1,54 ± 0,056 1,41 ± 0,061	1,56 ± 0,045 1,45 ± 0,044	2,59 ± 0,068*, # 1,71 ± 0,069*,**, #	0,75 ± 0,031*, # 0,73 ± 0,045*, #
Тироксин (T_4), нмоль/л	81,6 ± 5,73 76,8 ± 9,13	96,0 ± 6,43 94,3 ± 7,12	127,3 ± 6,25*, # 121,0 ± 8,49*, #	78,2 ± 8,31# 77,1 ± 5,39#4

Примітки: * – P < 0,05 порівняно з контролем; ** – P < 0,05 порівняно з показником до психоемоційного навантаження; # – P < 0,05 порівняно з показником у підгрупі еутиреозу.

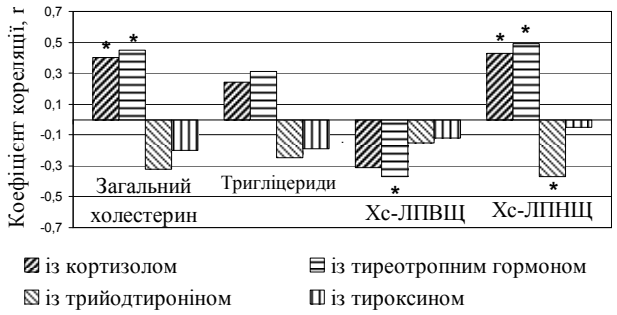


Рис. 1. Кореляційна залежність між аналізованими показниками ліпідного обміну та ендокринного статусу у підгрупі еутиреозу, до емоційного стресу:
* – достовірність коефіцієнту кореляції P < 0,05

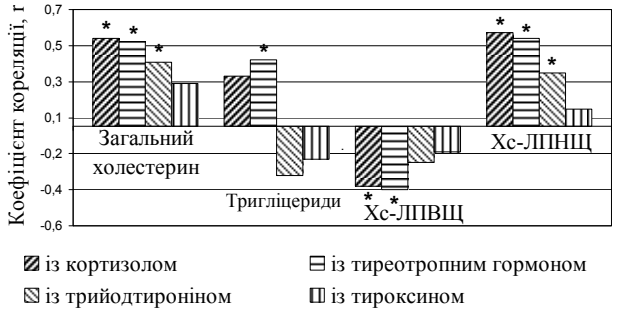


Рис. 2. Кореляційна залежність між аналізованими показниками ліпідного обміну та ендокринного статусу у підгрупі гіпертиреозу, до емоційного стресу: див. рис. 1

В усіх підгрупах, поділених за тиреоїдним статусом, коефіцієнт кореляції між рівнем ТТГ і рівнями загального холестерину та Хс-ЛПНЩ втратив статистичну достовірність (рис. 4–6). У підгрупі гіпертиреозу ефект втрати кореляції із загальним холестерином та Хс-ЛПНЩ відмічено також для трийодтироніну (рис. 5). Спостерігали негативну кореляцію T_3 із Хс-ЛПНЩ у підгрупах гіпертиреозу (зі зміною знака кореляції порівняно з дострессовим періодом) та гіпотиреозу. В осіб з ознаками гіпотиреозу негативну кореляцію з кортизолом демонстрував Хс-ЛПВЩ (рис. 6); позитивна кореляція з кортизолом збереглася для ЗХ і ЛПНЩ у всіх трьох підгрупах, поділених за тиреоїдним статусом (рис. 4–6).

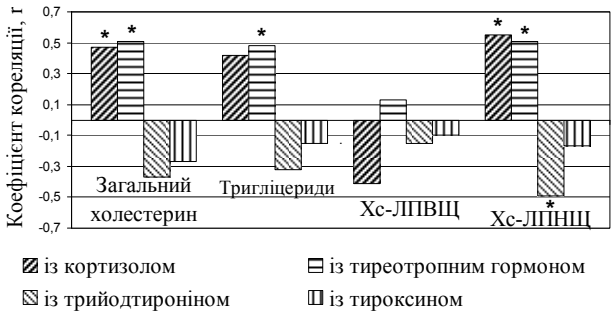


Рис. 3. Кореляційна залежність між аналізованими показниками ліпідного обміну та ендокринного статусу у підгрупі гіпотиреозу, до емоційного стресу: див. рис. 1

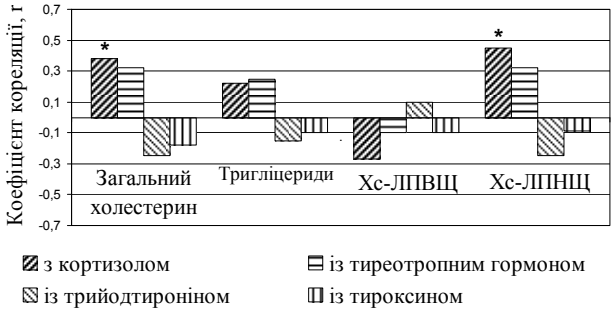


Рис. 4. Кореляційна залежність між аналізованими показниками ліпідного обміну та ендокринного статусу у підгрупі еутиреозу під час емоційного стресу; див. рис. 1

Обговорення

У практично здорових осіб і пацієнтів, які перебувають у стані стійкої ремісії, складно аналізувати взаємопов'язані зміни показників ендокринної регуляції та метаболізму, оскільки

коливання в межах норми рівнів гормонів і метаболітів досить значні. Можливим шляхом вирішення даної проблеми вважають дослідження гормонально-метаболічних взаємовідносин в осіб, які зазнавали тривалого впливу факторів, що вимагали мобілізації регуляторних систем (Balaeva-Tikhomirova, 2014). До таких факторів належить, зокрема, пролонговане опромінення малими дозами радіації.

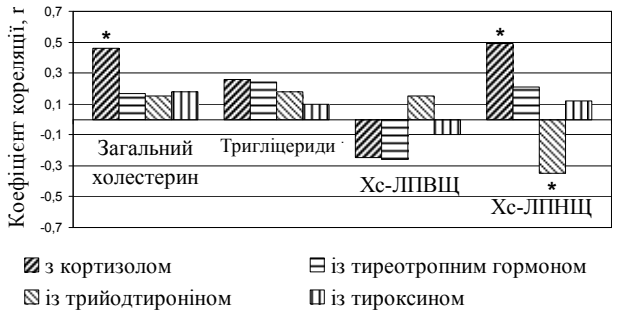


Рис. 5. Кореляційна залежність між аналізованими показниками ліпідного обміну та ендокринного статусу у підгрупі гіпертиреозу під час емоційного стресу: див. рис. 1

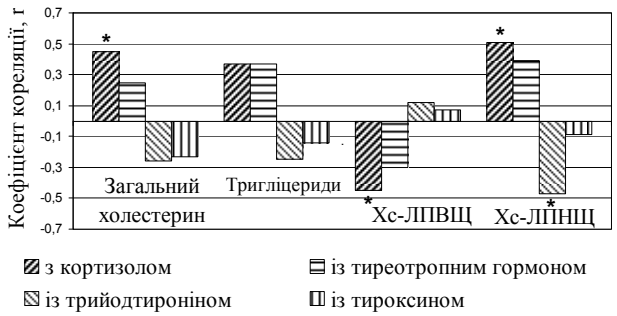


Рис. 6. Кореляційна залежність між аналізованими показниками ліпідного обміну та ендокринного статусу у підгрупі гіпотиреозу під час емоційного стресу: див. рис. 1

Аналіз результатів досліджень показав, що у мешканців території посиленого радіоекологічного контролю спостерігали певне напруження тиреоїдного статусу, що характеризувалося підвищеною концентрацією ТТГ в осіб із досить високим вмістом T_3 у периферичній крові. Ефект супроводжувався підвищенням рівня загального холестерину, тригліцеридів, холестерину ліпопротеїнів високої та низької щільності, причому в осіб з ознаками гіпотиреозу тенденція до зростання рівнів загального холестерину та холестерину ліпопротеїнів низької щільності проявлялася найбільше (табл.).

Отримані дані узгоджуються з повідомленнями про те, що пацієнти з вираженим гіпотиреозом мають значно вищий рівень загального холестерину, ніж із еутиреозом, із субклінічним – зміни менш відчутні (Shavdatuashvili, 2005). Підвищення рівня загального холестерину у сироватці крові за гіпотиреозу логічне. Тиреоїдині гормони стимулюють утилізацію жирів, мобілізацію тригліцеридів із жирової тканини, активують печінкову ліпазу та ефір-холестерин-трансформувальний білок, рівень якого підвищений за тиреотоксикозу та знижений за гіпотиреозу (Dedecjus et al., 2003; Duntas, 2003). Тиреоїдні дисфункції, зокрема, виражений або субклінічний гіпотиреоз, здатні змінити ліпідний профіль і сприяти розвитку серцево-судинних захворювань. Гіперхолестеринемія за гіпотиреозу зумовлюється зниженням експресії рецепторів до холестерину ліпопротеїнів низької щільності та зменшенням контролю з боку T_3 над білком, що контролює обмін стеринів в організмі людини (SREBP-2), який має вирішальне значення для експресії рецепторів до ЛПНЩ. Дія гормонів щитоподібної залози на жовчні кислоти останнім часом розглядається як істотний гіпохолестеринемічний фактор. Високі титри тиреотропного гормона асоціюються з проатерогенними змінами ліпідного профілю (Duntas and Brenta, 2012). Як наслідок, такі зміни спостерігають у переважної більшості пацієнтів із гіпотиреозом і характеризують наявністю значної позитивної кореляції між концентраціями ТТГ і загального холестерину (Iqbal et al., 2006; Mustafina et al., 2010). Вважають, що ефект зумовлюється уповільненням швидкості метаболізму ліпідів на фоні активації їх синтезу (Abrams and Grundy, 1981). Таким чином, виявлене нами зростання рівня холестерину та Хс-ЛПНЩ з ознаками гіпертиреозу можна пояснити нетиповим підвищенням в обстежених рівня ТТГ як важливого проатерогенного фактора. Дані літератури підтверджують, що підвищення рівня холестерину – зазвичай супутній фактор підвищення рівня ТТГ (Pirich et al., 2000).

В обстежених нами мешканців територій, забруднених радіонуклідами, достовірний позитивний коефіцієнт кореляції між рівнем ТТГ і рівнями загального холестерину, холестерину ЛПНЩ характерний для всіх трьох груп, поділених за тиреоїдним статусом; між рівнями ТТГ і тригліцеридів – для групи з ознаками гіпертиреозу (рис. 1–3).

Епідеміологічні дані свідчать, що рівень ТТГ тісно корелює зі ступенем тяжкості гіперхолестеринемії. Проте молекулярний механізм участі гіперхолестеринемії у розвитку субклінічного гіпотиреозу з'ясований не остаточно. Вважають, що ефект зумовлений процесами, залученими до зворотного транспорту холестерину, який, у свою чергу, відіграє важливу роль у регуляції рівня холестерину. В експериментах на тваринах показано, що ТТГ може стимулювати печінкові АТФ-зв'язувальні касетні транспортери, що забезпечують передачу внутрішньоклітинного холестерину у плазму крові (Zhang et al., 2016).

У літературі зустрічаються дані, відмінні від отриманих нами. Атерогенні порушення ліпідного профілю в індійського населення із субклінічним гіпотиреозом спостерігали лише у випадку зростання концентрації ТТГ понад 10,0 мМО/л і характеризували підвищенням рівня загального холестерину та холестерину ЛПНЩ. В осіб із ТТГ меншим за 10,0 мМО/л його рівень позитивно корелював із вмістом T_3 і T_4, негативно – із рівнем загального холестерину та холестерину ЛПНЩ (Marwaha et al., 2011). Такі особливості можуть зумовлюватися віком, статтю, расою, способом життя (Duntas and Brenta, 2012).

Як указувалося вище, в обстежених із дослідної групи, незалежно від тиреоїдного статусу, спостерігали достовірне підвищення, порівняно з контролем, рівня тригліцеридів (ТГ), холестерину ліпопротеїнів високої (Хс-ЛПВЩ) та низької (Хс-ЛПВЩ) щільності (табл.). Зростання вмісту тригліцеридів у сироватці крові класифікують як проатерогенні зміни ліпопротеїнового профілю (Duntas and Brenta, 2012). Таке явище, поряд зі зниженням рівня антиатерогенної фракції холестерину (ЛПВЩ), асоціюється з порушенням енергетичного та ліпідного гомеостазу в організмі та підвищеним ризиком серцево-судинних ускладнень. Підвищення рівня ТГ може відображати уповільнення поглинання та засвоєння клітинами жирних кислот (Kushnarova et al., 2016).

Тригліцериди – основний ліпідний компонент ліпопротеїнів наднизької щільності, що містить мало холестерину; саме вони – провідний транспортер холестерину з печінки у кров. Ліпопротеїни низької щільності – транспортна форма холестерину та ненасичених жирних кислот від печінки до органів і тканин. ЛПНЩ малорозчинні та схильні до формування атеросклеротичних бляшок у судинах, що зумовлено підвищеною здатністю втрачати холестерин під час транспортування. Значна частина ЛПНЩ захоплюється печінкою та іншими периферичними клітинами шляхом рецептор-опосередкованого ендоцитозу. Ліпопротеїни високої щільності здійснюють зворотний транспорт холестерину у печінку. Це високомолекулярна легкорозчинна форма, яка не випадає в осад. Відповідно, ЛПВЩ відіграють протекторну роль щодо відкладення ліпідів у атеросклерозних бляшках (Prasad et al., 2012; Kaur, 2014; Kushnarova et al., 2016).

Виявлене нами підвищення рівня холестерину ліпопротеїнів високої щільності в дослідній групі можна розглядати як

компенсаторну реакцію на збільшення проатерогенних фракцій холестерину. Протекторну функцію цієї фракції підтверджує негативна кореляція між рівнями ТТГ та Хс-ЛПВЩ у групах з ознаками еутиреозу та гіпертиреозу (рис. 1, 2).

Виразність порушень ліпідного обміну не лише прямо пропорційна рівню тиреотропного гормона, а й обернено пропорційна рівню тироксину. Низький рівень вільного T_4 асоціюється з проявами метаболічного синдрому, ожирінням, рівень ТТГ детермінується інверсійно рівнем T_4 більшою мірою, ніж рівнем T_3 (Bul'ba et al., 2006; Mustafina et al., 2010).

У наших дослідженнях відсутні виражені зв'язки тироксину з показниками ліпідного профілю. Для трийодтироніну виявлено достовірний позитивний кореляційний зв'язок із рівнем загального холестерину та Хс-ЛПНЩ у підгрупі гіпертиреозу, що не можна вважати типовим ефектом. У підгрупах еутиреозу та гіпотиреозу достовірна кореляція концентрації T_3 із рівнем Хс-ЛПНЩ негативна (рис. 1–3). Згідно з даними літератури, T_3 стимулює різні метаболічні шляхи та печінкові функції переважно через β-рецептори до гормона щитоподібної залози (TRβ). Тиреоїдні гормони пов'язані із секреторними фосфоліпазами, які, у свою чергу, беруть участь у процесах запалення, гіперліпідемії та атеросклерозу. T_3, знижуючи синтез фосфоліпази, обмежує розвиток гіперліпідемії та запальних процесів (Sharma et al., 2014).

Як повідомлялося в наших попередніх дослідженнях, найвищий рівень загального холестерину у дослідній групі спостерігався для осіб з ознаками синдрому вегето-судинної дистонії (Sokolenko, 2016). Синдром відмічено у 81% обстежених із групи гіпотиреозу, 54% із групи гіпертиреозу, 23% із групи еутиреозу. Тобто дисбаланс рівня тиреоїдних гормонів у мешканців територій, забруднених радіонуклідами, стає фактором розвитку не лише змін метаболізму ліпідів, а й вегето-судинних дисфункцій.

Гіперліпідемія вважається істотним чинником ризику серцево-судинної патології, тому гіпотиреоз опосередковано сприяє її розвитку. Для пацієнтів з ішемічною хворобою серця досить характерне підвищення загального рівня холестерину на фоні клінічного гіпотиреозу (Beyhan et al., 2006). Можлива причина – тривалий субклінічний гіпотиреоз (синдром еутиреоїдної слабкості), порушення ліпідного обміну, що спричинює прогресування атеросклерозу та підвищенню загального периферичного судинного опору, здатного погіршити перебіг артеріальної гіпертонії (Nikolaev et al., 2012). Субклінічні випадки дисфункцій щитоподібної залози, що характеризуються нормальним рівнем тироксину (T_4), але зміненим рівнем тиреотропного гормона (ТТГ), також вважають фактором ризику серцево-судинних і метаболічних захворювань. Подібний ефект може проявлятися не лише за зростання, а й під час наближення рівня ТТГ до нижньої межі норми (в межах нормального діапазону) (Laclaustra et al., 2015). Показано позитивну кореляцію між рівнями сироваткових T_4 і холестерину ліпопротеїнів низької щільності, сироваткового ТТГ і холестерину ліпопротеїнів високої щільності, значні негативні кореляції між рівнями сироваткового ТТГ і тригліцеридів в еутиреоїдних осіб із серцево-судинними хворобами (Takeuchi, 2015).

У нашому випадку синдром вегето-судинної дистонії спостерігався у багатьох осіб з ознаками гіпертиреозу. Такий наслідок міг зумовлюватися тим, що у даній групі вміст загального холестерину та холестерину ліпопротеїнів низької щільності, як і за гіпотиреозу, достовірно вищий контролю (табл.). Крім того, в реалізацію ефекту міг включатися фактор радіаційного впливу, зокрема, радіаційно індуковані зміни реакцій ліпідного обміну та порушення автономної нервової регуляції (Janssen et al., 2005; Baker et al., 2011).

Пролонговане радіаційне опромінювання варто розглядати як хронічний стресовий фактор (Tronko et al., 1996). Його наслідок – часто неадекватна адаптація, яка полягає у виділенні значної кількості кортизолу на фоні зниження вмісту антистресових гормонів. При цьому виникає низка руйнівних метаболічних процесів, проявами яких можуть бути виявлені нами ефекти (Davis et al., 2008).

Справді, у дослідній групі відмічено достовірне підвищення рівня кортизолу порівняно з контролем за відсутності дії додаткових стресових факторів (табл.). Кортизол збільшує активність ліпопротеїнліпази, сприяючи зростанню рівня Хс-ЛПНЩ. Одночасно він знижує утворення рецепторів до Хс-ЛПНЩ, гальмуючи їх поглинання клітинами та елімінацію холестерину з кровотоку (у тому числі у печінку), підвищує активність ліпази, що вивільняє жирні кислоти з депонованих тригліцеридів. Виявлено залежність між хронічним емоційним або психосоціальним стресом і атеросклерозом коронарних артерій; компоненти метаболічного синдрому (ожиріння, гіпертонія, дисліпідемія) проявляються за хронічного психологічного стресу, депресії, низького соціально-економічного статусу. У багатьох випадках важко говорити про первинність чи вторинність взаємодій кортикоїдних гормонів та ліпідного обміну (Brotman et al., 2007; Engelking, 2010; Toth et al., 2014).

За останні роки значно розширилися уявлення про стрес як розгалужену системну реакцію організму, яка, за певних умов, може спричинювати порушення функцій багатьох фізіологічних систем, зокрема, серцево-судинної, нервової; дисфункції ендокринної системи на рівні продукції катехоламінів, гормонів щитоподібної, статевих залоз. Ранні життєві психічні травми у підлітків супроводжуються зниженням рівня трийодтироніну (Machado et al., 2015). Гострий стрес у людей характеризується активацією ліполізу, переважаючими енергосубстратами виступають ліпіди. Хронічний емоційний стрес викликає зростання рівня холестерину на фоні активації секреції катехоламінів, у результаті чого посилюється мобілізація жирової тканини з утворенням вільних жирних кислот, що надходять у кров (Zhigulina, 2015). В осіб, які зазнали гострого стресу, рівень Хс-ЛПНЩ вищий, ніж за помірного стресу (O'Connor et al., 2009). За депресивних розладів, які тривали не менше трьох років, спостерігали підвищення рівня тригліцеридів і нижчі рівні Хс-ЛПВЩ, ТТГ і T_4 порівняно з даними для пацієнтів із депресивним синдромом, тривалістю менше трьох років. При цьому відмічено значний позитивний зв'язок ТТГ із рівнем загального холестерину та холестерину ЛПНЩ, рівні T_4 і T_3 негативно корелювали з рівнем загального холестерину, холестеринами ЛПВЩ і ЛПНЩ. Сироваткові рівні тригліцеридів і ТТГ залежали від тривалості депресивних симптомів (Peng and Li, 2017). Під час критичних захворювань, що загрожують життю, зростання рівня кортизолу супроводжувалося зниженням концентрації T_3 і підвищенням рівня ТТГ і T_4 (Vermes and Beishuizen, 2007).

Дані, отримані під час екзаменаційної сесії як фактора додаткового психоемоційного навантаження, значною мірою узгоджуються з оприлюдненими в літературі: зростання рівня кортизолу, незалежно від тиреоїдного статусу, вихід Хс-ЛПНЩ за верхню межу норми. Рівень загального холестерину, хоч і не зазнав достовірних змін, сягав вищої межі норми за еутиреозу та перевищив норму в осіб з ознаками гіпотиреозу та гіпертиреозу (табл.). Відсутність достовірної динаміки вмісту загального холестерину в умовах психоемоційного навантаження може зумовлюватися відсутністю вірогідних змін ТТГ і тироксину. Інша можлива причина такого ефекту – достовірне зростання рівня Хс-ЛПНЩ компенсувалося зниженням Хс-ЛПВЩ.

Втрата достовірності коефіцієнтом кореляції між рівнем ЗХ і ТТГ, в умовах психоемоційного навантаження, та зміна знаку коефіцієнта між T_3 і ЛПНЩ у групі гіпертиреозу свідчать про нівелювання значення ТТГ і тиреоїдних гормонів у реалізації ліпідного обміну. З одного боку, це можна пояснити значним зростанням рівня кортизолу та його пріоритетом у виявлених реакціях, що підтверджувалося стабільним позитивним коефіцієнтом кореляції між концентрацією кортизолу та рівнями загального холестерину та холестерину ліпопротеїнів низької щільності (рис. 4–6). З іншого, підвищений рівень ЗХ та Хс-ЛПНЩ у групі гіпертиреозу може свідчити про дис-

функції на рівні тиреоїдних рецепторів, які посилюються за додаткового емоційного стресу.

Нетипова відповідь на стрес імовірна за певних генетичних особливостей індивідів чи за впливу окремих факторів середовища. За тривалої чи кількаразової (із постійним нарощуванням інтенсивності стресора) стресової дії можливий розвиток метаболічних дисфункцій (Mathe, 2000).

Виявлені нами в мешканців радіаційно забруднених територій особливості ліпідного профілю справді мали типові ознаки метаболічного синдрому, описані в науковій літературі: дисліпідемія, що характеризується підвищенням рівня тригліцеридів і Хс-ЛПНЩ, зниженим рівнем Хс-ЛПВЩ. Ці аномалії вважають тісно пов'язаними з підвищеним окисним стресом і ендотеліальними дисфункціями (Barter et al., 2007; Prasad et al., 2012; Kaur, 2014). Ступінь прояву дисліпідемії та її зв'зку з тиреоїдними дисфункціями ще не дозволяє говорити про наявність в обстежених вираженої патології, проте може свідчити про вичерпування адаптаційних ресурсів систем підтримання гомеостазу та формування потенційних груп ризику. Слід враховувати, що порушення функції щитоподібної залози пов'язані з порушеннями ліпідного обміну патогенетично, оскільки відігріють ключову роль у ліпідному та ліпопротеїновому метаболізмі (Mustafina, 2010).

Висновки

В осіб, які тривалий час проживали на територіях, забруднених радіонуклідами внаслідок аварії на ЧАЕС, спостерігаються проатерогенні зміни, залежні від тиреоїдного статусу, що можуть стати передумовами розвитку метаболічного синдрому. Ризик виникнення дисліпідемій зростає в умовах додаткового психоемоційного навантаження, коли нівелюється регуляторний ефект гормонів щитоподібної залози. Хронічний вплив малих доз іонізуючого випромінювання зумовлює ризик порушення адаптаційних можливостей тиреоїдного статусу, що, у свою чергу, відображається на стані ліпідного обміну.

References

Abou-El-Ardat, K., Monsieurs, P., Anastasov, N., Atkinson, M., Derradji, H., De Meyer, T., Bekaert, S., Van Criekinge, W., & Baatout, S. (2012). Low dose irradiation of thyroid cells reveals a unique transcriptomic and epigenetic signature in RET/PTC-positive cells. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 731(1), 27–40.

Abrams, J. J., & Grundy, S. M. (1981). Cholesterol metabolism in hypothyroidism and hyperthyroidism in man. Journal of Lipid Research, 22(2), 323–338.

Agbaht, K., Mercan, Y., Kutlu, S., Alpdemir, M. F., & Sezgin, T. (2014). Obesity with and without metabolic syndrome: Do vitamin D and thyroid autoimmunity have a role? Diabetes Research and Clinical Practice, 106(1), 27–34.

Badawy, E. S., & Ghonium, S. M. (2013). Thyroid stimulating hormone as risk factor for coronary heart disease. Science Journal of Medicine and Clinical Trial, 2013, 1–4.

Baker, J. E., Moulder, J. E., & Hopewell, J. W. (2011). Radiation as a risk factor for cardiovascular disease. Antioxidants and Redox Signaling, 15(7), 1945–1956.

Balaeva-Tikhomirova, O. M. (2014). Otdalennye posledstvija stress-reakcii na dlitel'noe vozdejstvie hronicheskogo nervno-psihicheskogo naprjazhenija [Long-term effects of stress reaction on long-term exposure of chronic neuropsychological tension]. In: Specificheskie i nespecificheskie mehanizmy adaptacii vo vremja stressa i fizicheskoj nagruzki [Specific and non-specific mechanisms of adaptation during stress and physical load]. GomGMU, Gomel'. Pp. 3–5 (in Russian).

Barter, P., Gotto, A. M., LaRosa, J. C., Maroni, J., Szarek, M., Grundy, S. M., Kastelein, J. J., Bittner, V. & Fruchart, J. C. (2007). HDL cholesterol, very low levels of LDL cholesterol, and cardiovascular events. New England Journal of Medicine, 357(13), 1301–1310.

Beckham, J. C., Taft, C. T., Vrana, S. R., Feldman, M. E., Barefoot, J. C., Moore, S. D., Mozley, S. L., Butterfield, M. I., & Calhoun, P. S. (2003). Ambulatory monitoring and physical health report in Vietnam veterans with and without chronic posttraumatic stress disorder. Journal of Traumatic Stress, 16(4), 329–335.

Benetti-Pinto, C. L., Piccolo, V. R. S. B., Garmes, H. M., & Juliato, C. R. T. (2013). Subclinical hypothyroidism in young women with polycystic ovary syndrome: An analysis of clinical, hormonal, and metabolic parameters. Fertility and Sterility, 99(2), 588–592.

Beyhan, Z., Ertürk, K., Üçkaya, G., Bolu, E., Yaman, H., & Kutlu, M. (2006). Restoration of euthyroidism does not improve cardiovascular risk factors in patients with subclinical hypothyroidism in the short term. Journal of Endocrinological Investigation, 29(6), 505–510.

Brotman, D. J., Golden, S. H., & Wittstein, I. S. (2007). The cardiovascular toll of stress. The Lancet, 370(9592), 1089–1100.

Bruno, R. M., Sicari, R., Corciu, A. I., Bianchini, E., Faita, F., Di Stefano, R., Antonelli, A., Ghiadoni, L. & Picano, E. (2013). Non-cancer atherosclerotic effects associated with environmental and therapeutic radiation doses: The Chernobyl thyroid cancer children study. International Journal of Cardiology, 168(4), 4255–4257.

Bul'ba, Y., Barylyak, L. G., Huchko, B. Y. (2006). Vzayemozv'yazky mizh parametramy lipidnoho ta endokrynnoho statusiv u zhinok z hiperplaziyeyu shchytovydnoyi zalozy, kotri prybuvayut' na kurort Truskavets'. Povidomlennya 2: Dyskryminantnyy ta korelyatsiyno-rehresyvnyy analiz [The relationships between parameters of lipid and enocrine status in women with hyperplasia of thyroid glands. communication 2: The dyscriminant and correlative-regressive analyses]. Medychna Hidrolohiya ta Reabilitatsiya, 4(3), 45–64 (in Ukrainian).

Cardis, E., & Hatch, M. (2011). The Chernobyl accident – an epidemiological perspective. Clinical Oncology, 23(4), 251–260.

Chang, I. Y., Ohn, T., Ko, G. S., Yoon, Y., Kim, J. W., & Yoon, S. P. (2012). Immunolocalization of steroidogenic acute regulatory protein-related lipid transfer (START) domain-containing proteins in the developing cerebellum of normal and hypothyroid rats. Journal of chemical neuroanatomy, 43(1), 28–33.

Contis, G., & Foley Jr, T. P. (2015). Depression, suicide ideation, and thyroid tumors among Ukrainian adolescents exposed as children to Chernobyl radiation. Journal of clinical medicine research, 7(5), 332–338.

Davis, S. R., Shah, S. M., McKenzie, D. P., Kulkarni, J., Davison, S. L., & Bell, R. J. (2008). Dehydroepiandrosterone sulfate levels are associated with more favorable cognitive function in women. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 93(3), 801–808.

Dedecjus, M., Masson, D., Gautier, T., De Barros, J. P. P., Gambert, P., Lewinski, A., Adamczewski, Z., Moulin, P., & Lagrost, L. (2003). Low cholesteryl ester transfer protein (CETP) concentration but normal CETP activity in serum from patients with short-term hypothyroidism Lack of relationship to lipoprotein abnormalities. Clinical Endocrinology, 58(5), 581–588.

Duntas, L. H. (2003). Lipoprotein (a) and apolipoprotein (a) isoform size in thyroid disease: The quest for the golden fleece. Thyroid, 13, 345–346.

Duntas, L. H., & Brenta, G. (2012). The effect of thyroid disorders on lipid levels and metabolism. Medical Clinics of North America, 96(2), 269–281.

Engelking, L. R. (2010). Textbook of veterinary physiological chemistry. Academic Press.

Ezzaher, A., Mouhamed, D. H., Mechri, A., Neffati, F., Douki, W., Gaha, L., & Najjar, M. F. (2011). Thyroid function and lipid profile in bipolar I patients. Asian Journal of Psychiatry, 4(2), 139–143.

Fushiki, S. (2013). Radiation hazards in children–lessons from Chernobyl, Three Mile Island and Fukushima. Brain and Development, 35(3), 220–227.

Garasto, S., Montesanto, A., Corsonello, A., Lattanzio, F., Fusco, S., Passarino, G., Prestipino Giarritta, V. & Corica, F. (2017). Thyroid hormones in extreme longevity. Mechanisms of Ageing and Development.

Iqbal, A., Jorde, R., & Figenschau, Y. (2006). Serum lipid levels in relation to serum thyroid-stimulating hormone and the effect of thyroxine treatment on serum lipid levels in subjects with subclinical hypothyroidism: The Tromsø Study. Journal of Internal Medicine, 260(1), 53–61.

Janssen, I., Katzmarzyk, P. T., Srinivasan, S. R., Chen, W., Malina, R. M., Bouchard, C., & Berenson, G. S. (2005). Combined influence of body mass index and waist circumference on coronary artery disease risk factors among children and adolescents. Pediatrics, 115(6), 1623–1630.

John, D., Boice Jr. (2017). Chapter 3 – From Chernobyl to Fukushima and Beyond – A focus on thyroid cancer. Thyroid cancer and nuclear accidents. Long-term aftereffects of Chernobyl and Fukushima, 21–32.

Kannisto, K., Rehnmark, S., Slätis, K., Webb, P., Larsson, L., Gafvels, M., Eggertsen, G., & Parini, P. (2014). The thyroid receptor β modulator GC-1 reduces atherosclerosis in ApoE deficient mice. Atherosclerosis, 237(2), 544–554.

Kaur, J. (2014). A comprehensive review on metabolic syndrome. Cardiology research and practice, 2014, 943162.

Klein, J. R., & Wang, H. C. (2004). Characterization of a novel set of resident intrathyroidal bone marrow-derived hematopoietic cells: potential for immune-endocrine interactions in thyroid homeostasis. Journal of experimental biology, 207(1), 55–65.

Korenev, M. M., Plekhova, O. I., Kalmykova, N. V., Kashina, V. L., & Borisko, G. O. (2009). Osoblyvosti lipidnoho spektru krovi u nashchadkiv likvidatoriv avariyi na ChAES [Some features of blood

lipid spectrum in descendants of the liquidators Chernobyl disaster]. Sovremennaja Pediatrija, 25, 56–58 (in Ukrainian).

Kushnarova, N. M., Korpachev, V. V., Korpacheva-Zinych, A. V., Hurina, N. M., & Prybyla, A. V. (2016). Vidnoshennya kortyzol/DHEA ta pokaznyky lipidnoho profilyu syrovatky krovi khvorykh na tsukrovyy diabet 2 typu z riznym indeksom vistseral'noho ozhyrinnya [The correlation of cortisol/DHEA and parameters of lipid profile of blood serum of patients with diabetes II type, with a different index of visceral obesity]. ScienceRise Medical Science, 1(3), 19–25 (in Ukrainian).

Laclaustra, M., Hurtado-Roca, Y., Sendin, M., Leon, M., Ledesma, M., Andres, E., Fernandez-Ortiz, A., Guallar, E., Ordovas, J. M. & Casasnovas, J. A. (2015). Lower-normal TSH is associated with better metabolic risk factors: A cross-sectional study on Spanish men. Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases, 25(12), 1095–1103.

Lindemann, J. A. L., Angajala, A., Engler, D. A., Webb, P., & Ayers, S. D. (2014). Thyroid hormone induction of human cholesterol 7 alpha-hydroxylase (Cyp7a1) *in vitro*. Molecular and Cellular Endocrinology, 388(1), 32–40.

Machado, T. D., Salum, G. A., Bosa, V. L., Goldani, M. Z., Meaney, M. J., Agranonik, M., Manfro, G. G., & Silveira, P. P. (2015). Early life trauma is associated with decreased peripheral levels of thyroid-hormone T_3 in adolescents. International Journal of Developmental Neuroscience, 47, 304–308.

Marwaha, R. K., Tandon, N., Garg, M. K., Kanwar, R., Sastry, A., Narang, A., Arora, S., & Bhadra, K. (2011). Dyslipidemia in subclinical hypothyroidism in an Indian population. Clinical Biochemistry, 44(14), 1214–1217.

Mathe, G. (2000). The need of a physiologic and pathophysiologic defi nition of stress. Biomedicine and Pharmacotherapy, 54, 119–121.

Michel, R., Daraoui, A., Gorny, M., Jakob, D., Sachse, R., Romantschuk, L. D., Alfimov, V., & Synal, H. A. (2015). Retrospective dosimetry of Iodine-131 exposures using Iodine-129 and Caesium-137 inventories in soils – A critical evaluation of the consequences of the Chernobyl accident in parts of Northern Ukraine. Journal of Environmental Radioactivity, 150, 20–35.

Moncayo, R., & Moncayo, H. (2017). Applying a systems approach to thyroid physiology: Looking at the whole with a mitochondrial perspective instead of judging single TSH values or why we should know more about mitochondria to understand metabolism. BBA Clinical, 7, 127–140.

Mustafina, S. V., Rimar, O. D., Simonova, G. I., Ragino, Y. I., Kuznetsov, S. S., Scherbakova, L. V., & Malyutina, S. K. (2010). Funkcional'noe sostojanie shhitovidnoj zhelezy i lipidnyj profil' krovi [Functional state of thyroid gland and lipid blood profile]. Ateroskleroz, 6(2), 15–19 (in Russian).

Nikolaev, N. A., Kolbina, M. V., Livzan, N. A., Dolgikh, V. T., Sudakova, A. N. (2012). Tireoidnyj profil' u bol'nyh IBS i gipertonicheskoj bolezn'ju pri narushenijah ritma serdca [Thyroid profile in patients with CHD (coronal heart disease) and hypertension along with heart rhythm abnormalities]. Mezhdunarodnyj Zhurnal Jeksperimental'nogo Obrazovanija, 12, 108–109 (in Russian).

O'Connor, D. B., Hendrickx, H., Dadd, T., Elliman, T. D., Willis, T. A., Talbot, D., Mayes, A. E., Thethi, K., Powell, J., & Dye, L. (2009). Cortisol awakening rise in middle-aged women in relation to psychological stress. Psychoneuroendocrinology, 34(10), 1486–1494.

Peng, R., & Li, Y. (2017). Low serum thyroid-stimulating hormone levels are associated with lipid profile in depressive patients with long symptom duration. Journal of Affective Disorders, 217, 99–104.

Pirich, C., Müllner, M., & Sinzinger, H. (2000). Prevalence and relevance of thyroid dysfunction in 1922 cholesterol screening participants. Journal of Clinical Epidemiology, 53(6), 623–629.

Popovych, I. L., Fliunt, I. S., Alieksieiev, O. I., Baryliak, L. H., & Bilas, V. R. (2003). Sanogenetychni zasady reabilitacii' na kurorti Truskavec' urologichnyh hvoryh chornobyl's'kogo kontyngentu [Sanogenetic principles of rehabilitation of urological patients of Chornobyl contingent at Truskavets resort]. Komp'juterpres, Kyiv (in Ukrainian).

Prasad, H., Ryan, D. A., Celzo, M. F., & Stapleton, D. (2012). Metabolic syndrome: Definition and therapeutic implications. Postgraduate Medicine, 124(1), 21–30.

Racine, R., Grandcolas, L., Grison, S., Gourmelon, P., Gueguen, Y., Veyssiere, G., & Souidi, M. (2009). Molecular modifications of cholesterol metabolism in the liver and the brain after chronic contamination with cesium 137. Food and Chemical Toxicology, 47(7), 1642–1647.

Radišauskas, R., Kuzmickienė, I., Milinavičiene, E., & Everatt, R. (2016). Hypertension, serum lipids and cancer risk: A review of epidemiological evidence. Medicina, 52(2), 89–98.

Rahu, K., Hakulinen, T., Smailyte, G., Stengrevics, A., Auvinen, A., Inskip, P. D., Boice, J. D. Jr. & Rahu, M. (2013). Site-specific cancer risk in the Baltic cohort of Chernobyl cleanup workers, 1986–2007. European Journal of Cancer, 49(13), 2926–2933.

Rhee, S. J., Kim, E. Y., Kim, S. H., Lee, H. J., Kim, B., Ha, K., Yoon, D. H., & Ahn, Y. M. (2014). Subjective depressive symptoms and metabolic syndrome among the general population. Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry, 54, 223–230.

Rumiantsev, P. O., Saenko, V. A., & Dedov, I. I. (2017). Chapter 10 – Influence of radiation exposure and ultrasound screening on the clinical behavior of papillary thyroid carcinoma in young patients. Thyroid cancer and nuclear accidents. Long-term aftereffects of Chernobyl and Fukushima, 97–107.

Sharma, P., Levesque, T., Boilard, E., & Park, E. A. (2014). Thyroid hormone status regulates the expression of secretory phospholipases. Biochemical and Biophysical Research Communications, 444(1), 56–62.

Shavdatuashvili, T. (2005). Lipoprotein profile and endothelial function in patients with subclinical and overt hypothyroidism. Georgian Medical News, 129, 57–60.

Shoji, T., Emoto, M., Nishizawa, Y., & Inaba, M. (2015). Endocrine and metabolic changes affecting cardiovascular disease in dialysis patients. Journal of Renal Nutrition, 25(2), 223–225.

Sinha, R. A., Singh, B. K., & Yen, P. M. (2014). Thyroid hormone regulation of hepatic lipid and carbohydrate metabolism. Trends in Endocrinology and Metabolism, 25(10), 538–545.

Sokolenko, V. L. (2016). Pokaznyky kholesterynu ta imunnoyi systemy u osib z oznakamy veheto-sudynnoyi dystoniyi, shcho prozhyvaly na terytoriyakh, zabrudnenykh radionuklidamy [Cholesterol rate and immune system indices in people with symptoms of vegetative-vascular dystonia, who lived in the territories contaminated with radionuclides]. Svit Medytsyny ta Biolohiyi, 2, 86–90 (in Ukrainian).

Takamura, N., Orita, M., Saenko, V., Yamashita, S., Nagataki, S., & Demidchik, Y. (2016). Radiation and risk of thyroid cancer: Fukushima and Chernobyl. The Lancet Diabetes and Endocrinology, 4(8), 647.

Takeuchi, H. (2015). Serum levels of free T_3 are associated with ApoA1 and ApoA2, whereas free T_4 levels are associated with ApoB and LDL-cholesterol in euthyroid cardiovascular patients. IJC Metabolic and Endocrine, 8, 1–6.

Taub, R., Chiang, E., Chabot-Blanchet, M., Kelly, M. J., Reeves, R. A., Guertin, M. C., & Tardif, J. C. (2013). Lipid lowering in healthy volunteers treated with multiple doses of MGL-3196, a liver-targeted thyroid hormone receptor-β agonist. Atherosclerosis, 230(2), 373–380.

Terán, V. S., & Calle, M. A. A. (2012). Relationship of thyroid-stimulating hormone levels to development of dyslipidemia and determination of an ideal cut-off point for start replacement therapy. Endocrinología y Nutrición (English Edition), 59(10), 575–582.

Toth, P. P., Grabner, M., Punekar, R. S., Quimbo, R. A., Cziraky, M. J., & Jacobson, T. A. (2014). Cardiovascular risk in patients achieving low-density lipoprotein cholesterol and particle targets. Atherosclerosis, 235(2), 585–591.

Tronko, N. D., Cheban, A. K., Oliinyk, V. A., & Epshtein, Y. V. (1996). Klinichni aspekty Chornobyl's'koyi katastrofy. Endokrynna systema [Clinical aspects of the Chornobyl disaster. The endocrine system]. In: Chornobyl's'ka katastrofa. Ed. V. H. Bariakhtar. Scientific View, Kyiv (in Ukrainian).

van den Berg, E. H., van Tienhoven-Wind, L. J., Amini, M., Schreuder, T. C., Faber, K. N., Blokzijl, H., & Dullaart, R. P. (2017). Higher free triiodothyronine is associated with non-alcoholic fatty liver disease in euthyroid subjects: The lifelines cohort study. Metabolism, 67, 62–71.

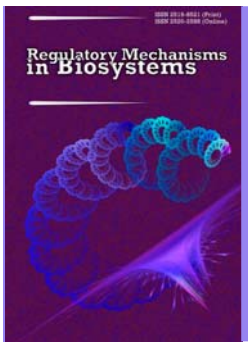
van Tienhoven-Wind, L., & Dullaart, R. P. (2015). Low normal thyroid function as a determinant of increased large very low density lipoprotein particles. Clinical Biochemistry, 48(7), 489–494.

Vermes, I., & Beishuizen, A. (2007). The neuroendocrinology and immunology of critical illness. Neuroimmune Biology, 7, 291–317.

Zak, B. (1980). Cholesterol methodology for human studies. Lipids, 15(9), 698–704.

Zhang, T., Zhou, L., cong Li, C., Shi, H., & Zhou, X. (2016). TSH increases synthesis of hepatic ATP-binding cassette subfamily A member 1 in hypercholesterolemia. Biochemical and Biophysical Research Communications, 476(2), 75–81.

Zhigulina, V. V. (2015). Biohimicheskij otvet na stress (obzor literatury) [Biochemical response to stress (overview)]. Tverskoj Medicinskij Zhurnal, 1, 91–100 (in Russian).



Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(2), 239–243
doi: 10.15421/021737

The features of vegetative regulation of the heart rate in athletes with different levels of perception and processing of visual information

O. Skyba, L. Pshenychna, O. Ustymenko-Kosorich

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

Article info

Received 28.04.2017
Received in revised form 14.05.2017
Accepted 16.05.2017

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

Skyba, O., Pshenychna, L., & Ustymenko-Kosorich, O. (2017). The features of vegetative regulation of the heart rate in athletes with different levels of perception and processing of visual information. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(2), 239–243. doi:10.15421/021737

The study involved 32 children aged from 11–12 who were receiving training in sports schools in Sumy. The children were divided into three study groups with high, medium and low levels of sensorimotor reactivity, defined in terms of complex visual-motor response. The study methods were psychophysiological, cardiointervalography, mathematical and statistical. We found that the majority of individuals with a medium level of sensorimotor reactivity possessed vegetative tonus, characterized by background emphotony, while sympathicotonia was prevalent in the group of athletes with a high level of sensorimotor reactivity, in comparison with those with medium and low levels of sensorimotor reactivity. Vegetative imbalance that manifests via hypersympaticotonic reactivity occurred among athletes with high and medium levels of sensorimotor reactivity, which is the evidence of stress on the cardiovascular system, decline of adaptive capacity of the organism in the individuals investigated. Shorter latent periods of complex visual-motor responses (LP SR 1–3 and LP SR 2–3) were observed among athletes with hypersympaticotonic vegetative reactivity, compared to sportsmen with normal type of vegetative reactivity. Analysis of indicators of heart rate variability revealed an increased activity of the sympathoadrenal system in athletes with a high level of sensorymotor response, which is confirmed by significantly lower values of SDNN and RMSSD in comparison with athletes with a low level of sensorymotor response. The activation of central regulation in athletes with a high level of sensorimotor responses also show significantly higher values IN and Amo, in comparison with athletes with a low level of sensorymotor response. The figures IN (47.7%), and Amo (45.3%) were those most effected by the level of sensorimotor reactivity. Less effected were figures of SDNN (43.1%), which reflects general heart rate variability and RMSSD (43.1%), which reflects high frequency components of heart rate. Analysis of change in dynamics of figures of heart rate variability provides evidence of higher activity of the sympathoadrenal system in athletes with a high level of sensorimotor reactivity, which facilitates increased stress on heart rhythm vegetative regulation mechanisms, accompanied by decline of parasympathetic influences of the vegetative nervous system.

Keywords: visual-motor reaction; vegetative tonus; vegetative reactivity; cardiointervalography; sports activity

Особливості вегетативної регуляції ритму серця у спортсменів із різним рівнем сприйняття та переробки зорової інформації

О. О. Скиба, Л. В. Пшенична, О. А. Устименко-Косоріч

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

Оцінювали функціональний стан вегетативної нервової системи за показниками варіабельності серцевого ритму з визначенням вихідного вегетативного тонусу та вегетативної реактивності у спортсменів із різним рівнем сенсомоторної реактивності. Обстежено 32 дитини віком 11–12 років, яких поділено на три групи дослідження з високим, середнім та низьким рівнями сенсомоторної реактивності, визначеним за показником складної зорово-моторної реакції. Вегетативний тонус, що характеризувався фоновою ейтонією, визначений серед більшості спортсменів із середнім рівнем сенсомоторного реагування, а симпатикотонія вірогідно переважала серед групи спортсменів із високим рівнем сенсомоторного реагування, порівняно із спортсменами із середнім та низьким його рівнями. Вегетативний дисбаланс, що проявлявся гіперсимпатикотонічною реактивністю, визначався серед спортсменів із високим та середнім рівнями сенсомоторного реагування, що свідчить про напруження в них функціонування серцево-судинної системи, зниження адаптаційних можливостей організму. Визначено коротші латентні періоди складних зорово-моторних реакцій (РВ1–3 та РВ2–3) у спортсменів із гіперсимпатикотонічною вегетативною реактивністю, порівняно із спортсменами з нормальним типом вегетативної реактивності. Вагомий внесок рівня сенсомоторної реактивності визначено для показників IN (47,7%) та Amo (45,3%). Дещо менший вплив установлено для показника SDNN (43,1%), що відображає загальну варіабельність серцевого ритму та RMSSD (43,1%), який свідчить про високочастотні компоненти серцевого ритму. Аналіз спрямованості змін визначених показників варіабельності серцевого

ритму вказує на підвищену активність симпато-адреналової системи у спортсменів із високим рівнем сенсомоторного реагування, який сприяє збільшенню напруження механізмів вегетативної регуляції серцевого ритму, що супроводжується зниженням парасимпатичних впливів із боку вегетативної нервової системи.

Ключові слова: зорово-моторні реакції; вегетативний тонус; вегетативна реактивність; кардіоінтервалографія; спортивна діяльність

Вступ

Адаптаційно-функціональна перебудова в організмі у відповідь на стимул відбувається за допомогою нейрогенної та гормонально-гуморальної ланок регуляції, що супроводжується зміною активності центральної нервової системи (ЦНС) та активацією гіпоталамо-гіпофізарної системи, яка відповідає за підтримання гомеостазу (Tufnell, 2005; Coppel, 2015; Kolesnikova et al., 2015).

До об'єктивних критеріїв поточного контролю функціонального стану ЦНС належать показники сенсомоторних реакцій різного ступеня складності, реалізація яких включає сприйняття сенсомоторного стимулу, його аналіз, прийняття рішення та моторну відповідь тощо (Herpin et al., 2010; Korobeynikov and Korobeynikova, 2014; Bellenger et al., 2016; Rovnyj and Romanenko, 2016). Проте складні та прості сенсомоторні функції мають не однакову фізіологічну природу та відображають функціональний стан різних систем. Нейрофізіологічні механізми простих зорово-моторних реакцій повязані з пірамідно-стріальним рівнем організації, що включає пірамідний (кортикальний) і екстрапірамідний (субкортикальний) контроль (Rizzolatti et al., 2000; Nakahara et al., 2001; Sanes, 2003; Opris, 2005; Golovin et al., 2016; Crollen et al., 2017). Виконання простого сенсомоторного акту здійснюється простою рефлекторною дугою без широкої мобілізації функціональних систем організму. Механізми, що забезпечують виконання складної реакції, характеризують реактивність, активацію та регуляцію вищого рівня (кортикального) за участю фронтально-лімбічного комплексу з активізацією ендокринної, серцево-судинної, дихальної та інших систем організму (Gallese et al., 2009; Makarenko and Lyzohub, 2011; Zaichkowsky, 2012).

Як провідний фактор ефективності реалізації сенсомоторних реакцій виступає функціональний стан організму, що визначається ступенем активції систем організму, які детермінують результативність певної діяльності (Bundzen et al., 2005; Korobejnikov et al., 2013; Shutova and Murav'eva, 2013).

Спортивна діяльність із властивими їй інтенсифікацією тренувального процесу та граничними фізичними навантаженнями на сучасному етапі розглядається як вид екстремальної діяльності людини, що може спричинити зрив механізмів адаптації організму спортсменів (Blascovich et al., 2004; Rimmele et al., 2009; Bartczak et al., 2016; Nicolas et al., 2016).

Аналіз останніх досліджень і публікацій свідчить, що до ранніх ознак порушення адаптації спортсменів до факторів навчально-тренувального процесу належить дисбаланс вегетативної нервової системи, що в подальшому може викликати розвиток передпатологічних і патологічних станів (Kraus et al., 2013; Nikolaeva and Merenkova, 2014). Основним патогенетичним механізмом багатьох серцево-судинних захворювань у спортсменів слугує вегетативна дисфункція (Phukan et al., 2011; Sartor et al., 2013). Вторинні вегетативні розлади належать до однієї із провідних причин ранніх ознак порушення стану здоров'я у спортсменів (Nekhanevych, 2014).

Поширеність вегетативних розладів визначена в широкому діапазоні від 6,2% до 36,5% осіб (Suetake et al., 2010). Відмінності за частотою виявлення вегетативних порушень пояснюються неоднозначністю в їх етіопатогенетичному трактуванні, використанням різних методичних підходів під час їх діагностики та самих методів діагностики, а також відсутністю єдиних критеріїв оцінювання результатів обстеження (Thayer et al., 2010).

Таким чином, у системі динамічного контролю за станом здоров'я юних спортсменів провідна роль повина належати оцінюванню функціонального стану серцево-судинної системи та вегетативної регуляції для виявлення ранніх ознак дезадаптації, оскільки зниження ступеня адаптації може супроводжуватися переходом як до преморбідних, так і патологічних станів із ростом серцево-судинної захворюваності.

Мета дослідження – визначення особливостей вегетативної регуляції ритму серця у спортсменів із різним рівнем сприйняття та переробки зорової інформації.

Матеріал і методи досліджень

Комісія з питань біоетики Сумського державного педагогічного університету імені А. С. Макаренка встановила (протокол № 10 від 28.04.2014 р.), що всі обстеження проведені відповідно до основних біотичних норм Гельсінської декларації Всесвітньої медичної асоціації про етичні принципи проведення науково-медичних досліджень за участі людини (1964–2000), Декларації принципів толерантності (1995), Універсальної декларації з біоетики та прав людини (1997), Конвенції Ради Європи з прав людини та біомедицини (1997), наказу МОЗ України від 13.02.2006 р. № 66. Батьки обстежуваних давали письмову згоду для участі в дослідженнях. Вжито необхідних заходів для забезпечення анонімності обстежуваних.

У дослідженні брали участь 32 дітини віком 11–12 років, які займались панкратіоном у групах попередньої базової підготовки у системі дитячо-юнацьких спортивних шкіл м. Суми.

Особливості сенсомоторного реагування спортсменів визначали за показниками сенсомоторної реактивності за допомогою програмного забезпечення комплексу «Діагност-1» (Makarenko and Lyzohub, 2011).

Сенсомоторну реактивність оцінювали за величиною латентного періоду простої зорово-моторної реакції (ПЗМР), латентних періодів реакції вибору одного подразника із трьох (РВ1–3) та двох із трьох сигналів (РВ2–3). Визначення латентних періодів зорово-моторних реакцій різної складності проведено в режимі «оптимального ритму». Завдання у визначеному режимі дозволяло реєструвати середню величину латентного періоду простої та складної зорово-моторних реакцій (x), середнє квадратичне відхилення (SD) та похибку середнього значення (m).

Рівень сенсомоторного реагування (низький, середній та високий) визначали методом сигмальних відхилень ($x \pm SD$) за показником складної зорово-моторної реакції (РВ 1–3).

Залежно від рівня сенсомоторного реагування, дітей розподілено на три групи:

– I група – спортсмени із низьким рівнем сенсомоторного реагування, n = 9;

– II група – спортсмени із середнім рівнем сенсомоторного реагування, n = 13;

– III група – спортсмени із високм рівнем сенсомоторного реагування, n = 10.

Для оцінювання функціонального стану вегетативної нервової системи (ВНС) проводили дослідження варіабельності серцевого ритму (ВСР) із використанням апаратно-програмного комплексу «КардіоСпектр» АТ Солвейг відповідно до вимог Міжнародного стандарту (Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology, 1996) для коротких записів.

Проводили аналіз двох категорій ВСР: часовий аналіз (time – domain results) та частотний аналіз (frequency – domain results). У часовому аспекті здійснено оцінювання показників NN – ряд нормальних R–R інтервалів із виключенням екстрасистол; SDNN – стандартне відхилення NN інтервалів; RMSSD – квадратний корінь із середнього значення квадратів різниць величин послідовних інтервалів R-R; pNN_{50} – відсоток кардіоінтервалів, що відрізнялися від сусідніх більше ніж на 50 мс від

загальної кількості кардіоінтервалів; M_0 – значення кардіоінтервалу, яке найчастіше зустрічається в даному динамічному ряді; A_{m0} – кількість кардіоінтервалів, що відповідає значенню моди (у % до обсягу вибірки), IN – індекс напруження.

У частотній ділянці визначали абсолютні значення показників TF (Total Frequency) – загальної потужності спектра; HF (High Frequency) – потужності високочастотних коливань спектра, яка характеризує дихальний компонент ВСР, пов'язаний із парасимпатичним регулюванням; LF (Low Frequency) – потужності низькочастотних коливань спектра, який відображає активність підкіркового вазомоторного центру та пов'язаний із симпатичною ланкою регуляції; VLF (Very Low Frequency) – потужності наднизькочастотних коливань спектра, який відображає активність надсегментарних відділів автономної нервової системи та нейрогуморальний компонент регулювання, LF/HF – коефіцієнт, який відображає баланс вегетативних впливів.

Комп'ютерний аналіз включав визначення вихідного вегетативного тонусу: перевага тонусу парасимпатичного (ваготонія) чи симпатичного (симпатикотонія) відділу ВНС, баланс (ейтонія).

Реєстрацію кардіоінтервалограми проводили у горизонтальному положенні обстежуваних (лежачи на спині), у стані відносного спокою у першій половині дня протягом п'яти хвилин.

Визначення реактивності ВНС здійснювали за допомогою активної ортостатичної проби (Vejn, 2003; Fedorowski and Melander, 2013).

Після проведення фонового запису кардіоінтервалограми, обстежуваний без різких рухів приймав вертикальне положення, в якому проводили повторний запис кардіоінтервалограми.

Тип вегетативної реактивності визначали за відношенням IN_2 (індекс напруження в ортостазі) до IN_1 (індекс напруження у стані відносного спокою) з виділенням нормального, гіперсимпатикотонічного та асимпатикотонічного типів (Majdannyk et al., 2014).

Статистичну обробку результатів здійснювали загальноприйнятими методами варіаційної статистики за допомогою пакетів програм Statistica 8.0 (StatSoft Inc., USA). Розраховували середні значення (x), стандартні відхилення (SD) та величини похибки середнього (m).

Для номінальних змінних розраховували взаємозв'язок за таблицями спряженності та критерієм χ^2 – Пірсона.

Відмінності між вибірками у випадках порівняння їх середнього значення, розподілені за нормальним законом, оцінювали за параметричним t-критерієм Стьюдента. Вірогідність відмінностей оцінювали на рівні $P < 0,05$.

Для визначення відмінностей показників ВСР у групах спортсменів із різним рівнем сенсомоторної реактивності та впливу сенсомоторних функцій на вегетативний гомеостаз застосовано дисперсійний аналіз.

Оцінювання впливу сенсомоторних функцій на показники ВСР спортсменів здійснено за критерієм Фішера (F).

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

Результати

За результатами дослідження встановлено залежність вихідного вегетативного тонусу спортсменів від рівня їх сенсомоторної реактивності ($\chi^2 = 11,7$, $P < 0,05$).

Аналіз вегетативного тонусу спортсменів із середнім та низьким рівнями сенсомоторної реактивності вказує на перевагу в них ейтонії (77,8 ± 11,5%, 50,0 ± 16,7%, відповідно), тоді як у структурі вегетативного тонусу спортсменів із високим рівнем сенсомоторної реактивності ейтонія визначалась у 5,7 ± 7,3% обстежених ($P < 0,001$–$0,05$).

Серед спортсменів із високим рівнем сенсомоторної реактивності частка осіб із симпатикотонією була вірогідно вищою (94,3 ± 7,3%) порівняно зі спортсменами із середнім та низьким її рівнями (22,2 ± 11,5% і 25,0 ± 14,4% відповідно, $P < 0,001$–$0,01$), що свідчить про напруження механізмів вегетативної регуляції серцевого ритму у дітей із високим рівнем сенсомоторної реактивності.

Спрямованість вегетативних зрушень у відповідь на ортостаз пов'язана з фоновим рівнем активності. Встановлено, що вегетативна реактивність залежить від рівня сенсомоторної реактивності спортсменів ($\chi^2 = 18,3$, $P < 0,01$).

Реакція організму переважої більшості спортсменів із середнім та низьким рівнями сенсомоторної реактивності на ортостаз характеризувалась нормальною вегетативною реактивністю (45,8 ± 13,8% та 56,0 ± 16,5%, відповідно), тоді як серед спортсменів із високим рівнем сенсомоторної реактивності частка таких осіб була вірогідно нижчою та становила (14,3 ± 11,1%, $P < 0,05$) (рис.).

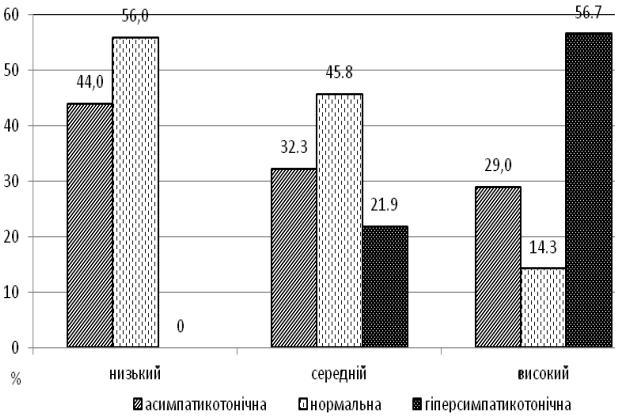


Рис. Розподіл спортсменів (%) із різним рівнем сенсомоторної реактивності за типом вегетативної реактивності (n = 32)

Гіперсимпатикотонія, яка свідчить про вегетативний дисбаланс і пов'язана з напруженням функціонування серцево-судинної системи, визначена у 56,7 ± 15,7% спортсменів із високим рівнем сенсомоторної реактивності.

Аналіз показників різних за складністю зорово-моторних реакцій у спортсменів дозволив визначити коротші латентні періоди складних зорово-моторних реакцій (РВ1–3 та РВ2–3) у дітей із гіперсимпатикотонічною вегетативною реактивністю, порівняно із спортсменами з нормальним типом вегетативної реактивності ($P < 0,05$) (табл. 1).

Таблиця 1

Показники латентних періодів сенсомоторних реакцій спортсменів залежно від їх вегетативної реактивності (M ± m, n = 32)

Показники, мс	Вегетативна реактивність		
	асимпатикотонічна	нормальна	гіперсимпатикотонічна
ПЗМР	272,7 ± 12,2	305,8 ± 28,7	270,6 ± 10,9
РВ 1-3	472,2 ± 24,5	474,8 ± 35,0	392,0 ± 20,2*
РВ 2-3	536,1 ± 39,7	586,3 ± 39,8	484,2 ± 18,4*

Примітка: * – $P < 0,05$, вірогідні відмінності порівняно із групою спортсменів із нормальною вегетативною реактивністю.

Для встановлення ступеня впливу сенсомоторних функцій спортсменів на їх вегетативний гомеостаз розраховано внесок рівня сенсомоторної реактивності у показники варіабельності серцевого ритму спортсменів (табл. 2).

У спортсменів із різним рівнем сенсомоторної реактивності спостерігали вірогідні відмінності майже за всіма показниками ВСР. Зокрема, значимо відрізнялися показник IN ($F = 5,5$; $P < 0,05$), який відображає ступінь централізації управління серцевим ритмом та A_{m0} ($F = 5,0$; $P < 0,05$), збільшення якого свід-

чить про активацію симпатичної ланки вегетативної регуляції серцевого ритму. Дещо менші відмінності встановлено для показника SDNN (F = 4,6; P < 0,05), що відображає загальну варіабельність серцевого ритму та RMSSD (F = 4,5; P < 0,05), який свідчить про високочастотні компоненти серцевого ритму.

Таблиця 2

Характеристика впливу сенсомоторної реактивності на показники варіабельності серцевого ритму (n = 32)

Показники	Внесок, %	F-критерій	P
NN, мс	2,6	0,1	>0,05
SDNN, мс	43,1	4,6	<0,05
RMSSD, мс	43,1	4,5	<0,05
pNN_{50}, %	35,5	3,3	<0,05
IN, ум. од.	47,7	5,5	<0,05
M_0, мс	7,4	1,3	>0,05
A_{m0}	45,3	5,0	<0,05
TP,мс^2	33,7	3,0	<0,05
VLF, мс^2	32,2	2,9	<0,05
LF, мс^2	27,3	2,3	>0,05
HF, мс^2	37,6	3,6	<0,05
LF/HF	23,9	1,9	>0,05

Аналіз спрямованості змін показників ВСР вказує на підвищену активність симпато-адреналової системи у спортсменів із високим рівнем сенсомоторного реагування, що підтверджують вірогідно нижчі значення SDNN (52,5 ± 13,8 мс) та RMSSD (49,1 ± 12,5 мс), порівняно зі спортсменами з низьким рівнем сенсомоторного реагування (159,4 ± 50,3 і 189,2 ± 66,1 мс, відповідно, P < 0,05).

Зниження визначених показників свідчить про посилення симпатичного впливу, який пригнічує активність автономного контуру регуляції у спортсменів із високим рівнем сенсомоторного реагування.

Показник IN характеризувався вірогідно вищими значеннями серед осіб із високим рівнем сенсомоторного реагування (78,0 ± 21,2 ум. од.), порівняно із спортсменами із низьким його рівнем (26,8 ± 18,0 ум. од., P < 0,05), що вказує на напруження регуляторних механізмів їх організму. Крім того, про підвищену активність симпатоадреналової системи у спортсменів із високим рівнем сенсомоторного реагування свідчать вірогідно вищі значення показника A_{m0} (35,4 ± 4,8%), порівняно із спортсменами із низьким його рівнем (19,8 ± 6,1%, P < 0,05).

Обговорення

Високі показники швидкості обробки зорової інформації та ефективності зорового сприйняття слугують визначальним фактором у досягненні високих спортивних результатів у єдиноборствах (Korobejnikov et al., 2013). Висока «ціна адаптації» спортсменів із високим рівнем сенсомоторної реактивності характеризується напруженням функціонування серцево-судинної системи, зниженням адаптаційних можливостей їх організму (Sanes, 2003; David and Coppel, 2015; Golovin and Aizman, 2016; Rovnyj and Romanenko, 2016).

Відповідно до одержаних результатів установлено, що вегетативний дисбаланс притаманний більшості спортсменів із високим рівнем сенсомоторної реактивності, які формують групу підвищеного ризику розвитку функціональних відхилень із боку вегетативних систем.

Установлені особливості підтверджують коротші латентні періоди складних зорово-моторних реакцій (РВ1–3 та РВ2–3) у дітей із гіперсимпатикотонічною вегетативною реактивністю, порівняно із спортсменами з нормальним типом вегетативної реактивності (P < 0,05) (Zaichkowsky, 2012; Shutova and Murav'eva, 2013).

Високий рівень сенсомоторного реагування пов'язаний із напруженням вегетативної регуляції серцевого ритму, яке супроводжується зниженням парасимпатичних впливів із боку вегетативної нервової системи, що збігається з даними наукових досліджень (Opris, 2005; Herpin et al., 2010; Korobeynikov and Korobeynikova, 2014).

За даними Korobeynikov et. al. (2013), збільшення швидкості сенсомоторного реагування в умовах цілеспрямованих тренувань пов'язане зі збільшенням напруження вегетативної регуляції ритму серця за рахунок підвищення симпатичного тонусу, що узгоджується зі зменшенням тривалості та періодичності коливань кардіоінтервалів.

Однак, порівняно із дослідженнями інших авторів, визначено внесок рівня сенсомоторної реактивності у показники варіабельності серцевого ритму спортсменів (Gallese et al., 2009; Korobejnikov et al., 2013; Sartor et al., 2013; Shutova and Murav'eva, 2013).

Висновки

Високий рівень сенсомоторної реактивності супроводжується напруженням механізмів вегетативної регуляції серцевого ритму, що проявляється високою часткою симпатикотонічного вегетативного тонусу та гіперсимпатикотонічної вегетативної реактивності серед спортсменів із високим рівнем сенсомоторної реактивності, порівняно із спортсменами із середнім та низьким її рівнями (P < 0,001).

У групах спортсменів із різним рівнем сенсомоторного реагування значимо відрізнялися показники IN (F = 5,5; P < 0,05) та A_{m0} (F = 5,0; P < 0,05). Дещо менші відмінності встановлено для показника SDNN (F = 4,6; P < 0,05), що відображає загальну варіабельність серцевого ритму та RMSSD (F = 4,5; P < 0,05), який свідчить про високочастотні компоненти серцевого ритму.

References

Andrew, A., Flatt, A. A., & Esco, M. R. (2015). Heart rate variability stabilization in athletes: Towards more convenient data acquisition. Clinical Physiology and Functional Imaging, 36(5), 331–336.

Bartczak, D., Szymański, L., Bodera, P., & Stankiewicz, W. (2016). Psychoneuroimmunological aspects of cardiovascular diseases: A preliminary report. Central European Journal of Immunology, 41(2), 209–216.

Bellenger, C. R., Fuller, J. T., Thomson, R. L., Davison, K., Robertson, E. Y., & Buckley, J. D. (2016). Monitoring athletic training status through autonomic heart rate regulation: A systematic review and meta-analysis. Sports Medicine, 46(10), 1461–1486.

Blascovich, J., Seery, M. D., Mugridge, C. A., Norris, R. K., & Weisbuch, M. (2004). Predicting athletic performance from cardiovascular indexes of challenge and threat. Journal of Experimental Social Psychology, 40(5), 683–688.

Bundzen, P. V., Korotkov, K. G., Korotkova, A. K., Mukhin, V. A., & Priyatkin, N. S. (2005). Psychophysiological correlates of athletic success in athletes training for the Olympics. Human Physiology, 31(3), 316–323.

Coppel, D. B. (2015). Psychological aspects of sports medicine. Current Physical Medicine and Rehabilitation Reports, 3(1), 36–42.

Crollen, V., Albouy, G., Lepore, F., & Collignon, O. (2017). How visual experience impacts the internal and external spatial mapping of sensorimotor functions. Scientific Reports, 7(1), 1022.

Fedorowski, A., & Melander, O. (2013). Syndromes of orthostatic intolerance: A hidden danger. Journal of Internal Medicine, 273(4), 322–335.

Gallese, V., Rochat, M., Cossu, G., & Sinigaglia, C. (2009). Motor cognition and its role in the phylogeny and ontogeny of action understanding. Developmental Psychology, 45(1), 103–113.

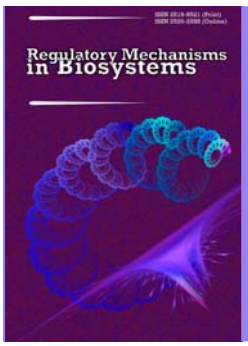
Golovin, M. S., & Aizman, R. I. (2016). Audiovisual stimulation modulates physical performance and biochemical and hormonal status of athletes. Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 161(5), 638–642.

Herpin, G., Gauchard, G. C., Lion, A., Collet, P., Kellerc, D., & Perrin, P. P. (2010). Sensorimotor specificities in balance control of expert fencers and pistol shooters. Journal of Electromyography and Kinesiology, 20(1), 162–169.

Kolesnikova, L., Dzyatkovskaya, E., Rychkova, L., & Polyakov, V. (2015). New approaches to identifying children of psychosomatic disorders risk group. Procedia – Social and Behavioral Sciences, 214, 882–889.

Korobejnikov, G. V., Korobejnikova, L. G., & Makarchuk, N. J. (2013). Osobennosti vegetativnoj reguljacii ritma serdca u sportsmenov s razlichnym urovnem sensomotornogo reagirovanija [Features of vegetative regulation of heart rhythm in athletes with different levels of sensorimotor response]. Scientific Notes of the Taurida National University named after V. I. Vernadsky, 26(65), 89–97 (in Russian).

Korobeynikov, G., & Korobeynikova, L. (2014). Functional brain asymmetry and cognitive functions in elite wrestlers. International Journal of Wrestling Science, 4(1), 26–34.
Kraus, U., Schneider, A., Breitner, S., Hampel, R., Rückerl, R., Pitz, M., Geruschkat, U., Belcredi, P., Radon, K., & Peters, A. (2013). Individual daytime noise exposure during routine activities and heart rate variability in adults: A repeated measures study. Environ Health Perspect, 121(2), 607–612.
Majdannyk, V. G., Smijan, O. I., Bynda, T. P., & Savel'jeva-Kulyk, N. O. (2014). Vegetatyvni dysfunkcii' u ditej [Autonomic dysfunction in children]. Sumy State University, Sumy. Sums'kyj derzhavnyj universytet, Sumy (in Ukrainian).
Makarenko, M. V., & Lyzohub, V. S. (2011). Ontohenez psykhofiziolohichnykh funktsiy lyudyny [Ontogenesis of physiological functions of human]. Vertykal', Cherkasy (in Ukrainian).
Nakahara, H., Doya, K., & Hikosaka, O. (2001). Parallel cortico-basal ganglia mechanisms for acquisition and execution of visuomotor sequences – A computational approach. Journal of Cognitive Neuroscience, 13(5), 626–647.
Nicolas, M., Vacher, P., Martinent, G., & Mourot, L. (2016). Monitoring stress and recovery states: Structural and external stages of the short version of the RESTQ sport in elite swimmers before championships. Journal of Sport and Health Science, 1–12.
Nikolaeva, E., & Merenkova, V. (2014). The influence of the children's inner health picture on their heart rate regulation. Procedia – Social and Behavioral Sciences, 159, 87–90.
Opris, I. (2005). Neural circuitry of judgment and decision mechanisms. Brain Research Reviews, 48 (3), 509–526.
Phukan, J., Albanese, A., Gasser, T., & Warner, T. (2011). Primary dystonia and dystonia-plus syndromes: Clinical characteristics, diagnosis, and pathogenesis. Lancet Neurology, 10(12), 1074–1085.
Rimmele, U., Seiler, R., Marti, B., Wirtz, P. H., Ehlert, U., & Heinrichs, M. (2009). The level of physical activity affects adrenal and cardiovascular reactivity to psychosocial stress. Psychoneuroendocrinology, 34(2), 190–198.
Rizzolatti, G., Fogassi, L., & Gallese, V. (2000). Cortical mechanisms subserving object grasping and action recognition: A new view on the cortical motor functions. The New Cognitive Neurosciences, 2, 539–552.
Rovnyj, A. S., & Romanenko, V. V. (2016). Model'nye harakteristiki sensomotornyh reakcij i specificheskih vosprijatij edinoborcev vysokoj kvalifikacii [Model characteristics of sensorimotor reactions and specific perceptions of martial artists of high qualification]. Edinoborstva, 1, 54–57 (in Russian).
Sanes, J. N. (2003). Neocortical mechanisms in motor learning. Current Opinion in Neurobiology, 13(2), 225–231.
Sartor, F., Vailati, E., Valsecchi, V., Vailati, F., & Torre, A. (2013). Heart rate variability reflects training load and psychophysiological status in young elite gymnasts. Journal of Strength and Conditioning Research, 27(10), 2782–2790.
Shutova, S. V., & Murav'eva, I. V. (2013). Sensomotornye reakcii kak harakteristika funkcional'nogo sostojanija CNS [Sensory motor reactions as a characteristic of the functional state of the central nervous system]. Vestnik Tambovskogo universiteta. Serija: Estestvennye i tehnicheskie nauki, 18 (5), 2831–2840 (in Russian).
Suetake, N., Morita, Y., Suzuki, D., Lee, K., & Kobayashi, H. (2010). Evaluation of autonomic nervous system by heart rate variability and differential count of leukocytes in athletes. Health, 2(10), 1190–1198.
Task force of the European Society of Cardiology the North American Society of Pacing Electrophysiology. Heart rate variability: Standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use (1996). Circulation, 93, 1043–1065.
Thayer, J. F., Yamamoto, S. S., & Brosschot, J. F. (2010). The relationship of autonomic imbalance, heart rate variability and cardiovascular disease risk factors. International Journal of Cardiology, 141(2), 122–131.
Tufnell, G. (2005). Stress and reactions to stress in children. Psychiatry, 4(7), 69–72.
Vejn, A. M. (2003). Vegetativnye rasstroystva: Klinika, diagnostika, lechenie [Autonomic dysfunction: Clinical features, diagnosis, treatment]. Meditsinskoe Informatsionnoe Agentstvo, Moscow (in Russian).
Veyn, A. M. (2003). Vegetative disorders: Clinic, diagnostics, treatment [Autonomic dysfunction: Clinical features, diagnosis, treatment]. Medical News Agency, Moscow (in Russian).
Zaichkowsky, L. (2012). Psychophysiology and neuroscience in sport: Introduction to the special issue. Journal of Clinical Sport Psychology, 6(1), 1–5.



Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(2), 244–251
doi: 10.15421/021738

Analysis of brain bioelectric activity during verbal-logical thinking of biology students

T. O. Tretiak, A. G. Sokorenko, I. V. Dregval, O. V. Severynovska

Oles Honchar Dnipro National University, Dnipro, Ukraine

Article info

Received 24.03.2017
Received in revised form 20.04.2017
Accepted 23.04.2017

Oles Honchar Dnipro National University, Gagarin Ave., 72, Dnipro, 49010, Ukraine.
Tel.: +38-050-232-77-38.
E-mail: drehval_iho@fbem.dnulive.dp.ua

Tretiak, T. O., Sokorenko, A. G., Dregval, I. V., & Severynovska, O. V. (2017). Analysis of brain bioelectric activity during verbal-logical thinking of biology students. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(2), 244–251. doi:10.15421/021738

75 female students of biology aged 18–22 were examined. The indicators of coherence of frequency components of electroencephalography in a quiet state and during solving tasks, involving verbal-logical type of thinking, were assessed. The study included two stages: at the first stage, the individual psycho-physiological features of the students were investigated, then, the students investigated were divided into two groups, those with low and those with medium levels of performing tests. Performance of tasks involving verbal-logical thinking, compared with the background state, was characterized by polyrhythmic EEG activity with dominating δ-oscillations and prevailing δ-activity in the frontal area, which indicates their special role in regulation of complicated forms of cognitive activity. With development of ability of verbal-logical thinking, we established the increase in the spectral capacity in the frontal F_3, F_7, central C_3, C_4, parietal P_3, P_4 and temporal T_5 leads and increasing of synchronization in α-range in the left frontal zone, in areas near the Vernike zone and in the contour area F_4–F_8–T_4–P_4 of the right hemisphere. In the process of solving logical problems, the students with the low level of development of this cognitive ability demonstrated an increase of SC of β_1-oscillation in Fp_2, P_3, O_2 leads, and the students with the medium level of development of logical thinking, on the contrary, demonstrated a reliable decrease in capacity of β_1-oscillations in the central C_4 and parietal P_4 leads. However, in the most productive students, a considerable number of significant functional connections and high values of coefficients of coherence between frontal F_3–F_4, F_4–C_4, central and parietal C_3–P_3, C_4–P_3, C_4–P_4 and occipital O_1–O_2 leads in the above mentioned EEG range were recorded. The spectral capacity of β_2-components of EEG in students with different levels of development of logical thinking varied within background values and decreased in certain sections. The students with the medium level of manifestation of verbal-logical thinking demonstrated synchronization of SC of β_2-range between frontal Fp_1–Fp_2, Fp_2–F_7, F_3–F_4 and other C_3–C_4, O_1–T_5, T_3–T_4 leads. While performing the tasks involving logical thinking, the students with low manifestation of this mental ability, did not demonstrate any considerable changes in indicators of SC of the θ-range. However, a reliable increase was established in the Fp_1, Fp_2, F_7 and in O_2 leads in the students tested in the group with the medium manifestation of cognitive ability. It should also be noted that with the development of verbal-logical way of thinking, the brain transfers in a special functioning mode with the low functional connection in the area of θ-oscillations, which indicates the preservation of the previously formed neural network. Therefore, in this work, we for the first-time distinguished special features and functional connections during performing verbal, rather than mathematical cognitive logical tasks: localization of loci of interaction at α-frequencies in frontal and central leads of the right hemisphere; β_1 – in frontal leads of the left and central right hemisphere, β_2 – in frontal and occipital left and in occipital areas of the right hemisphere. It was established that in low-frequency δ- and θ-ranges of EEG, both large cell ensembles, which embrace almost all right hemisphere, and separate sections in frontal, pariental, pariental-occipital locuses of the left hemisphere, are functionally integrated.

Keywords: spectral capacity of EEG; verbal-logical type of thinking; cognitive ability

Аналіз біоелектричної активності мозку у процесі словесно-логічного мислення студентів-біологів

Т. О. Третяк, А. Г. Сокоренко, І. В. Дрегваль, О. В. Северіновська

Дніпровський національний університет імені Олеся Гончара, Дніпро, Україна

У 75 студенток-біологів віком 18–22 роки досліджували спектральну потужність і оцінювали показники когерентності частотних компонентів ЕЕГ у стані спокою та під час вирішення завдань на словесно-логічний тип мислення. Попередньо, за результатами комплексного дослідження визначились із категорією досліджуваних осіб: амбіверти, холерично-сангвінічного типу темпераменту, з помірним рівнем тривожності та високим рівнем стресостійкості, праворукі, або правші, з відсутністю астенії, яких за розвитком мислення

поділили на групи з низьким і середнім проявом словесно-логічного типу мислення. Із розвитком здібності до когнітивного мислення збільшується домінування δ-осциляцій та кількість когерентних зв'язків спектральної потужності ЕЕГ в області δ-частот, оскільки саме вони формують вхідний сенсорний потік за умов підвищеної уваги. Також відбувалося збільшення спектральної потужності електроенцефалограми в α-діапазоні в деяких точках фронтальної, центральної, тім'яної та скроневої областей, переважно лівої гемісфери та посилення синхронізації в у лівій фронтальній і центральній зонах у контурній області F_4–F_8–T_4–P_4 правої півкулі. За незначної відмінності від фонових значень спектральної потужності β_1-осциляцій ЕЕГ відмічали посилення функціональних зв'язків та високі значення коефіцієнтів когерентності між фронтальними F_3–F_4, F_4–C_4, центральними й тім'яними C_3–P_3, C_4–P_3, C_4–P_4 і потиличними відведеннями. Спектральна потужність β_2-складових ЕЕГ коливалась у межах фонових значень, збільшувалась синхронізація СП β_2-діапазону між передніми та деякими центральними, скроневими та потиличними локусами. У низькочастотних δ- та θ-діапазонах ЕЕГ функціонально поєднуються як великі клітинні ансамблі правої гемісфери, так і окремі ділянки лівої півкулі.

Ключові слова: спектральна потужність ЕЕГ; словесно-логічний тип мислення; когнітивна здібність

Вступ

Дослідження процесів мислення шляхом аналізу доступних психофізіологічних показників сучасними комп'ютерними методами, зокрема, вимірювання та аналіз параметрів біоелектричної активності мозку, належить до перспективних напрямів сучасних когнітивних досліджень (Kraft et al., 2009; Klawitter et al., 2010; Sviderskaya, 2011). Ритми – основа ЕЕГ і тісно пов'язані з мозковими функціями, наприклад, з увагою, сприйняттям і запам'ятовуванням (Poch et al., 2014; Freunberger-a et al., 2011). Протягом XX століття для аналізу ритмів ЕЕГ пропонували декілька методик, однак функціональне значення багатьох ритмів, особливо тих, які з'являються у процесі когнітивної діяльності людини, досі не з'ясовано. За когнітивної діяльності (виконання вербально-логічних і просторово-образних завдань) на ЕЕГ людини встановлюються ритмічні патерни, які можна однозначно ідентифікувати з характером розумового процесу (Trofimov et al., 2015; Ivanitsky et al., 2010; Roik and Ivanitsky, 2010).

Як відомо, словесно-логічне мислення здійснюється за допомогою логічних операцій із поняттями, в яких суттєві закономірності та взаємозв'язки досліджуваної реальності не наявні. Розвиток словесно-логічного мислення перебудовує та впорядковує світ образних уявлень і практичних дій, тому вивченню цього типу когнітивної діяльності присвячено значну кількість праць (James, 2012; Hyunjeong Lee, 2013; Jashin, 2015; Slavutskaja, 2015).

Ще з класичних праць відомо, що розумова діяльність викликає стійку десинхронізацію α-ритму. Також за когнітивної активності відбувається перебудова частотно-амплітудних параметрів ЕЕГ, яка охоплює всі основні частотні діапазони. Dzhebrailova et al. (2015) показано, що у продуктивніших студентів на різних етапах виконання завдання на логічне мислення відбувається зміна рівня та структури потенціалів ЕЕГ α-діапазону, а в осіб із гіршими результатами кількість значущих когерентних організацій та їх структура не змінюються під час виконання завдань. До того ж, α-потужність пов'язана з активацією уваги, хоча, як стверджують Limbach and Corballis (2017), цей зв'язок може бути досить складним. До того ж, динаміка α-активності за розумової діяльності має непростий характер: низько- та високочастотний α-ритм, що більшою мірою співвідноситься з когнітивними аспектами діяльності, тоді як середньочастотний α-ритм відображає процеси неспецифічної активації (Sauseng et al., 2015).

Кортикальна активність в α-діапазоні ЕЕГ виявилася особливо чутливою до творчості, але її функціональне значення в контексті творчого пізнання ще не цілком з'ясоване. Зокрема, збільшення α-синхронізації під час творчого мислення у працях Fink et al. (2009) трактується по-різному: як функціональний корелят кортикального відділу на холостому ходу, або, конкретніше, як селективне інгібування зон мозку. ЕЕГ-дослідження цих авторів показало, що генерація оригінальних ідей пов'язана з α-синхронізацією в лобових областях мозку та з дифузним поширеним візерунком α-синхронізації над тім'яною ділянкою кори. МРТ дослідження показало, що виконання завдання супроводжується активацією лобових областей лівої півкулі. Крім того, встановили синхронізацію у тім'яно-скроневих ділянках мозку. Отримані дані свідчать, що синхронізація ЕЕГ α-діапазону у процесі творчого мислення стає ознакою пізнавальної активації коркових процесів.

За даними низки авторів, когнітивна активність у дорослих супроводжується підвищенням потужності β-ритму, причому значуще посилення високочастотної активності спостерігається під час розумової діяльності, що включає елементи новизни, у той час як стереотипні, повторювані розумові операції викликають її зниження (Vol'f and Tarasova, 2010; Dzhebrailova et al., 2013; Dzhebrailova and Korobejnikova, 2013).

Вже не викликає сумніву той факт, що існує зв'язок gamma-ритму з процесами сприйняття, уваги, свідомості та семантичної обробки інформації (Crick and Koch, 1995; Payne, 2002). Амплітуда та частота цього ритму залежать від стану людини та виду когнітивного завдання (Freeman and Barrie, 2000). Саме на частоті gamma-ритму відбувається синхронізація активності та функціональне об'єднання просторово віддалених популяцій нейронів під час здійснення свідомої діяльності (Thürer et al., 2016). Збільшення абсолютної спектральної потужності в gamma-діапазоні спостерігали за зростанням складності когнітивних завдань і реєстрували в лівій півкулі, у лобних і зорових ділянках, а також у правій тім'яно-скроневій області (Simos et al., 2002). Підвищення активності gamma-ритму у процесі зростання складності когнітивних завдань відмічали (Posada et al., 2003), у той час як активність β-ритму знижувалась (Gross and Gotman, 2009). Makeig and Jung (1996) показали, що gamma-активність зростає у стані активації, у процесі правильного впізнання зорового стимулу, тоді як під час процесу приняття помилкових рішень і у стані дрімоти gamma-активність зменшується. Можна зробити висновок, що gamma-активність модулюється у процесі переробки інформації на тлі активації та спрямованої уваги до зовнішніх стимулів.

Незважаючи на численні дослідження, у загальних рисах ми знаємо, що процес мислення являє собою складну аналітико-синтетичну діяльність усієї кори великих півкуль головного мозку, де першочергове значення мають тимчасові зв'язки, які утворюються між аналізаторами та різними відділами кори головного мозку (Gavin et al., 2016). Проте залишається багато невирішених питань стосовно співвідношень параметрів ЕЕГ: спектрального складу змін, екзальтації або депресії ритмів ЕЕГ, картування спеціалізації та міжпівкульної асиметрії відділів кори у процесі словесно-логічного мислення.

Тому мета роботи – вивчити індивідуальні особливості розумової активності студентів-біологів під час виконання певних видів словесно-логічних завдань. Предмет дослідження – логічний тип мислення як складова індивідуальних особливостей інтелектуальної діяльності людини.

Матеріал і методи досліджень

Обстежили 75 студенток-біологів віком 18–22 роки. Усі випробувані дали письмову добровільну згоду на участь у дослідженні та були практично здоровими, без шкідливих звичок. Усі дослідження проведено відповідно до основ біотичних норм Гельсінської декларації Всесвітньої медичної асоціації про етичні принципи науково-методичних досліджень за участі людини (1964–2000), Універсальної декларації з біоетики та прав людини (ООН, 1997), норм Конвенції про захист прав людини у зв'язку із впровадженням нових біомедичних технологій (м. Ов'єдо, Іспанія, 1997), Декларації принципів толерантності (1995), наказу МОЗ України від 13.02.2006 р. № 66. Усі обстежені дали письмову добровільну згоду на участь у до-

слідженні. Вжито необхідних заходів для забезпечення анонімності обстежуваних.

Дослідження проводили в тихому, добре провітрюваному затемненому приміщенні з постійною температурою +20…+22 ºС, у ранкові години, що дозволило виключити вплив добових коливань варіабельності серцевого ритму (ВСР) на результати дослідження (Kiselev et al., 2008).

Накладення електродів і реєстрацію електричної активності кори головного мозку проводив сертифікований лікар-діагност Дніпропетровської клінічної лікарні на залізничному транспорті в кабінеті функціональної діагностики. Під час ЕЕГ-експерименту обстежувані перебували у звуко- та світлонепроникній кімнаті у положенні сидячи в кріслі на відстані 1,5 м від монітора комп'ютера. Перед початком дослідження їм давали інструкцію про хід експерименту.

У процесі розумової діяльності здійснювали реєстрацію та первинний аналіз ЕЕГ-активності за допомогою апаратно-програмного комплексу DX-NT32.V19 (виробник «DX-Complex», LTD, м. Харків, Україна). ЕЕГ відводили з поверхні шкіри із застосуванням стандартних методичних прийомів. Активні електроди розміщували за схемою 10–20 у 16 точках на скальпі: використовували лобові (Fp_1, Fp_2, F_3, F_4, F_7, F_8), центральні (C_3, C_4), скроневі (T_3, T_4, T_5, T_6), тім'яні (P_3, P_4), потиличні (O_1, O_2) відведення. Референтом слугували поєднані електроди AV, які фіксували на мочках вух. Нейтральний електрод розташовувався на ділянці лоба. Кожна піддослідна брала участь у дослідженні двічі: попереднє обстеження на відсутність патологій і власне дослід.

Реєстрували п'ятихвилинні інтервали ЕЕГ. Під час проведення Фур'є-реалізації епоха аналізу складала 500 мс. Частота дискретизації аналогового сигналу становила 2 мс; вхідний опір для синфазного сигналу – понад 100 МОм. Фільтри високих частот установлювали на 50 Гц, низьких – 0,5 Гц. Межі можливої відносної похибки під час вимірювання напруги та часових інтервалів електроенцефалографічних сигналів – ±5%. Видалення ЕЕГ-артефактів проводили експертним методом у режимі перегляду запису, згідно з програмою приладу.

Сумарна тривалість чистого запису варіювала від студентка до студентки. Для того, щоб уникнути впливуючих обставин на параметри ЕЕГ, які у подальшому аналізували, визначили найкоротший «чистий» запис у кожної дослідженої. Таким чином аналізували 4-хвилинний запис, для якого розраховували значення нормованої спектральної потужності та когерентність для симетричних півкулевих та міжпівкулевих пар відведень у частотних смугах, що відповідають δ (1–4 Гц), θ (4–8), α (8–13), β_1 (20–30) та β_2 (50–70 Гц) ритмам.

Дослідження проводили у два етапи: на першому етапі вивчали індивідуальні психофізіологічні особливості студентів. За результатами тестування відбирали однорідні групи для подальшого дослідження. Когнітивні завдання підбирали з числа тих, які використовують практичні психологи, відповідно до особливостей кожної методики (Posner et al., 2007; Klimesch et al., 2010).

Вербально-логічне мислення вивчали за тестом М. Войнаровського (Schroeder and Lakatos, 2009). Цей тест спрямований на визначення здібності до логічного мислення у досліджуваного та визначення формальної правильності того чи іншого логічного умовиводу на основі визначених тверджень (або низки тверджень). Тест не потребує математичних знань. Усі слова потрібно тлумачити так, як це робиться у повсякденній мові. Реальна дійсність не відіграє ніякої ролі (це дещо ускладнює завдання, оскільки зміст деяких тверджень абсурдний, але тест логічно неперевершений).

Після кожного тесту робили перерву на 15 хвилин. Фіксували самопочуття піддослідних.

У кінці дослідження визначали коефіцієнт успішності (продуктивність) виконання завдання у відсотках, відмічаючи та оцінюючи обрані відповіді. Значення до 50% правильних відповідей вважали низькими, 51–75% – середніми, а понад 76% – високими. Для подальшого дослідження обрано дві групи піддослідних із низьким і середнім рівнем продуктивності виконання завдання.

Матеріали досліджень оброблені статистичними методами, із застосуванням аналізу та регресійного моделювання за допомогою статистичних пакетів Statistica 6.0. Використовували методи непараметричної статистики: медіану та інтерактивний розмах. Шляхом математичної обробки на основі алгоритму швидкого перетворення Фур'є розраховували такі кількісні параметри ЕЕГ як інтенсивність електричної активності, що характеризує активацію кори головного мозку в зоні відведення, та величини кроскореляційної функції попарно взятих відведень, які відображають рівень просторової синхронізації. Порівняння вибірок проводили за допомогою критерію знакових рангових сум Вілкоксона.

Результати та їх обговорення

Попередньо, за результатами комплексного дослідження визначилися з категорією досліджуваних осіб: амбіверти, холерично-сангвіничного типу темпераменту, з помірним рівнем тривожності та високим рівнем стресостійкості, праворукі, або правші, з відсутністю астенії, яких за розвитком мислення поділили на групи з низьким і середнім проявом словесно-логічного типу мислення.

Під час розв'язання логічних задач у студентів обох груп у цілому спостерігали зниження спектральної потужності коливань α-діапазону в 1,5–3,6 раза порівняно з фоновими значеннями, що відповідає стану «відкриті очі». При цьому у досліджуваних із низьким рівнем розвитку логічного мислення вірогідне зниження потужності α-осциляцій виражене майже в усіх ділянках, крім фронтальних відділів. Зафіксовано вірогідне зниження СП у групи студентів із середнім рівнем розвитку логічного мислення в 1,5–2,8 раза в усіх без винятку ділянках мозку, найбільш виражене у точках F_3, F_4, P_3, P_4, O_1, O_2, T_5,T_6 (рис. 1).

Пік α-ритму позитивно корелює з різними когнітивними функціями: увагою, пам'яттю, швидкістю перебігу інформаційних процесів (Klimesch, 1997; Klimesch, 1999; Angelakis et al., 2004). Зниження потужності α-ритму під час когнітивного навантаження, наприклад, під час розв'язання арифметичних задач відбувається зниження потужності α-ритму внаслідок використання робочої пам'яті, що спричиняє пригнічення α-ритму на ЕЕГ.

Результати порівняння (за U-критерієм Манна – Уїтні) значень СП у студенток із різним рівнем розвитку логічного мислення свідчать про вірогідне збільшення СП α-хвиль у більш продуктивних осіб у фронтальних F_3, F_7, центральних C_3, C_4, тім'яних P_3, P_4 та у скроневому T_5 відведеннях (рис. 2).

Під час виконання логічних завдань у студентів із низьким рівнем розвитку даної когнітивної здібності відмічається збільшення СП β_1-осциляцій у Fp_2, P_3, O_2 відведеннях, а у студентів із середнім рівнем розвитку логічного мислення, навпаки, зниження СП β_1-осциляцій у центральному C_4 та тім'яному P_4 відведеннях. Спектральна потужність β_2-осциляцій у студентів із різним рівнем розвитку логічного мислення коливається в межах фонових значень і знижується в окремих ділянках. Як вказують Dordzhieva and Pantina (2015), із розвитком логічного мислення найбільш різноспрямовані зміни спектральної потужності β-ритму встановлено у фронтальному F_7, скроневому T_6 і центральних відведеннях. Слід зазначити, що пред'явлені завдання були не складними для студентів, не були пов'язані з розвитком втоми, яка виражалась би у значному посиленні потужності β-ритму (Kiroj, 2003).

Результати порівняння (за U-критерієм Манна – Уїтні) значень СП β_1-осциляцій у студентів із різним рівнем розвитку логічного мислення свідчать про вірогідне збільшення потужності у фронтальному F_7 та потиличних відведеннях. Розвиток логічного способу мислення відбивається і на вірогідному збільшенні СП β_2-коливань у фронтальному відведенні F_7 у лівій півкулі мозку, а також β_2-осциляцій – у тім'яному P_3 і скроневих T_3, T_4 відведеннях (рис. 2).

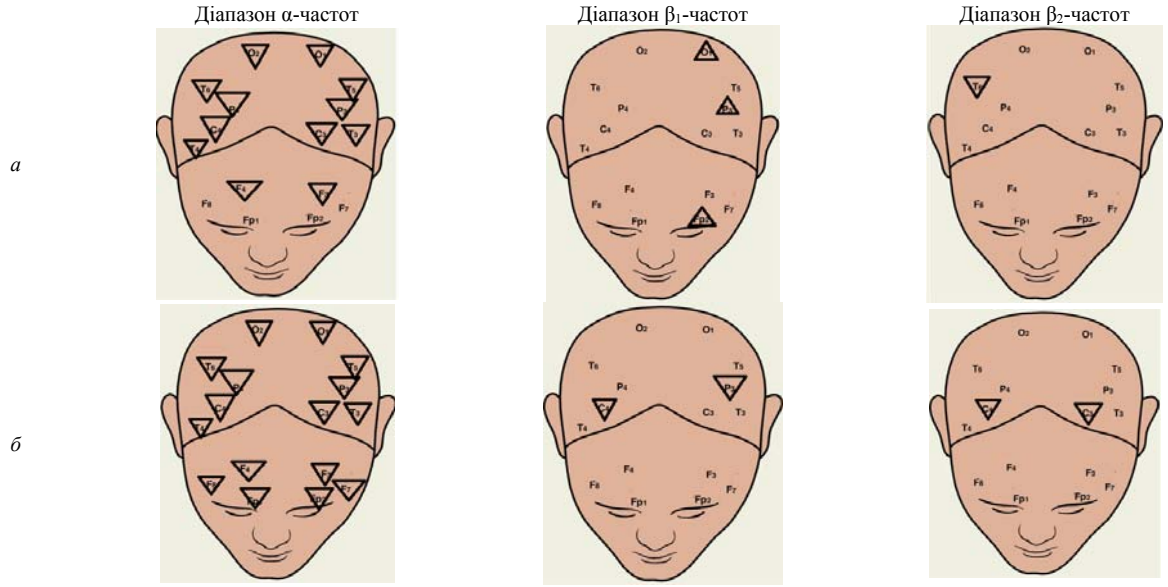


Рис. 1. Зміни показників потужності високочастотних складових ЕЕГ у процесі словесно-логічного мислення у студентів з низьким (*а*) і середнім (*б*) проявом продуктивності мислення порівняно зі станом спокою із закритими очима; трикутник із вершиною донизу свідчить про зниження, з вершиною доверху – про зростання СП частот α, β_1, β_2-діапазону, за рівня значимості $P < 0,05$ за критерієм Вілкоксона

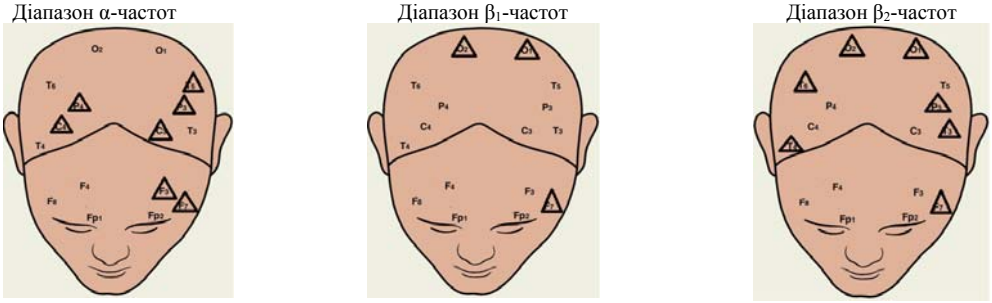


Рис. 2. Ділянки вірогідних змін СП високочастотних складових ЕЕГ у студентів із середнім рівнем прояву словесно-логічного мислення порівняно зі студентами з низькою продуктивністю за рівня значимості $P < 0,05$ за U-критерієм Манна – Уїтні: позначення див. рис. 1

В осіб із низьким рівнем розвитку логічного мислення під час проходження тесту на логіку у біоелектричній активності виявили поліритмічну активність із домінуванням δ-ритму (рис. 3), хоча вірогідне збільшення СП δ-діапазону (відносно фонових значень) відмічали лише у правому потиличному відведенні O_2. В осіб із середнім рівнем прояву логіки під час дослідження на логічний тип мислення реєстрували поліритмічний тип біоелектричної активності. Разом із тим у цієї групи досліджених під час виконання завдання встановили збільшення СП δ-осциляцій у фронтальних Fp_1, Fp_2, F_7, F_8 потиличних та лівій скроневій T_3 ділянках кори головного мозку.

Під час виконання завдань на логічне мислення у студентів із низьким проявом цієї розумової здібності значимих змін у показниках СП θ-діапазону не зафіксовано. А в осіб із середнім проявом словесно-логічного мислення вірогідне збільшення встановлене у передніх Fp_1, Fp_2, F_7 й у O_2 відведеннях.

Результати порівняння значень СП низькочастотних δ- та θ-складових у студентів із різним рівнем розвитку логічного мислення свідчать про збільшення потужності коливань у фронтальних ділянках кори: у δ-діапазоні зони F_7, F_8 та у θ-діапазоні – зони F_3, F_4 у студентів із більш розвиненими схильностями до логічних операцій (рис. 4).

Характер змін показників когерентності біопотенціалів кори головного мозку у процесі словесно-логічного мислення. У групи студентів із низьким рівнем прояву словесно-логічного мислення α-хвилі у фронтальних центральних, скроневих і потиличних відведеннях мали високі когерентні зв'язки з іншими структурами кори тільки у парах F_4–F_7, Fp_1–P_3 ці зв'язки були більш поширеними (рис. 5). Спостерігався високий ступінь зв'язку між фронтальними Fp_1 та Fp_2, Fp_1 й F_8 і скроневим T_5 відведеннями та деяка синхронність між фронтальними та скроневими, центральними та парієтальними зонами. Вважаємо, що в осіб із низькою продуктивністю логічного мислення нечисленні синхронні зв'язки пов'язані із психовегетативними проявами, які виникали як реакції на складні завдання, саме такі реакції спостерігали Machinskaja and Koshel'kov (2010) за психовегетативних і нервозних синдромів.

У студентів із середнім рівнем прояву словесно-логічного мислення посилюються функціональні зв'язки між фронтальними Fp_1–Fp_2 точками (КК = 0,87). У передній частині півкуль установлено середні рівні коефіцієнта когерентності (КК) F_4–F_3, Fp_1–F_7, Fp_1–F_8, Fp_2–F_7, Fp_2–F_8. Більшість значущих КК між фронтальними зонами F_3, F_4 і центральними, тім'яними та скроневими ділянками обох півкуль. Щодо центральних структур мозку, то більш функціонально зв'язана з різними відділами кори точка C_3, а активність в області C_4 когерентна з тім'яною P_4 та деякими фронтальними F_3, F_4, F_7, F_8 та T_4 скроневою зонами. Картина синхронної роботи тім'яних ділянок подібна у відведеннях F_3, F_4 та має зв'язок у парі F_4–Fp_2. У відведенні O_1 встановлені значимі зв'язки тільки з C_3, O_2, T_4 областями.

Отже, ґрунтуючись на отриманих даних, можна констатувати, що вищий прояв логічного мислення збільшує функціональний зв'язок α-хвиль в області фронтальних і центральних частинах кори головного мозку.

У студентів із низьким рівнем логічного мислення кількість значущих функціональних зв'язків невелика, а високий ступінь когерентності (КК ≥ 8,0) СП спостерігався у β_1-діапазоні між фронтальними Fp_2–F_8, центральними та скроневими C_4–T_4 та

скроневими T_3–T_5 відведеннями. Із розвитком здібності до словесно-логічного мислення залишаються значимими КК у β_1-діапазоні між фронтальними F_3–F_4, F_4–C_4, центральними та тім'яними C_3–P_3, C_4–P_3, C_4–P_4, потиличними O_1–O_2 відведеннями, а також установлено достатньо високі функціональні зв'язки між F_3–T_6, F_3–C_4 та F_4–P_3, F_7–O_1, F_8–O_1, T_3–T_5 ділянками кори.

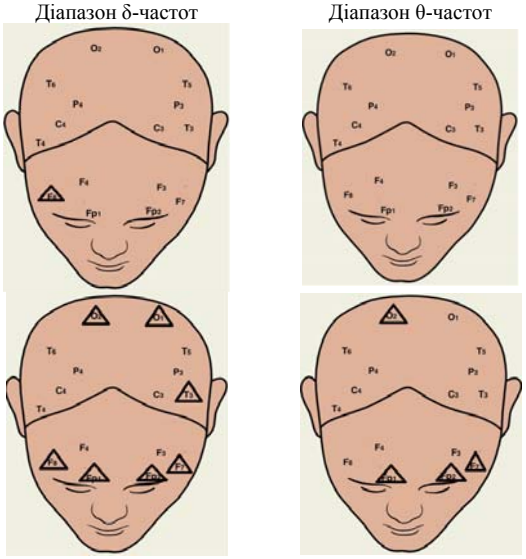


Рис. 3. Зміни показників потужності низькочастотних складових ЕЕГ у процесі інтуїтивного мислення у студентів із низьким (*а*) і середнім (*б*) проявом продуктивності мислення порівняно зі станом спокою із закритими очима; трикутник із вершиною донизу свідчить про зниження, з вершиною догори – про зростання СП частот δ, θ-діапазону за рівня значимості $P < 0,05$ за критерієм Вілкоксона

Загальна кількість когерентних зв'язків в осіб із середнім рівнем прояву логічного мислення більша, ніж у студентів із низькими показниками продуктивності. Отже, з розвитком логічного мислення найбільші зміни спектральної потужності β-ритму встановлені у фронтальному F_7, скроневому T_6 і центральних відведеннях. На підвищення β-ритмів у потиличних і лобних областях за активною розумовою діяльністю дітей із високими якостями когнітивної активності вказують автори (Dordzhieva and Pantina, 2015). Крім того, слід відмітити, що завдання були не складними для студентів, тобто їх виконання не викликало розвитку втоми, яка виражалась би у значному посиленні потужності β-ритму (Kiroj, 2003), а цього ми не спостерігали у жодного піддослідного.

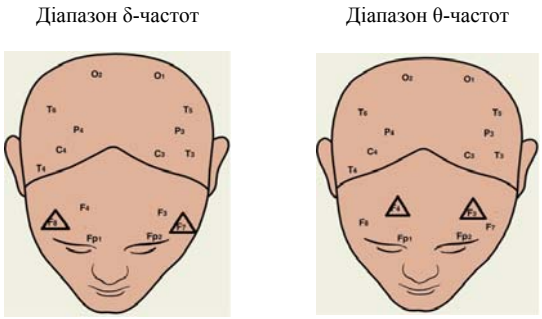


Рис. 4. Ділянки вірогідного зниження СП низькочастотних складових ЕЕГ у студентів із середнім рівнем прояву інтуїтивного мислення порівняно зі студентами з низькою продуктивністю за рівня значимості $P < 0,05$ за U-критерієм Манна – Уїтні; позначення див. рис. 3

У групи студентів із низьким рівнем прояву логічного мислення встановлено високу когерентність в β_2-діапазоні у передніх Fp_2–O_1, F_3–C_3, F_3–C_4, F_3–T_4 та центральних C_3–T_6 відведеннях і високі міжпівкульні потиличні O_1–O_2 взаємодії. У студентів із середнім рівнем розвитку логічного мислення існує синхронізація між фронтальними Fp_1–Fp_2, Fp_2–F_7 та F_3–F_4, C_3–C_4, O_1–T_5, T_3–T_4 відведеннями. Загальна кількість когерентних зв'язків у β_2-діапазоні осіб із середнім рівнем прояву логічного мислення більша, ніж у студентів із низькими показниками під час виконання завдань на логіку.

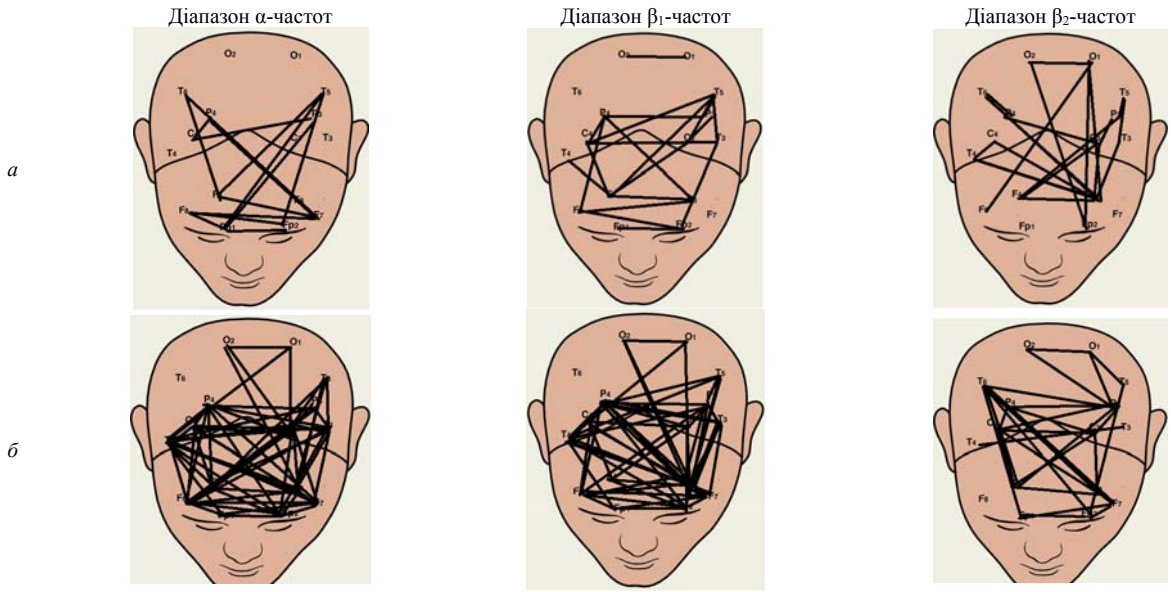


Рис. 5. Вірогідне збільшення ($P < 0,05$) когерентності біопотенціалів α, β_1, β_2-складових ЕЕГ під час наочно-образного мислення у студентів із низьким (*а*) і середнім (*б*) проявом продуктивності мислення порівняно зі станом спокою із закритими очима

Аналізуючи літературні дані, можна відмітити деякі особливості когерентності під час виконання різних типів когнітивних завдань. Petsche and Etlinger (1998) показали, що зміни активності біопотенціалів та когерентності областей мозку у β-діапазоні реєструються під час виконання завдань на творче мислення та пов'язані з ефективністю їх виконання. Відмічають, що у більшості завдань показники когерентності більш індикативні, ніж характеристики потужності ритмів. Збільшення когерентності α, β, ϒ-діапазонів під час виконання зорово-моторного завдання також зазначено у дослідженнях із застосуванням електродів, які накладались безпосередньо на кору мозку (Aoki et al., 2001). Також існують праці, в яких показано, що

посилення когерентності не завжди корелює з успішністю виконання завдання. Автори (Deeny et al., 2003, 2009) припускають, що у разі автоматизації навички когерентність між зонами мозку знижується, отже, менша когерентність може відповідати більш успішній діяльності.

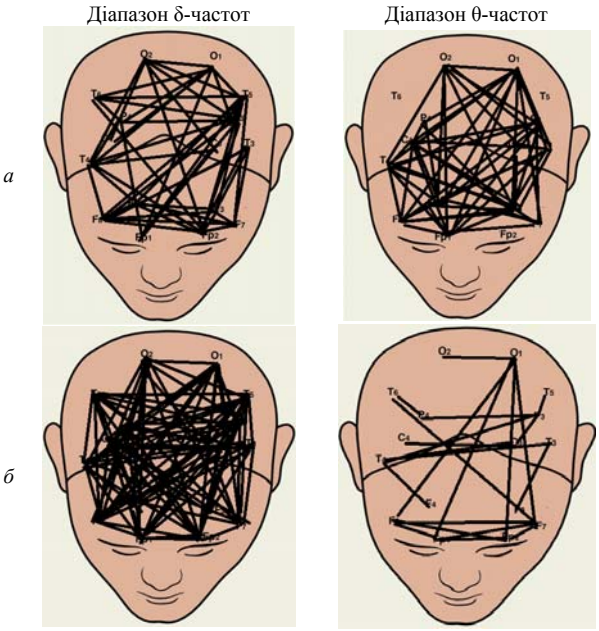


Рис. 6. Вірогідне збільшення ($P < 0,05$) когерентності біопотенціалів δ-, θ-складових ЕЕГ у процесі словесно-логічного мислення у студентів із низьким (*а*) і середнім (*б*) проявом продуктивності мислення порівняно зі станом спокою із закритими очима

Під час виконання завдання на логіку у студентів з незначним проявом цього типу мислення встановлені функціональні зв'язки у δ-діапазоні між багатьма структурами як передніх, так і задніх відділів кори головного мозку. В осіб із більш вираженими здібностями до словесно-логічного мислення збільшується як КК у δ-діапазоні, так і загальна кількість когерентних зв'язків (рис. 6). Подібні результати отримані Zhavoronkova et al. (2011), які показали, що виконання когнітивних завдань супроводжується збільшенням когерентності повільних складових ЕЕГ (δ- та θ-діапазону) із включенням лівої півкулі та лобних областей кори.

Отже, оскільки природа зміни δ-ритму донині остаточно не вивчена, згідно з традиційними поглядами, складна розумова активність супроводжується виникненням дифузного δ-ритму, збільшенням його потужності (Rusinov, 1973). У дослідженні Dordzhieva and Pantina (2015) установлено домінування δ-ритму як у стані неспання, так під час розумової активності незалежно від розумових здібностей у дітей.

У студентів із низькими результатами виконання тесту на словесно-логічне мислення встановлені високі когерентні залежності у θ-діапазоні між фронтальними ділянками та іншими відділами Fp_1–C_4, Fp_1–P_3, Fp_1–O_1, Fp_1–T_4, F_3–F_4, F_4–C_4, F_4–P_3, F_4–O_1, F_4–T_4, F_8–C_4, F_8–P_3, центральними та скроневими C_4–T_4, потиличними та тім'яними та скроневими P_3–O_1, O_1–T_3, O_1–T_4, скроневими між собою T_3–T_4. Із розвитком словесно-логічного способу мислення головний мозок переходить в особливий режим функціонування з низьким функціональним зв'язком в області θ-осциляцій.

Синхронізація біоелектричної активності в області θ-ритму збільшується під час виконання завдань, які вимагають утримання інформації у робочій пам'яті (Sarnthein et al., 1998; Tesche and Karhu, 2000). Отримані дані дозволяють розглядати збільшення ступеня функціональної взаємодії коркових зон на основі θ-ритмів як показник сформованої стратегії та залучення лімбічних структур у реалізацію когнітивних процесів (Bernat et al., 2008). Результати нашого дослідження також дозволяють припустити, що специфічна роль фронтальних полюсних і центральних зон забезпечується їх взаємодією на основі синхронізації θ-ритму з іншими корковими та глибинними структурами мозку. Це можуть бути лімбічні структури, робота яких пов'язана з утриманням уваги, самоконтролем, оцінюванням результатів своєї діяльності (Posner et al., 2007), а також структури, які відповідають за утримання інформації пам'яті – гіпокамп, тім'яна кора, специфічні коркові зони. Таким чином, виявлені особливості топографії функціональних зв'язків під час виконання когнітивних завдань: локалізація фокусів взаємодії на α- та β-частотах у лобних полюсних ділянках та інтеграція цих фронтальних зон з іншими ділянками кори, що повністю збігається з висновками (Segalowitz and Dywan, 2009).

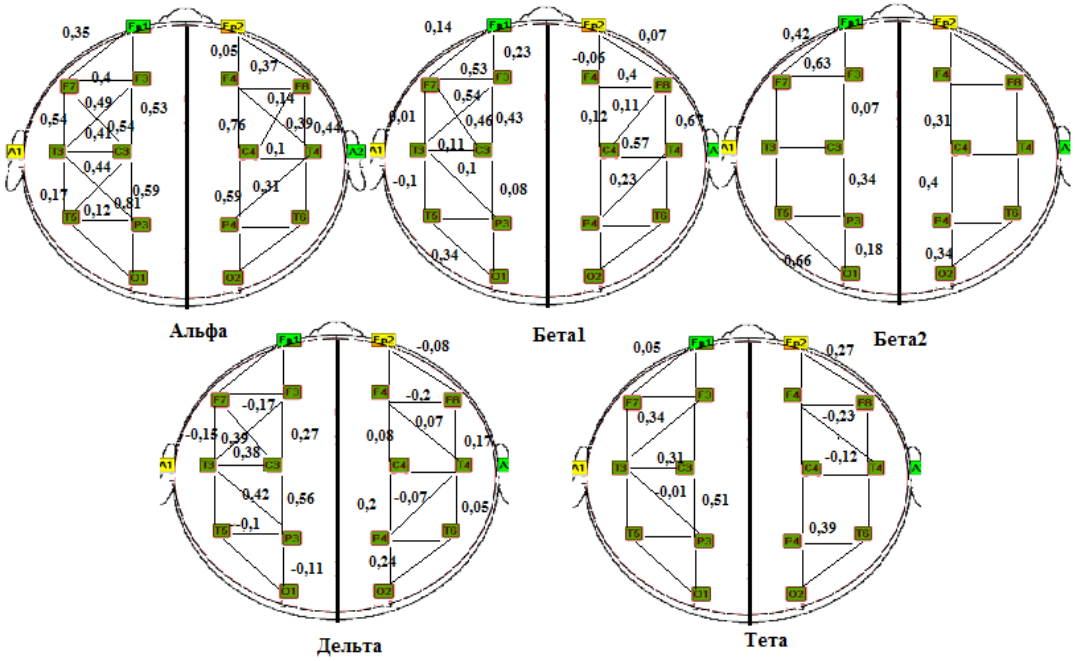


Рис. 7. Карти різниці вірогідних змін когерентності внутрішньокульових складових ЕЕГ у студентів із різним проявом словесно-логічного мислення

Із розвитком здатності до логічного мислення встановлено найбільшу кількість значимих коефіцієнтів когерентності на δ-частоті, оскільки саме вона формує вхідний сенсорний потік, це «спеціальні частоти» сприйняття, пов'язані з селективною увагою (Schroeder and Lakatos, 2009) та у β_1-діапазоні, що може бути як ознакою високого рівня IQ студентів-біологів, так і ознакою когнітивного контролю (Engel and Fries, 2010) та реакцією на нові сигнали (у нашому випадку незнайомі слова). Незначна кількість кореляцій у β_2-діапазоні свідчить про зниження синхронізації між віддаленими нейронними ансамблями (Kukleta et al., 2009). У цьому частотному діапазоні більше синхронізована активація фронтальної, центральної, тім'яної та потиличної зоні лівої півкулі, а також фронтальної, центральної та тім'яної частин правої півкулі, що забезпечило комплексний логіко-семантичний аналіз вербальної інформації, аналіз сенсу речень і слів із залученням асоціативної кори (рис. 7).

Для лобної зони лівої півкулі характерна синхронізація активності у β-частотному діапазоні, що збігається з результатами дослідження Thatcher et al. (2005), в яких показано, що рівень інтелекту корелює зі складністю організації мозку та синхронізацією активності в лобній зоні вищого рівня активності мозку у δ-діапазоні (Tongran et al., 2008). У студентів із кращим проявом логічного мислення встановлені найнижчі рівні функціонального зв'язку у θ-діапазоні. Взагалі активність у цьому ЕЕГ-інтервалі пов'язують із координацією міжрегіональних взаємодій під час виконання поставлених завдань і контролем за помилковістю відповідей (Bernat et al., 2008), отже, відсутність значущих змін у θ-діапазоні свідчить про збереження попередньо сформованої нейромежі, тобто словесно-логічні тести виконуються в рамках єдиної нейромережі. У праці Kupa and Filimonova (2014) під час обговорення власних результатів дослідження використано аргумент (Sauseng and Klimesch, 2008), що нейромережі різного розміру припускають осциляції різних частот: більші генерують нижчі частоти, що можна привести на користь припущення про певне звуження нейромережі, яка здійснює координацію між зонами Брока та Posterior cingulate cortex. За підвищення здатності до успішного виконання словесно-логічних завдань збільшується кількість значущих КК в α-діапазоні у лівій фронтальній зоні (рис. 7). Це можна пояснити пошуком спільних рис тверджень у ділянках поблизу зони Верніке, що пов'язано з активізацією специфічних процесів семантичного аналізу та визначенням сенсу слів та збільшенням кількості значущих коефіцієнтів когерентності у контурній області F_4–F_8–T_4–P_4 правої півкулі, що, у свою чергу, пов'язано з образним уявленням слів у правій асоціативній корі.

Незважаючи на значний прогрес у розумінні окремих моментів функціонування мозку у процесі когнітивної діяльності, ще не існує чіткого розуміння зв'язку окремих ритмів та їх взаємодії з успішністю інтелектуальної діяльності. Успішність виконання завдання пов'язують як зі збільшенням когерентності або потужності різних ритмів ЕЕГ, так і зі зниженням. Таким чином, результати різних досліджень мають досить суперечливий характер і залежать від конкретного типу завдань, а також умов діяльності, що не дозволяє виділити чіткі кореляти успішності когнітивної діяльності (Karatygin, 2015). Але, незважаючи на всю складність питання дослідження механізмів вищих психічних функцій мислення, у будь-якому випадку простежується залежність між типом завдання, стратегією виконання поставленого завдання та мозковими корелятами.

Висновки

Під час виконання словесно-логічних завдань у студентів із більш розвиненим типом когнітивного мислення збільшується кількість значущих коефіцієнтів когерентності в α-діапазоні, як у лівій фронтальній зоні та у ділянках поблизу зони Верніке, а також у контурній області F_4–F_8–T_4–P_4 правої півкулі, що пов'язано з пошуком спільних рис оцінювання тверджень, активізацією специфічних процесів аналізу, визначенням сенсу слів і образним уявленням у процесі мислення.

У студентів із середнім рівнем словесно-логічного мислення під час виконання завдань зафіксовано значну кількість значущих функціональних зв'язків та високі значення коефіцієнтів когерентності між фронтальними F_3–F_4, F_4–C_4, центральними та тім'яними C_3–P_3, C_4–P_3, C_4–P_4 і потиличними O_1–O_2 відведеннями у β_1-діапазоні, що може бути як ознакою високого рівня інтелекту студентів-біологів, так і результатом когнітивного контролю або реакцією на незнайомі слова.

Загальна кількість когерентних зв'язків у β_2-діапазоні студентів із середнім рівнем прояву логічного мислення більша, ніж у студентів із низькими показниками під час виконання завдань на логічне мислення. Також існує синхронізація СП β_2-діапазону між передніми Fp_1–Fp_2, Fp_2–F_7, F_3–F_4 та іншими C_3–C_4, O_1–T_5, T_3–T_4 відведеннями.

Із розвитком здатності до когнітивного мислення збільшується кількість когерентних зв'язків СП ЕЕГ в області δ-діапазону, оскільки саме вони формують вхідний сенсорний потік і пов'язані із селективною увагою.

Із розвитком словесно-логічного способу мислення головний мозок переходить в особливий режим функціонування з низьким функціональним зв'язком в області θ-осциляцій, що свідчить про збереження попередньо сформованої нейромережі.

References

Angelakis, E., Lubar, J., Stathopoulou, S., & Kounios, J. (2004). Peak alpha frequency: An electroencephalographic measure of cognitive preparedness. Clinical Neurophysiology, 115, 887–897.

Aoki, F., Fetz, E. E., Shupe, L., Lettich, E., & Ojemann, G. A. (2001). Changes in power and coherence of brain activity in human sensorimotor cortex during performance of visuomotor tasks. Biosystems, 63(1–3), 89–99.

Bernat, E., Lindsay, D., Holroyd, B., & Gehring, W. (2008). Separating cognitive processes with principal components analysis of EEG time-frequency distributions. Proceedings of SPIE – The International Society for Optical Engineering, 7074, 326–333.

Bidelman, G. M., & Howell, M. (2016). Functional changes in inter- and intra-hemispheric auditory cortical processing underlying degraded speech perception. Neuroimage, 124, 581–590.

Cohen, M. X., Elger, C. E., & Ranganath, C. (2007). Reward expectation modulates feedback-related negativity and EEG spectra. Neuroimage, 35(2), 968–978.

Crick, F., & Koch, C. (1995). Are we aware of neural activity in primary visual cortex? Nature, 375, 121–123.

Deeny, S. P., Haufler, A. J., Saffer, M., & Hatfield, B. D. (2010). Electroencephalographic coherence during visuomotor performance: A comparison of cortico-cortical communication in experts and novices. Journal of Motor Behavior, 41(2), 106–116.

Deeny, S. P., Hillman, C. H., Janelle, C. M., & Hatfield, B. D. (2003). Cortico-cortical communication and superior performance in skilled marksmen: An EEG coherence analysis. Journal of Sport and Exercise Psychology, 25(2), 188–204.

Dordzhieva, D. B., & Pantina, E. E. (2015). Biojelektricheskaja aktivnost' golovnogo mozga individov s razlichnym urovnem myslitel'noj dejatel'nosti [Bioelectrical activity of the brain of individuals with different levels of mental activity]. Estestvennye i Matematicheskie Nauki v Sovremennom Mire, 4, 28 (in Russian).

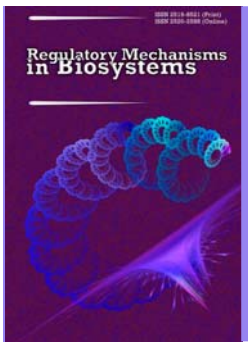
Dzhebrailova, T. D., & Korobejnikova, I. I. (2013). Prostranstvennaja organizacija beta2-ritma EEG i effektivnosti kognitivnoj dejatelnosti cheloveka [Spatial organization of the EEG beta2-rhythm and the effectiveness of human cognitive activity]. I. P. Pavlov Journal of Higher Nervous Activity, 63(6), 667–676 (in Russian).

Dzhebrailova, T. D., Korobeinikova, I. I., Dudnik, E. N., & Karatygin, N. A. (2015). Spatial organization of alpha range potentials on EEG and logical thinking effectiveness. Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 159(2), 184–187.

Dzhebrailova, T. D., Korobeinikova, I. I., Dudnik, E. N., & Karatygin, N. A. (2017). Vzaimosvyaz' parametrov teta i beta-aktivnosti EEG i variabel'nosti serdechnogo ritma pri intellektual'noy deyatel'nosti cheloveka [Interrelation between theta and beta activity parameters of the EEG and heart rate variability in human intellectual activity]. Human Physiology, 43(2), 91–105 (in Russian).

Dzhebrailova, T. D., Korobejnikova, I. I., & Karatygin, N. A. (2013). Kogerentnost' potencialov β1 diapazona EEG i effektivnost' intelektualnej deyatelnosti cheloveka [EEG coherence in the ß1 frequency band and efficiency of human intellectual activity]. Journal of New Medical Technologies, 20(3), 71–74 (in Russian).

Engel, A. K., & Fries, P. (2010). Beta-band oscillations-signalling the status quo? Current Opinion in Neurobiology, 20(2), 156–165.
Fink, A., Hauswirth, V., Fally, M., Neuper, C., Neubauer, A. C., Grabner, R. H., Benedek, M., Reishofer, G., & Ebner, F. (2009). The creative brain: Investigation of brain activity during creative problem solving by means of EEG and FMRI. Human Brain Mapping, 30(3), 734–748.
Freeman, W. J., & Barrie, J. M. (2000). Analysis of spatial patterns of phase in neocortical gamma EEGs in rabbit. Journal of Neurophysiology, 84(3), 1266–1278.
Freunbergera, R., Werkle-Bergnera, M., Griesmayrb, B., Lindenbergera, U., & Klimeschb, W. (2011). Brain oscillatory correlates of working memory constraints. Brain Research, 1375, 93–102.
Gross, D. W., & Gotman, J. (2009). Correlation of high-frequency oscillations with theslep-wake cycle and cognitive activity in humans. Neuroscience, 94(4), 1005–1018.
Hyunjeong, L. (2013). The effect of film as the virtual context on logical thinking of engineering students. Journal of Engineering Education Research, 16, 3–10.
Ivanitsky, G. A., Naumov, R. A., & Roik, A. O. (2010). EEG portrait of a person: characteristic patterns of brain rhythms under cognitive load of certain types. International Journal of Psychophysiology, 77(3), 314.
James, N. (2012). Logical, critical and creative: teaching 'thinking skills' to law students. Queensland University of Technology Law and Justice Journal, 12(1), 66–88.
Jashin, B. L. (2015). Racional'nost' i logicheskoe myshlenie [Rationality and logical thinking]. Filosofskaja Mysl', 10, 75–87 (in Russian).
Kiroj, V. N. (2003). Fiziologicheskie metody v psihologii [Physiological methods in psychology]. CVVR, Rostov-na-Donu (in Russian).
Kiselev, A. R., Gridnev, V. I., Posnenkova, O. M., Strunina, A. N., Shvarts, V. A., & Dovgalevskii, Y. P. (2008). Changes in the power of the low- and high-frequency bands of the heart rate variability spectrum in coronary heart disease patients with different severities of coronary atherosclerosis in the course of load tests. Human Physiology, 34(3), 312–318.
Klawitter, K., Öllinger, M., Faber, A., Filk, T., Timmer, J., & Schelter, B. (2010). Analysis of EEG data on complex human thinking. Clinical Neurophysiology, 41(1), 101.
Klimesch, W. (1997). EEG-alpha rhythm sand memory processes. International Journal of Psychophysiology, 26(1–3), 319–340.
Klimesch, W. (1999). EEG alpha and theta oscillations reflect cognitive and memory performance: A review and analysis. Brain Research Reviews, 29, 169–195.
Klimesch, W., Freunberger, R., & Sauseng, P. (2010). Oscillatory mechanisms of process binding in memory. Neuroscience and Biobehavioral Reviews, 34(7), 1002–1014.
Korobeinikova, I. (2016). Spektral'nye harakteristiki teta ritma JeJeG i jeffektivnost' intellektual'noj dejatel'nosti [Spectral EEG indicators of theta-rythm and efficiency of intellectual activity]. Tjumenskij Medicinskij Zhurnal, 18(2), 50–55 (in Russian).
Koshelkov, D. A., & Machinskaya, R. I. (2010). Functional coupling of cortical areas during problem-solving task: Analysis of θ-rhythm coherence. Human Physiology, 36(6), 665–669.
Kraft, E., Poeppel, E., & Gulyas, B. (2009). Neural correlates of thinking. Springer, Heidelberg.
Kukleta, M., Brázdil, M., Roman, R., Bob, P., & Rektor, I. (2009). Cognitive Network interactions and beta-2 coherence in processing non-target stimuli in visual oddball task. Physiological Research, 58, 139–148.
Kupa, L. V., & Filimonova, N. B. (2014). Zminy aktyvnosti golovnogo mozku cholovikiv pry vykonannja verbal'nyh subtestiv logichnogo vidboru ta vyznachennja zagal'nyh rys testu Amthauera [Changes of activity of cerebrum of men in performance of verbal subtests of logical selection and determination of general features of Amthauer test]. Bulletin of Cherkasy University, 295, 64–69 (in Ukrainian).
Limbach, K., & Corballis, P. M. (2017). Alpha-power modulation reflects the balancing of task requirements in a selective attention task. Psychophysiology, 54(2), 224–234.
Makeig, S., & Jung, T. (1996). Tonic, phasic, and transient EEG correlates of auditory awareness in drowsiness. Cognitive Brain Research, 4(1), 15–25.
Payne, B. R., & Peters, A. (2002). The cat primary visual cortex. Academic Press, San Diego.
Petsche, H., & Etlinger, S. C. (1998). EEG aspects of cognitive processes: A contribution to the proteus-like nature of consciousness. International Journal of Psychophysiology, 33(3), 199–212.
Poch, C., Campo, P., & Barnes, G. R. (2014). Modulation of alpha and gamma oscillations related to retrospectively orienting attention within working memory. European Journal of Neuroscience, 40(2), 2399–2405.
Posada, A., Franck, N., Vianin, P., Hugues, E., & Kilner, J. (2003). Augmentation of induced visual gamma activity by increased task complexity. European Journal of Neuroscience, 18(8), 2351–2356.
Posner, M. I., Sheese, B., Rothbart, M., & Tang, Y. Y. (2007). The anterior cingulate gyrus and the mechanism of self-regulation. Cognitive, Affective, and Behavioral Neuroscience, 7(4), 391–395.
Rappelsberger, P., Sarnthein, J., von Stein, A., & Petsche, H. (1999). Synchronization between temporal and parietal cortex during multimodal object processing in man. Cerebral Cortex, 9(2), 137–150.
Roik, A. O., & Ivanitsky, G. A. (2010). Patterns of brain rhythms while performing cognitive tasks with gradually changing properties. International Journal of Psychophysiology, 77, 314.
Rusinov, V. S. (1973). Klinicheskaja elektroencefalografija [Clinical electroencephalography]. Medicina, Moscow (in Russian).
Sarnthein, J., Petsche, H., Rappelsberger, P., Shaw, G. L., & von Stein, A. (1998). Synchronization between prefrontal and posterior association cortex during human working memory. Proceedings of the National Academy of Sciences. 95(12), 7092–7096.
Sauseng, P., & Klimesch, W. (2008). What does phase information of oscillatory brain activity tell us about cognitive processes? Neuroscience and Biobehavioral Reviews, 32(5), 1001–1013.
Sauseng, P., Conci, M., Wild, B., & Geyer, T. (2015). Predictive coding in visual search as revealed by cross-frequency EEG phase synchronization. Frontiers in Psychology, 6, 1–5.
Schroeder, C. E., & Lakatos, P. (2009). Low-frequency neuronal oscillations as instruments of sensory selection. Trends in Neurosciences, 32(1), 9–18.
Segalowitz, S. J., & Dywan, J. (2009). Individual differences and developmental change in the ERN response: Implications for models of ACC function. Psychological Research, 73(6), 857–870.
Simos, P. G., Papanikolaou, E., Sakkalis, E., & Micheloyannis, S. (2002). Modulation of gamma-band spectral power by cognitive task complexity. Brain Topography, 14(3), 191–196.
Slavutskaya, E. V. (2015). Slovesno-logicheskoe myshlenie i strukturirovanie lichnostnyh chert v predpodrostkovom vozraste [Verbal-logical thinking and the structuring of the preadolescents personality traits]. Izvestiya of Saratov University. New Series. Series: Educational Acmeology. Developmental Psychology, 4(3), 203–207 (in Russian).
Sviderskaya, N. E. (2011). The EEG spatial pattern and psychophysiological characteristics of divergent and convergent thinking in humans. Human Physiology, 37(1), 31–38.
Tesche, C. D., & Karhu, J. (2000). Theta oscillations index human hippocampal activation during a working memory task. Proceedings of the National Academy of Sciences, 97(2), 919–924.
Thatcher, R. W., North, D., & Biver, C. (2005). EEG and intelligence: Relations between EEG coherence, EEG phase delay and power. Clinical Neurophysiology, 116, 2129–2141.
Thürer, B., Stockinger, C., Focke, A., Putze, F., Schultz, T., & Stein, T. (2016). Increased gamma band power during movement planning coincides with motor memory retrieval. NeuroImage, 125, 172–181.
Tongran, L., Jiannong, S., Daheng, Z., & Jie, Y. (2008). The relationship between EEG band power, cognitive processing and intelligence in school-age children. Psychology Science Quarterly, 50(2), 259–268.
Trofimov, A. G., Ivanitskiy, I. I., & Velichkovskiy, B. M. (2015). Klassifikacija signalov EEG s ispol'zovaniem "zhadnogo" algoritma postroenija komiteta klassifikatorov [Classification of EEG signals using a "greedy" algorithm for constructing a committee of weak classifiers]. Vestnik Natsional'nogo Issledovatel'skogo Yadernogo Universiteta MIFI, 4(6), 537–544 (in Russian).
Volf, N. V., & Tarasova, I. V. (2010). The relationships between EEG Θ and β oscillations and the level of creativity. Human Physiology, 36(2), 132–138.
Zhavoronkova, L. A., Kuptsova, S. B., Zharikova, A. V., Kushnir, E. M., & Mikhalkova, A. A. (2011). Characteristics of EEG reactivity changes during the performance of dual tasks in healthy subjects (voluntary postural control and calculation). Human Physiology, 37(6), 688–699.



Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(2), 252–258
doi: 10.15421/021739

Correction of vaginal dysbiosis in mice caused by a film-forming strain *Staphylococcus aureus*, using bacteriophages and probiotics

E. S. Vorobey, O. S. Voronkova, A. I. Vinnikov

Oles Honchar Dnipro National University, Dnipro, Ukraine

Article info

Received 28.03.2017
Received in revised form 27.04.2017
Accepted 29.04.2017

Oles Honchar Dnipro National University, Gagarin Ave., 72, Dnipro, 49010, Ukraine.
Tel.: +38-056-760-85-14.
E-mail: Elizaveta.vorobey89@gmail.com

Vorobey, E. S., Voronkova, O. S., & Vinnikov, A. I. (2017). Correction of vaginal dysbiosis in mice caused by a film-forming strain Staphylococcus aureus, using bacteriophages and probiotics. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(2), 252–258. doi:10.15421/021739

The complex use of bacteriophages and probiotics is a promising trend in improving prevention and treatment of gynecological lesions. Our study of their influence on the microflora was performed on the model of vaginal dysbiosis of white laboratory mice induced by introduction of a filmforming strain of *Staphylococcus aureus*. For correction of dysbiosis, staphylococcal bacteriophage liquid, piobacteriophage polyvalent, intesti-bacteriophage liquid and probiotic "Vahilak" were used. For the identification of the microflora of the reproductive tract, samples of biological material from the vagina were obtained by sterile cotton swab and plated on nutrient media to determine the nature and extent of growth of the cultures. The maximal effect was found to occur with the correctional complex "bacteriophage staphylococcal liquid – vahilak" that led to decrease of total microbial number to 4.77×10^4 CFU/ml and to the restoration of the ratio of aerobic to anaerobic bacteria 1 : 52 when indicators of the norm were $4{,}69 \times 10^4$ CFU/ml and 1 : 52. In this case, 24 hours after the last injection of the preparations the amount of microaerophilic and anaerobic lactobacilli had increased by 20.8 and 2.1 times respectively. The frequency of isolation of microaerophilic lactobacilli increased to 100%, and anaerobic – up to 70%. Also the number of staphylococci, streptococci, enterococci, bacilli and enterobacteria decreased by 30.1, 1.1, 1.5, 2.2 and 11.8 times respectively. Also, there was a decrease in the detection rate of enterococci, micrococci and enterobacteria by 10% and bacilli by 20% compared to the control dysbiosis. The number of anaerobic bacteria also underwent significant changes. Thus, the number of fusobacteria decreased by 33.2 times, peptococci – 2.3, peptostreptococci – 6.6 and *Bacteroides* – 7.9 times, which is almost consistent with indicators of the norm. In addition, the frequency of detection of peptostreptococci decreased by 10%. Therefore, it can be concluded that medical bacteriophages are active against lesions caused by able to film-forming staphylococci, *in vivo*, so they are appropriate to use in medical practice both independently and in combination with other agents.

Keywords: reproductive tract; biofilm; staphylococci; phage; vahilak; microflora

Корекція дисбіозу піхви мишей, викликаного плівкотвірним штамом *Staphylococcus aureus*, за допомогою бактеріофагів і пробіотиків

Є. С. Воробєй, О. С. Воронкова, А. І. Вінніков

Дніпровський національний університет імені Олеся Гончара, Дніпро, Україна

Найкращий корекційний ефект під час відновлення мікрофлори репродуктивного шляху спостерігали для комплексу «бактеріофаг стафілококовий рідкий – вагілак»: показане максимальне зниження загального мікробного числа до $4{,}77 \times 10^4$ КУО/мл і відновлення співвідношення кількості аеробів : анаеробів до 1 : 52 за показників норми $4{,}69 \times 10^4$ КУО/мл та 1 : 52. При цьому через 24 год. після останнього введення препаратів кількість мікроаерофільних і анаеробних лактобацил зросла у 20,8 та 2,1 раза відповідно. Частота виділення мікроаерофільних лактобацил збільшилася до 100%, а анаеробних – до 70%. Визначено зменшення кількості стафілококів, стрептококів, ентерококів, бацил і ентеробактерій у 30,1, 1,1, 1,5, 2,2 та 11,8 раза відповідно. Також спостерігали зменшення частоти виявлення ентерококів, мікрококів та ентеробактерій на 10%, а бацил – на 20% порівняно з контролем дисбіозу. Кількість анаеробних бактерій також зазнала значних змін. Кількість фузобактерій зменшилася у 33,2 раза, пептококів – у 2,3, пептострептококів – у 6,6, а бактероїдів – у 7,9 раза з досягненням значень норми. Спостерігали зменшення частоти виявлення пептострептококів на 10%. Можна зробити висновок, що використання лікувальних препаратів бактеріофагів у поєднанні з пробіотиками, які можуть впливати і на резистентні до антибіотиків штами бактерій, – перспективний напрям удосконалення профілактики та корекції дисбіотичних станів різних біотопів організму людини, у тому числі репродуктивного тракту.

Ключові слова: репродуктивний тракт; біоплівка; стафілокок; фаг; вагілак; мікрофлора

Вступ

За фізіологічної норми жіночий організм контактує з тисячами видів мікробів, перебуваючи з ними в симбіотичних відносинах. За впливу ендогенних і екзогенних факторів відбувається постійна зміна мікробіоти вагінального біотопу, що спричиняє порушення складу нормальної мікрофлори. Зменшення кількості лактобацил і збільшення анаеробних представників мікрофлори трактується як дисбіоз (Algburi et al., 2015; Machado and Cerca, 2015). Дисбіоз піхви можна розглядати як початковий етап формування інфекційного процесу з розвитком запальної реакції локального або системного характеру.

Значну небезпеку в гінекології (у зв'язку зі швидким набуттям антибіотикорезистентності та підвищенням патогенного потенціалу) являють аеробні представники факультативної та транзиторної флори вагінального біоценозу, зокрема, бактерії роду *Staphylococcus*. За глибоких дисбіотичних розладів на тлі масивної антибіотикотерапії золотистий стафілокок найчастіше стає збудником ендогенних інфекцій практично будь-якої локалізації, як самостійно, так і в асоціації з іншими потенційними патогенами. Збільшення кількості стафілококів у складі мікробіоти піхви – головний фактор, що зумовлює пригнічення розвитку представників нормальної мікрофлори цього біотопу, зокрема лактобацил.

Відповідно до сучасних даних, ключову роль у патогенезі дисбактеріозу репродуктивного тракту відіграє утворення бактеріями біоплівок – стійких бактеріальних асоціацій, що являють собою універсальний механізм формування резистентності бактерій до різних лікувальних препаратів (Hoiby, 2011; Swidsinski et al., 2013; Machado and Cerca, 2015; Muzny and Schwebke, 2015). Стафілококові біоплівки на слизовій оболонці піхви блокують запальну відповідь, знижують активність імуноцитів, що дозволяє бактеріям досягати високих концентрацій (Verstraelen and Swidsinski, 2013), створюють усталені патологічні біоценози піхви. Вони зберігають життєздатність мікроорганізмів за концентрацій перекису водню та молочної кислоти у 4–8 разів вищих, ніж потрібно для пригнічення окремих бактерій поза плівками (Berezovskaya et al., 2013). Саме стафілококи найчастіше виступають у ролі ініціаторів біоплівкового процесу, готуючи ґрунт для інших мікробів. Отже, саме тому вони обрані для створення експериментальної моделі дисбіозу вагінального біотопу.

Традиційна антимікробна терапія не усуває основної причини розвитку патології – дисбіотичних розладів у вагінальній екосистемі. Існуючі методи медикаментозної терапії уражень статевої системи із застосуванням етіотропних антибактеріальних препаратів викликають синдром імунної недостатності, що характеризується порушенням гуморального та клітинного імунітету, синтезу компонентів комплементу, відсутністю або зниженням активності цитотоксичних лімфоцитів і макрофагів. Результати розвитку цього синдрому та утворення стафілококами біоплівок – тривала персистенція збудника, часті рецедиви захворювання, можливості подальших заражень інфекційними агентами іншої природи, оскільки відновлення імунного статусу та нормалізація мікробіоценозу відбувається в недостатньому обсязі та темпі або не відбувається зовсім (Römling and Balsalobre, 2012). Крім того, антибіотики знижують колонізаційну резистентність піхви, збільшують проникність слизової оболонки, сприяючи тим самим проникненню умовно-патогенних мікроорганізмів у кров'яне русло, внутрішні органи та розвитку вторинного вогнища інфекції та алергізації організму.

Отже, терапія антибактеріальними препаратами викликає дестабілізацію вагінальної екосистеми, внаслідок чого відбувається різке зниження кількісних і якісних характеристик нормальної синергідної мікрофлори, збільшення pH вагінального секрету, тобто створюються умови для масового розмноження умовно-патогенної мікрофлори (Machado et al., 2016). Тому актуальності набуває пошук нових методів і альтернативних антибіотикам препаратів для корекції дисбіозу репродуктивного тракту. Найефективніші та перспективні в цьому сенсі лікувальні препарати бактеріофагів. Згідно з результатами сучасних досліджень, препарати бактеріофагів чинять значний ефект у більшості випадків, нерідко стаючи засобом вибору (Abedon, 2016; Motlagh et al., 2016).

Стафілококові бактеріофаги, дія яких спрямована безпосередньо на клітини стафілококів, не впливають на пул вагінальних лактобацил, що відіграє головну роль у виборі антимікробних засобів для корекції дисбіотичних станів (Algburi et al., 2015). Вони здатні проникати всередину бактеріальних біоплівок і уражати клітини в їх складі (Deghorain and Van Melderen, 2012; Lungren et al., 2013; Yilmaz et al., 2013; Alves et al., 2014). Для цього фаги виробляють деполімерази, здатні руйнувати матрикс біоплівок (Abedon, 2015; Chan and Abedon, 2015). Окрім літичної дії, бактеріофаги стимулюють фактори специфічного та неспецифічного імунного захисту: активують фагоцитоз, активність нейтрофілів, підвищують рівень Т-лімфоцитів, що попереджає хронізацію запального процесу та його рецидивування (Stepanova and Gevorkyan, 2015).

Пробіотики, у свою чергу, знижують ризик розвитку гастроінтестинальних розладів, викликаних антибіотикотерапією, ініціюють відновлення мікробіоценозу та інших порушених фізіологічних процесів в організмі. Механізм впливу пробіотиків на слизову піхви має багатофакторний характер і зумовлений продукцією молочної кислоти, бактерицидних речовин (антимікробних пептидів або бактеріоцинів) і перекису водню, модифікацією імунної відповіді (синтез IgA і протизапальних цитокінів), синтезом специфічних молекул, здатних знижувати вірулентність патогенів, та низкою інших факторів (Borges et al., 2014).

Отже, окреме використання лікувальних бактеріофагів та пробіотиків, які можуть впливати на резистентні до антибіотиків штами бактерій, стало перспективним напрямом в удосконаленні профілактики та лікуванні уражень, у тому числі репродуктивного тракту.

Тому мета цієї статті – розробити схему корекції дисбіозів за участі пробіотиків і фагів на моделі експериментального дисбіозу піхви білих лабораторних мишей, створеній шляхом інтравагінального уведення суспензій клітин плівкотвірного штаму *S. aureus*.

Матеріал і методи досліджень

Дослідження проводили на білих лабораторних мишах із віварію Дніпровського національного університету імені Олеся Гончара. Відбирали самиць віком 18–24 тижні та вагою 18–22 г. Тварин розподіляли на групи випадковим чином залежно від потреб експерименту, початкова чисельність кожної групи становила 9–10 особин.

Для визначення складу мікрофлори репродуктивного тракту мишей біологічний матеріал відбирали з піхви стерильними ватними тампонами. Із тампонів проводили змив у 1 мл стерильного розчину натрію хлориду (0,5%) та висівали отриману суспензію по 50 мкл на живильні середовища. За необхідності культивування проводили в ексикаторі за зниженого парціального тиску O_2. Культивування анаеробів проводили в анаеростаті, заповненому інертним газом.

Ідентифікацію бактерій проводили з використанням стандартних методик (Order of MoH USSR №535, 1985). Культури ідентифікували за результатами вивчення морфологічних, тинкторіальних та фізіолого-біохімічних ознак.

Для створення дисбіозу дослідним тваринам інтравагінально вводили 50 мкл суспензії добової культури плівкотвірного штаму стафілококу, що містила 1×10^9 КУО/мл. Контрольний висів проводили через 24 год. після зараження та через 10 діб, визначаючи зміни складу мікрофлори. Загальна кількість мишей із дисбіозом становила 68 особин.

Для корекції дисбіозу використовували лікувальні препарати: бактеріофаг стафілококовий рідкий, піобактеріофаг полі-

валентний та інтесті-бактеріофаг рідкий (НПО «Микроген», РФ) і пробіотичний препарат «Вагілак» (Ядран, Хорватія). Препарати вводили інтравагінально по 50 мкл протягом 10 діб. Контрольне висівання проводили через добу після останнього введення препарату і ще через 10 та 20 діб, відстежуючи динаміку змін.

Всі досліди на тваринах проводили відповідно до норм, установлених Законом України №3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» та прийнятих у Європейській конвенції із захисту хребетних тварин, що використовуються для експериментальних цілей (Law of Ukraine №3447-IV, 2006; European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes, 1986).

Статистичну обробку отриманих результатів здійснювали, розраховуючи середнє значення та стандартну похибку з використанням програми Origin Lab Pro 7.0 (OriginLab Corporation, USA). Достовірними вважали відмінності за $P < 0,05$.

Результати

Перед створенням експериментальної моделі дисбіозу піхви мишей, викликаного введенням плівкотвірного штаму золотистого стафілокока, провели вивчення складу індигенної мікробіоти здорових тварин для подальшого порівняння з ним показників дисбіозу.

Серед здорових мишей (контрольна група з 10 особин) виявляли мікроаерофільних *Lactobacillus*, *Staphylococcus* і *Streptococcus* у 100,0% дослідних тварин. Частота виявлення *Enterococcus* становила 30,0%, *Micrococcus* – 10,0%, *Bacillus* – 10,0%, представників родини Enterobacteriaceae – 10,0% та роду *Gardnerella* – 30,0%. Серед анаеробних бактерій *Fusobacterium* і *Bacteroides* виявляли у 100% досліджених тварин, *Peptococcus* – у 70,0%, *Peptostreptococcus* – у 60,0%, анаеробні *Lactobacillus* – у 70,0%.

Що стосується кількісних показників вмісту бактерій у складі нормофлори піхви мишей, серед факультативних анаеробів домінувати стали представники роду *Streptococcus* і мікроаерофільні *Lactobacillus* (2,60 ± 1,28 та 2,29 ± 1,46 lgКУО/мл відповідно). Кількість бактерій родів *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Micrococcus* і *Gardnerella* коливалися на приблизно однаковому рівні та становила 1,85 ± 1,17 lgКУО/мл для стафілококів, 1,80 ± 1,18 lgКУО/мл для ентерококів, 1,78 lgКУО/мл для мікрококів та 1,82 ± 1,18 – для гарднерел. Кількість бактерій роду *Bacillus* і представників родини Enterobacteriaceae сягала мінімального рівня (1,0 та 1,3 lgКУО/мл відповідно). Кількість облігатно-анаеробних бактерій була значно більшою. Так, кількість бактерій роду *Fusobacterium* склала 3,16 ± 2,38, роду *Peptococcus* – 4,09 ± 3,30, роду *Peptostreptococcus* – 3,90 ± 2,53, роду *Bacteroides* – 3,71 ± 2,45, а анаеробних *Lactobacillus* – 4,28 ± 3,34 lgКУО/мл.

У складі мікрофлори піхви мишей переважали облігатні анаероби. Відношення кількості аеробів до анаеробів складало 1 : 52. Загальне мікробне число становило $4,69 \times 10^4$ КУО/мл.

На наступному етапі нашого дослідження проводили моделювання дисбіозу піхви мишей шляхом інтравагінального введення плівкотвірного штаму *S. aureus*. Зміни складу мікрофлори визначали через 24 год. та 10 діб після введення.

Через 24 години після зараження встановили, що частота виявлення мікроаерофільних *Lactobacillus* знизилася до 64,7%, тоді як представники родів *Enterococcus*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Gardnerella* та представників родини Enterobacteriaceae виявляли з більшою частотою (39,7%, 23,5%, 23,5%, 25,0% та 20,6% відповідно). Серед анаеробних бактерій також зареєстровано зміни частоти виявлення: бактерії роду *Peptococcus* виявляли у 75,0% досліджених тварин, роду *Peptostreptococcus* – у 70,6%, а анаеробні *Lactobacillus* – у 48,5% порівняно з контролем норми мікрофлори піхви мишей.

Змінилася також кількість виявлених бактерій майже всіх зазначених мікроорганізмів (табл. 1). Так, кількість *Lactobacillus*, як мікроаерофільних так і анаеробних, знизилася в 3,8 та 4,0 раза порівняно із контролем відповідно. Кількість *Staphylococcus* збільшилася у 27,1 раза, *Bacillus* – у 7,3, представників родини Enterobacteriaceae – у 14,0, *Fusobacterium* – у 41,2, *Peptococcus* – у 4,2, *Peptostreptococcus* – у 6,3 та *Bacteroides* – у 12,5 раза. Як і у контролі, переважали облігатні анаероби. Відношення кількості аеробів до анаеробів складало 1 : 77. Загальне мікробне число зросло у 5,2 раза та становило $2,34 \times 10^5$ КУО/мл.

Таблиця 1

Мікрофлора піхви під час моделювання дисбіозу шляхом уведення клітин плівкотвірного штаму *S. aureus* через 1 добу та 10 діб після введення (lgКУО/мл, x ± SD)

Групи тварин	Мікроорганізми												
		факультативно-анаеробні та аеробні бактерії							облігатно-анаеробні бактерії				
	мікроаерофільні *Lactobacillus*	*Staphylococcus*	*Streptococcus*	*Enterococcus*	*Micrococcus*	*Bacillus*	Entero-bacteriaceae	*Gardnerella*	*Fusobacterium*	*Peptococcus*	*Peptostrepto-coccus*	*Bacteroides*	Анаеробні *Lactobacillus*
Контроль норми, n = 10	2,29 ± 1,46	1,85 ± 1,17	2,60 ± 1,28	1,80 ± 1,18	1,78°	1,00°	1,30°	1,82 ± 1,18	3,16 ± 2,38	4,09 ± 3,30	3,90 ± 2,53	3,71 ± 2,45	4,28 ± 3,34
Дисбіоз, через 1 добу n = 68	1,71 ± 1,10*	3,28 ± 2,49*	2,67 ± 1,68	2,01 ± 1,28	1,74 ± 1,01	1,86 ± 1,05*	2,45 ± 1,36*	1,92 ± 1,13*	4,78 ± 3,45*	4,71 ± 3,41*	4,70 ± 3,43*	4,81 ± 3,45*	3,68 ± 2,45*
Дисбіоз, через 10 діб n = 68	1,07 ± 0,58*	3,36 ± 2,36*	2,66 ± 1,46	2,02 ± 1,26	1,74 ± 1,03	1,83 ± 1,16*	2,39 ± 1,30*	1,91 ± 1,04	4,86 ± 3,40*	4,80 ± 3,38*	4,79 ± 3,41*	4,88 ± 3,40*	3,60 ± 2,46*

Примітки: * – статистично достовірна різниця $P < 0,05$ відносно контролю норми; ° – дані, отримані для однієї тварини

Наступне висівання проводили на десяту добу після інфікування. Встановили зменшення частоти виявлення мікроаерофільних *Lactobacillus* на 20,6% порівняно з показниками першої доби дисбіозу. Зміни частоти виявлення інших мікроорганізмів коливалися у межах 1,0–5,9%. Також дослідили кількісні зміни складу мікрофлори піхви мишей. Кількість мікроаерофільних лактобацил знизилася до 1,07 ± 0,58 lgКУО/мл, анаеробних лактобацил до 3,60 ± 2,46 lgКУО/мл, у той час як кількість стафілококів зросла до 3,36 ± 2,36 lgКУО/мл. Відношення кількості аеробів до анаеробів також змінилося та склало 1 : 83. Загальне мікробне число зросло до $2,79 \times 10^5$ КУО/мл за рахунок збільшення кількості анаеробних бактерій.

На десяту добу встановили певний баланс у складі мікрофлори піхви: кількість мікроорганізмів коливалася в межах статистичної похибки. Встановили суттєве збільшення кількості представників умовно-патогенної флори, зокрема стафілококів та ентеробактерій, що свідчить про їх домінування серед аеробних і факультативно-анаеробних бактерій у складі мікрофлори піхви. У той же час відбувалося зниження кількості як мікроаерофільних, так і анаеробних *Lactobacillus*, що поряд зі збільшенням кількості анаеробних мікроорганізмів, які колонізують піхву мишей, і спричинило значний зсув відношення кількості аеробів до анаеробів до значень, характерних для дисбіозу.

Для визначення ефективності корекції дисбіозу репродуктивного тракту проведено низку експериментів зі впливу лікувальних препартів бактеріофагів як окремо, так і в комбінації з пробіотичним препаратом «Вагілак». Висівання вагінального вмісту проводили через 24 год., 10 та 20 діб після останнього

введення препаратів. Вивчаючи вплив бактеріофага стафілококового рідкого на стан мікрофлори піхви мишей за дисбіозі, виявили значне зменшення кількості стафілококів – у 22,5 раза через добу після останнього введення препарату (2,00 ± 1,16 lgКУО/мл) порівняно з контролем дисбіозу (3,35 ± 2,40 lgКУО/мл). У подальшому кількість стафілококів дещо зросла в межах статистичної похибки. Зміни кількості інших мікроорганізмів були незначними. Частота виявлення всіх досліджуваних бактерій залишилася незмінною. Загальне мікробне число при цьому зменшувалося з $2,80 \times 10^5$ до $2,75 \times 10^5$ КУО/мл через 24 год. після останнього введення препарату, до $2,72 \times 10^5$ КУО/мл через 10 діб та до $2,69 \times 10^5$ КУО/мл через 20 діб. Співвідношення кількості аеробів : анаеробів становило 1 : 242, 1 : 240 та 1 : 233 відповідно порівняно з показником дисбіозу 1 : 85.

Під час вивчення впливу інтести-бактеріофага рідкого відмічено зменшення кількості стафілококів у 24,5 раза через 24 год. після останнього введення препарату. Надалі кількість стафілококів продовжувала повільно знижуватися. Кількість ентерококів також зменшилася у 1,3 раза та зменшувалася і далі, причому, починаючи з десятої доби після останнього введення препарату, знизилася також і частота їх виявлення на 6,7%. Частота виявлення ентеробактерій знизилася до 10,0% порівняно з показником дисбіозу 20,0%. При цьому зменшилася їх кількість у 7,8 раза та продовжувала повільно зменшуватися на 10- та 20-ту добу. Загальне мікробне число зменшилося до $2,72 \times 10^5$ КУО/мл через 24 год. після останнього введення препарату, $2,70 \times 10^5$ КУО/мл через 10 діб та до $2,68 \times 10^5$ КУО/мл через 20 діб. Співвідношення кількості аеробів : анаеробів становило 1 : 310, 1 : 318 та 1 : 322 відповідно.

Застосування піобактеріофага викликало зменшення кількості стафілококів у 24,2 раза через 24 год. після останнього введення препарату, надалі їх кількість продовжувала зменшуватися. Кількість стрептококів знизилися в 1,2 раза порівняно з контролем дисбіозу до показників норми та на 20-ту добу складала 2,59 ± 1,40 lgКУО/мл. Кількість ентерококів також знизилася у 1,3 раза через добу після останнього введення препарату та продовжувала знижуватися далі. Частота їх виявлення знизилася на 6,7%. Через 24 год. знизилася також кількість ентеробактерій (у 3,4 раза) та продовжувала знижуватися далі (у 5,9 раза на 20-ту добу після останнього введення препарату). Частота виявлення ентеробактерій також зменшилася на 8,9%. Загальне мікробне число зменшилося до $2,73 \times 10^5$ КУО/мл через 24 год. після останнього введення препарату, $2,67 \times 10^5$ КУО/мл через 10 діб і до $2,63 \times 10^5$ КУО/мл через 20 діб. Співвідношення кількості аеробів до анаеробів становило 1 : 314, 1 : 316 та 1 : 324 відповідно.

У наших дослідженнях підтверджено, що самостійне використання антибактеріальних засобів (бактеріофагів) не забезпечує повного відновлення стану вагінальної мікрофлори до нормальних показників, що зазначають також інші автори (Car'kova, 2014; Malanchuk et al., 2016). Відбувається лише зменшення кількості тих умовно-патогенних бактерій, фаги проти яких входили до складу використаних препаратів.

Невід'ємна частина успішної терапії – заключний етап лікування – відновлення мікроекології піхви із застосуванням вагінальних пробіотиків. Лікування дисбіотичних порушень обов'язково повинне включати лікарські засоби, що коригують як кількісний, так і якісний склад мікрофлори, тобто препарати пробіотичної дії (Ling et al., 2013).

Визначаючи вплив на змодельований дисбіоз вагілаку, спостерігали значне збільшення кількості як мікроаерофільних, так і анаеробних лактобацил. Через 24 год. після останнього введення препарату їх кількість зросла у 7,1 та 2,3 раза відповідно, на 10- та 20-ту добу їх кількість продовжувала збільшуватися. При цьому також збільшилася частота їх виділення до 88,9% для мікроаерофільних лактобацил і до 66,7% для анаеробних на 20-ту добу після останнього введення препарату. Крім того, визначали зменшення кількості стафілококів у 3,6 раза через 24 год. і подальше зменшення у 7,5 раза на 20-ту добу після останнього введення препарату. Кількість ентерококів зменшувалася в 1,1 раза, бацил – у 4,0, ентеробактерій – у 2,8, фузобактерій – у 3,6, пептококів – у 1,7, пептострептококів – у 2,6, а бактероїдів – у 6,8 раза. На 10- та 20-ту добу після останнього введення препарату їх кількість продовжувала поступово зменшуватися. Також спостерігали зменшення частоти виявлення ентерококів на 6,7% на 20-ту добу, мікрококів – на 18,9% через 24 год, бацил – на 18,9%, ентеробактерій – на 8,9% через 10 діб. Слід зазначити, що кількість і частота вивлення стрептококів і бацил максимально наблизилися до показників норми. Загальне мікробне число зменшилося до $1,02 \times 10^5$ КУО/мл через 24 год. після останнього введення препарату, $8,25 \times 10^4$ через 10 діб і до $6,80 \times 10^4$ КУО/мл через 20 діб. Співвідношення кількості аеробів до анаеробів становило 1 : 68, 1 : 62 та 1 : 63 відповідно.

Тобто під час використання лише пробіотичного препарату за 20 діб експерименту також не відбулося повного відновлення стану мікрофлори до показників норми. Це свідчить про недоцільність їх окремого використання для корекції дисбіотичних станів репродуктивного тракту.

Корекцію будь-яких інфекційних процесів нижнього відділу статевих шляхів необхідно розглядати з позицій вчення про біоценози. Саме тому в лікуванні дисбіотичних порушень репродуктивного тракту важливий комплексний підхід, що включає наявність двох етапів (Ling et al., 2013) – після елімінації специфічного збудника необхідне відновлення біоценозу піхви. Тільки такий інтегрований підхід забезпечує ефективність лікування та запобігає рецидивам запального процесу. На першому етапі за допомогою системних та місцевих антибактеріальних препаратів проводиться санація, мета якої – елімінація строгих анаеробних умовно-патогенних бактерій. Незважаючи на високу ефективність такої терапії, у 30–40% випадків відмічається розвиток рецидивів бактеріального вагінозу. Потім на другому етапі проводиться відновлення нормальної мікрофлори піхви. Традиційна схема лікування дозволяє швидко усунути симптоми дисбіозу, тому що антибактеріальні препарати пригнічують патогенну та умовно-патогенну флору. Однак дисбіотичні прояви при цьому посилюються, оскільки одночасно відбувається пригнічення пулу лактобацил, що зумовлює потенціювання загальних процесів дисбактеріозу (рецидиву) (Aguin et al., 2014).

Використання комбінації препаратів бактеріофагів та пробіотичного препарату «Вагілак» для корекції дисбіозів показало як безпоседнє знищення умовно-патогенної мікрофлори за рахунок дії фага, так і відновлення кількості інших представників мікрофлори піхви до показників норми за рахунок антагоністичної дії лактобацил.

Комбіноване застосування бактеріофага стафілококового рідкого та вагілаку зумовило суттєве збільшення кількості та частоти виявлення мікроаерофільних і анаеробних лактобацил. Через 24 год. після останнього введення препаратів кількість їх зросла у 20,8 та 2,1 раза відповідно, а на 10- та 20-ту добу продовжувала зростати (табл. 2). Частота виділення мікроаерофільних лактобацил зросла до 100% через добу після останнього введення препаратів, а анаеробних – до 70% на 20-ту добу, що відповідає показникам нормофлори вагінального біотопу. Також визначено зменшення кількості стафілококів, стрептококів, ентерококів, бацил і ентеробактерій у 30,1, 1,1, 1,5, 2,2 та 11,8 раза відповідно через добу після останнього введення препаратів. Надалі на 10- та 20-ту добу продовжувала знижуватися кількість ентерококів, бацил і ентеробактерій, максимально наближаючись до показників норми. Показники інших представників вагінальної мікрофлори коливалися в межах статистичної похибки. Також через 24 год. після останнього введення препаратів спостерігалося зменшення частоти виявлення ентерококів, мікрококів і ентеробактерій на 10%, а бацил – на 20% порівняно з контролем дисбіозу.

Кількість анаеробних бактерій також зазнала значних змін. Кількість фузобактерій зменшилася у 33,2 раза через 24 год. після останнього введення препаратів, пептококів – у 2,3 раза,

пептострептококів – у 6,6 раза, а бактероїдів – у 7,9 раза, що практично відповідало показникам норми. На 10- та 20-ту добу продовжилося поступове зменшення кількості цих бактерій порівняно з контролем дисбіозу. Також спостерігали зменшення частоти виявлення пептострептококів на 10%.

При цьому загальне мікробне число зменшилося до 5,81 × 10^4 КУО/мл через 24 год. після останнього введення препаратів, до 5,25 × 10^4 через 10 діб та до 4,77 × 10^4 КУО/мл через 20 діб, що наближувалося до показника норми (4,69 × 10^4 КУО/мл). Співвідношення кількості аеробів до анаеробів також зсувалося у бік норми та становило 1 : 59, 1 : 57 та 1 : 52 відповідно порівняно з контролем норми (1 : 52).

Інтести-бактеріофаг рідкий у комплексі з вагілаком також викликав зміни кількісних показників складу мікрофлори за дисбіозу до показників норми. Кількість мікроаерофільних і анаеробних лактобацил зросла через 24 год. після останнього введення препаратів у 16,6 та 2,2 раза відповідно порівняно з показником дисбіозу, а на 10- та 20-ту добу їх кількість продовжувала збільшуватися (табл. 3). Також зросла частота їх виділення. Через добу частота виявлення мікроаерофільних лактобацил сягнула свого максимуму (100%). На цьому етапі частота вивлення анаеробних лактобацил зросла на 20%, а на 20-ту добу – на 26,7% порівняно з контролем дисбіозу.

Кількість інших бактерій (як аеробних і факультативно-анаеробних, так і анаеробних) значно знизилася. Через добу після останнього введення препаратів кількість стафілококів зменшилася у 25,9 раза, кількість стрептококів і гарднерел – у 1,1, ентерококів – у 1,5, бацил – у 3,3, ентеробактерій – у 7,8 раза, тоді як кількість мікрококів зросла в 1,3 раза. У подальшому на 10- та 20-ту добу спостерігали поступове зменшення кількості вказаних бактерій. Що стосується частоти виявлення цих мікроорганізмів у складі вагінальної мікрофлори, встановили зменшення ентерококів і ентеробактерій на 10%, хоча на 20-ту добу для ентеробактерій цей показник відновився до рівня дисбіозу.

Таблиця 2

Мікрофлора піхви під час корекції дисбіозу, викликаного введенням плівкотвірного штаму *S. aureus*, за допомогою бактеріофага стафілококового рідкого окремо та у комплексі з вагілаком через 20 діб після їх уведення (lgКУО/мл, x ± SD)

Групи тварин	Мікроорганізми												
		факультативно-анаеробні та аеробні мікроорганізми							анаеробні мікроорганізми				
	мікроаерофільні *Lactobacillus*	*Staphylococcus*	*Streptococcus*	*Enterococcus*	*Micrococcus*	*Bacillus*	Entero-bacteriaceae	*Gardnerella*	*Fusobacterium*	*Peptococcus*	*Peptostrepto-coccus*	*Bacteroides*	Анаеробні *Lactobacillus*
Контроль норми, n = 10	2,29 ± 1,46	1,85 ± 1,17	2,60 ± 1,28	1,80 ± 1,18	1,78˚	1,00˚	1,30˚	1,82 ± 1,18	3,16 ± 2,38	4,09 ± 3,30	3,90 ± 2,53	3,71 ± 2,45	4,28 ± 3,34
Контроль дисбіозу, n = 10	1,00	3,35 ± 2,40	2,66 ± 1,49	2,03 ± 1,28	1,73 ± 1,18	1,82 ± 0,76	2,37 ± 1,54	1,92 ± 0,76	4,86 ± 3,48	4,80 ± 3,36	4,79 ± 3,46	4,88 ± 3,36	3,62 ± 2,54
Бактеріофаг стафілококовий рідкий, n = 9	1,45 ± 0,92*	2,01 ± 1,21*	2,64 ± 1,41	2,04 ± 1,23	1,74 ± 0,85	1,81 ± 0,85	2,41˚	1,94 ± 1,18	4,85 ± 3,30	4,78 ± 3,26	4,77 ± 3,30	4,87 ± 3,43	3,63 ± 2,46
Вагілак, n = 9	1,96 ± 1,26*	2,47 ± 1,66*	2,60 ± 1,54	1,92 ± 1,18	1,78˚	1,00˚	1,78˚	1,88 ± 0,85	3,99 ± 2,61*	4,44 ± 3,49	3,98 ± 2,62*	3,93 ± 2,62*	4,05 ± 3,48
Бактеріофаг стафілококовий рідкий + вагілак, n = 10	2,29 ± 1,46*	1,88 ± 1,03*	2,60 ± 1,46	1,81 ± 0,85	1,85˚	1,00˚	1,00˚	1,88 ± 0,85	3,20 ± 2,41*	4,10 ± 3,34*	3,90 ± 2,41*	3,77 ± 2,48*	4,27 ± 3,49*

Примітки: див. табл. 1.

Таблиця 3

Мікрофлора піхви під час корекції дисбіозу, викликаного введенням плівкотвірного штаму *S. aureus*, за допомогою інтести-бактеріофага рідкого окремо та в комплексі з вагілаком через 20 діб після їх уведення (lgКУО/мл, x ± SD)

Групи тварин	Мікроорганізми												
		факультативно-анаеробні та аеробні мікроорганізми							анаеробні мікроорганізми				
	мікроаерофільні *Lactobacillus*	*Staphylococcus*	*Streptococcus*	*Enterococcus*	*Micrococcus*	*Bacillus*	Entero-bacteriaceae	*Gardnerella*	*Fusobacterium*	*Peptococcus*	*Peptostrepto-coccus*	*Bacteroides*	анаеробні *Lactobacillus*
Контроль норми, n = 10	2,29 ± 1,46	1,85 ± 1,17	2,60 ± 1,28	1,80 ± 1,18	1,78˚	1,00˚	1,30˚	1,82 ± 1,18	3,16 ± 2,38	4,09 ± 3,30	3,90 ± 2,53	3,71 ± 2,45	4,28 ± 3,34
Контроль дисбіозу, n = 10	1,00	3,35 ± 2,40	2,66 ± 1,49	2,03 ± 1,28	1,73 ± 1,18	1,82 ± 0,76	2,37 ± 1,54	1,92 ± 0,76	4,86 ± 3,48	4,80 ± 3,36	4,79 ± 3,46	4,88 ± 3,36	3,62 ± 2,54
Інтести-бактеріофаг рідкий, n = 9	1,40 ± 0,76*	1,93 ± 1,12*	2,65 ± 1,48	1,87 ± 0,76	1,74 ± 0,85	1,73 ± 0,76	1,30˚	1,86 ± 0,85	4,85 ± 3,45	4,79 ± 3,34	4,77 ± 3,28	4,86 ± 3,40	3,62 ± 2,41
Вагілак, n = 9	1,96 ± 1,26*	2,47 ± 1,66*	2,60 ± 1,54	1,92 ± 1,18	1,78˚	1,00˚	1,78˚	1,88 ± 0,85	3,99 ± 2,61*	4,44 ± 3,49	3,98 ± 2,62*	3,93 ± 2,62*	4,05 ± 3,48
Інтести-бактеріофаг рідкий + вагілак, n = 9	2,26 ± 1,41*	1,88 ± 1,26*	2,60 ± 1,49	1,82 ± 1,18	1,78˚	1,00˚	1,00˚	1,87 ± 1,18	3,23 ± 2,40*	4,14 ± 3,41*	3,90 ± 2,46*	3,71 ± 2,48*	4,28 ± 3,45*

Примітка: див. табл. 1.

Кількість фузобактерій через 24 год. після останнього введення препаратів зменшилася у 30,4, пептококів – у 2,0, пептострептококів – у 6,81, а бактеріодів – у 9,3 раза. Надалі тривало зменшення кількості цих бактерій практично до показників норми. Також визначали зменшення частоти виявлення пептококів на 10% через 24 год. після останнього введення препаратів та на 20% – на 10- та 20-ту добу.

При цьому загальне мікробне число зменшилося до 6,06 × 10^4 КУО/мл через 24 год. після останнього введення препарату, до 5,64 × 10^4 КУО/мл через 10 діб та до 4,85 × 10^4 КУО/мл через 20 діб, що наближалося до показника норми (4,69 × 10^4 КУО/мл). Співвідношення кількості аеробів до анаеробів становило 1 : 64, 1 : 61 та 1 : 54 відповідно порівняно з контролем норми (1 : 52).

Під час застосування піобактеріофага полівалентного та вагілаку спостерігали збільшення кількості мікроаерофільних і анаеробних лактобацил у 20,3 та 2,3 раза відповідно через добу після останнього введення препаратів. У подальшому на 10- та 20-ту добу спостерігали поступове збільшення кількості ана-

еробних лактобацил і незначне зменшення мікроаерофільних (табл. 4). При цьому частота виділення зросла в обох випадках і на 20-ту добу становила 100% для мікроаерофільних лактобацил і 70% для анаеробних.

Визначено зменшення кількості стафілококів, стрептококів, ентерококів, бацил, ентеробактерій та гарднерел: у 28,2, 1,1, 1,4, 3,3, 23,5 та 1,1 раза відповідно через 24 год. після останнього введення препаратів. У подальшому кількість їх продовжувала поступово знижуватися порівняно з контролем дисбіозу. Кількість анаеробних бактерій також знизилася. Кількість фузобактерій зменшилася у 13,2 раза через добу після останнього введення препаратів, пептококів – у 2,0, пептострептококів – у 6,6, а бактероїдів – у 10,7 раза, що відповідало показникам норми. Ці показники продовжували знижуватися на 10- та 20-ту добу. Також спостерігали зменшення частоти виявлення ентерококів і ентеробактерій на 10%, мікрококів і бацил – на 20% через 24 год., а пептострептококів – на 10% через 10 діб після останнього введення препаратів.

При цьому загальне мікробне число становило 6,33 × 10^4 КУО/мл через 24 год. після останнього введення препаратів, 5,61 × 10^4 через 10 діб, 4,85 × 10^4 КУО/мл через 20 діб порівняно з показником нормофлори (4,69 × 10^4 КУО/мл). Співвідношення аероби : анаероби становило 1 : 67, 1 : 62 та 1 : 55 відповідно порівняно з контролем норми (1 : 52).

Таблиця 4

Мікрофлора піхви під час корекції дисбіозу, викликаного введенням плівкотвірного штаму *S. aureus*, за допомогою піобактеріофага полівалентного окремо та у комплексі з вагілаком через 20 діб після їх уведення (lgКУО/мл, x ± SD)

Групи тварин	Мікроорганізми												
		факультативно-анаеробні та аеробні мікроорганізми							анаеробні мікроорганізми				
	мікроаерофільні *Lactobacillus*	*Staphylococcus*	*Streptococcus*	*Enterococcus*	*Micrococcus*	*Bacillus*	Entero-bacteriaceae	*Gardnerella*	*Fusobacterium*	*Peptococcus*	*Peptostrepto-coccus*	*Bacteroides*	анаеробні *Lactobacillus*
Контроль норми, n = 10	2,29 ± 1,46	1,85 ± 1,17	2,60 ± 1,28	1,80 ± 1,18	1,78°	1,00°	1,30°	1,82 ± 1,18	3,16 ± 2,38	4,09 ± 3,30	3,90 ± 2,53	3,71 ± 2,45	4,28 ± 3,34
Контроль дисбіозу, n = 10	1,00	3,35 ± 2,40	2,66 ± 1,49	2,03 ± 1,28	1,73 ± 1,18	1,82 ± 0,76	2,37 ± 1,54	1,92 ± 0,76	4,86 ± 3,48	4,80 ± 3,36	4,79 ± 3,46	4,88 ± 3,36	3,62 ± 2,54
Піобактеріофаг полівалентний, n = 9	1,38 ± 0,74*	1,91 ± 1,04*	2,59 ± 1,40	1,87 ± 1,06	1,81 ± 0,85	1,78 ± 1,15	1,60°	1,88 ± 0,85	4,84 ± 3,51	4,78 ± 3,52	4,76 ± 3,52	4,86 ± 3,48	3,64 ± 2,48
Вагілак, n = 9	1,96 ± 1,26*	2,47 ± 1,66*	2,60 ± 1,54	1,92 ± 1,18	1,78°	1,00°	1,78°	1,88 ± 0,85	3,99 ± 2,61*	4,44 ± 3,49	3,98 ± 2,62*	3,93 ± 2,62*	4,05 ± 3,48
Піобактеріофаг полівалентний + вагілак, n = 10	2,26 ± 1,38*	1,88 ± 1,16*	2,59 ± 1,51	1,82 ± 0,76	1,78°	1,00°*	1,00°*	1,87 ± 1,06	3,26 ± 2,43*	4,16 ± 3,43*	3,91 ± 2,48*	3,73 ± 2,51*	4,25 ± 3,43*

Примітка: див. табл. 1.

Обговорення

Наведені дані свідчать про практично повне відновлення показників мікрофлори вагінального біотопу за комбінованого використання будь-якого з обраних препаратів бактеріофагів та пробіотика «Вагілак». Літературні дані щодо порівняння різних схем корекції вагінального дисбіозу визначили, що повного знищення умовно-патогенної мікрофлори не відбулося ні за однієї схеми корекції дисбіозу.

У дослідженнях Nazarenko and Solov'eva (2013) під час застосування орального пробіотика «Вагісан» на основі лактобацил (*Lactobacillus rhamnosus* GR-1 та *L. reuteri* RC-14 у дозі 10^9 КУО) знищення умовно-патогенної мікрофлори спостерігали у 87,5% жінок, за двоетапного лікування метронідазолом і одним із кислототвірних еубіотиків (біопрепарати лактобактерин, біфідумбактерин у супозиторіях) – у 85,0%, а за монотерапії метронідазолом – у 70,0%. Причому за схем корекції дисбіозу вагінального тракту, застосовуваних у другій і третій групах, спостерігали велику кількість рецидивів, які виникали в різні терміни після лікування. Фактор розвитку рецидивів – дефіцит лакто- та біфідобактерій, що посилюється після завершення курсу антибактеріальної терапії (Heczko et al., 2015). Це пов'язано з тим, що терапія антибіотиками, ліквідуючи умовно-патогенні мікроорганізми, часто не створює умов для достатньо швидкого відновлення нормальної мікрофлори піхви.

Один із головних недоліків біотерапевтичних препаратів для корекції мікрофлори піхви – вони містять біфідо- або лактобактерин, виділений у людей із кишківника, тому під час потрапляння в нехарактерну для їх проживання нішу (піхву) ці мікроорганізми, що володіють слабкою адгезивною активністю відносно вагінальних епітеліоцитів, не здатні перебувати там тривалий час. У результаті це лікування може зумовити нестійкий клінічний ефект.

У зв'язку з тим, що застосування антибіотиків для корекції дисбіозу репродуктивного тракту супроводжується рецидивами, доцільно обов'язково проводити другий етап лікування – відновлення біоценозу піхви. Група вчених (Radzinskij and Ordiyanc, 2012) у 2010–2011 роках провела масштабне дослідження клінічної та мікробіологічної ефективності різних схем лікування бактеріальних вагінальних інфекцій неспецифічної етіології. На першому етапі дослідження пацієнтки отримували антибактеріальну або антисептичну терапію згідно з інструкцією із застосування (декналінію хлорид – «Флуомізин», тернідазол + неоміцину сульфат + ністатин + преднізолону метасульфобензоат + хлоргексидин + повідон-йод, метронідазол + міконазол або кліндаміцин). На другому етапі жінок поділили на дві групи. Хворим із першої групи проводили лікування препаратом «Генофлор Е». Друга група жінок (група контролю) ніяких засобів для відновлення мікрофлори піхви не отримувала. Після курсу лікування у пацієнток, які отримали двоетапну терапію, зміни біоценозу піхви в цілому були позитивними – у 91,0% під час обстеження виявлено I–II ступінь чистоти піхви. У жодної із жінок не спостерігали будь-яких небажаних побічних реакцій, пов'язаних із застосуванням лікарського засобу (Radzinskij and Ordiyanc, 2012).

За даними Malanchuk et al. (2016) відновлення нормальної мікрофлори піхви спостерігали у 93,0% жінок I групи, що отримували пробіотик «Лактостар Плюс» і вагінальні таблетки «Фемінум Інтима», і тільки у 40,0% жінок II групи, що отримували лише етіотропну терапію. Крім того, рецидиви бактеріального вагінозу визначили у трьох пацієнток II групи, а також у 2,3 раза частіше виявляли грибкову інфекцію. Тобто використання пробіотиків поряд з іншими антибактеріальними засобами, як показано нами, та бактеріофагами зокрема, – обов'язкова складова ефективної терапії дисбіотичних порушень репродуктивного тракту.

Висновки

Використання препаратів бактеріофагів не показало повного відновлення складу нормофлори вагінального біотопу. Вони лише знищували умовно-патогенні бактерії, проти яких спря-

мовані, не викликаючи значних змін інших мікроорганізмів. Тому зареєстровано подальший зсув співвідношення кількості аеробів та анаеробів убік дисбіозу, що не можна характеризувати як позитивний вплив препаратів бактеріофагів.

Однак у поєднанні з пробіотиком усі використані бактеріофаги здійснювали практично повне відновлення складу мікрофлори. Найкращий корекційний ефект визначали для комплексу «бактеріофаг стафілококовий рідкий – вагілак», що зумовив максимальне зниження загального мікробного числа до $4{,}77 \times 10^4$ КУО/мл і відновлення показника аероби : анаероби до 1 : 52 за показників норми $4{,}69 \times 10^4$ КУО/мл та 1 : 52.

Лікувальні препарати бактеріофагів ефективні для корекції порушень складу мікрофлори, викликаних здатними до утворення біоплівок стафілококами, *in vivo*, тому доцільне їх використання в медичній практиці як самостійно, так і в комплексі з іншими засобами. Це дозволить значно підвищити ефективність лікування, уникнувши при цьому низки ускладнень і можливості рецидивування.

References

Abedon, S. T. (2015). Ecology of anti-biofilm agents II: Bacteriophage exploitation and biocontrol of biofilm bacteria. Pharmaceuticals, 8(3), 559–589.

Abedon, S. T. (2016). Bacteriophage exploitation of bacterial biofilms: Phage preference for less mature targets? FEMS Microbiology Letters, 363(3), fnv246.

Aguin, T., Akins, R. A., & Sobel, J. D. (2014). High-dose vaginal maintenance metronidazole for recurrent bacterial vaginosis: A pilot study. Sexually Transmitted Diseases, 41(5), 290–291.

Algburi, A., Volski, A., & Chikindas, M. L. (2015). Natural antimicrobials subtilosin and lauramide arginine ethyl ester synergize with conventional antibiotics clindamycin Volski, and metronidazole against biofilms of *Gardnerella vaginalis* but not against biofilms of healthy vaginal lactobacilli. FEMS Pathogens and Disease, 73(5), ftv018.

Alves, D. R., Gaudion, A., Bean, J. E., Perez Esteban, P., Arnot, T. C., Harper, D. R., Kot, W., Hansen, L. H., Enright, M. C., & Jenkins, A. T. (2014). Combined use of bacteriophage K and a novel bacteriophage to reduce *Staphylococcus aureus* biofilm formation. Applied and Environmental Microbiology, 80(21), 6694–6703.

Berezovskaya, E. S., Makarov, I. O., Gomberg, M. A., Borovkova, E. I., Chulkova, E. A., & Arakelyan, L. A. (2013). Bioplenki pri bakterial'nom vaginoze [Biofilm formation in the bacterial vaginosis]. Obstetrics, Gynecology and Reproduction, 7(2), 34–36 (in Russian).

Borges, S., Silva, J., & Teixeira, P. (2014). The role of lactobacilli and probiotics in maintaining vaginal health. Archives of Gynecology and Obstetrics, 289(3), 479–489.

Car'kova, M. A. (2014). Kompleksnoe lechenie i profilaktika recidivov bakterial'nogo vaginoza u zhenshchin reproduktivnogo vozrasta [Multimodal treatment and prevention of recurrent bacterial vaginosis in women of reproductive age]. Medicinskij Sovet, 2, 42–46 (in Russian).

Chan, B. K., & Abedon, S. T. (2015). Bacteriophages and their enzymes in biofilm control. Current Pharmaceutical Design, 21(1), 85–99.

Deghorain, M., & Van Melderen, L. (2012). The staphylococci fhages family: An overview. Viruses, 4(12), 3316–3335.

Heczko, P. B., Tomusiak, A., Adamski, P., Jakimiuk, A. J., Stefanski, G., Mikolajczyk-Cichonska, A., Suda-Szczurek, M., & Strus, M. Supplementation of standard antibiotic therapy with oral probiotics for bacterial vaginosis and aerobic vaginitis: A randomised, double-blind, placebocontrolled trial. BMC Women's Health, 15, e115.

Hoiby, N., Ciofu, O., Johansen, H. K., Song, Z. J., Moser, C., Jensen, P. O., Molin, S., Givskov, M., Tolker-Nielsen, T., & Bjarnsholt, T. (2011). The clinical impact of bacterial biofilms. International Journal of Oral Science, 3(2), 55–65.

Ling, Z., Liu, X., Chen, W., Luo, Y., Yuan, L., Xia, Y., Nelson, K. E., Huang, S., Zhang, S., Wang, Y., Yuan, J., Li, L., & Xiang, C. (2013). The restoration of the vaginal microbiota after treatment for bacterial vaginosis with metronidazole or probiotics. Microbial Ecology, 65(3), 773–780.

Lungren, M. P., Christensen, D., Kankotia, R., Falk, I., Paxton, B. E., & Kim, C. Y. (2013). Bacteriophage K for reduction of *Staphylococcus aureus* biofilm on central venous catheter material. Bacteriophage, 3(4), e26825.

Machado, A., & Cerca, N. (2015). Influence of biofilm formation by *Gardnerella vaginalis* and other anaerobes on bacterial vaginosis. The Journal of Infectious Diseases, 212(12), 1856–1861.

Machado, D., Castro, J., Palmeira-de-Oliveira, A., Martinez-de-Oliveira, J., & Cerca, N. (2016). Bacterial vaginosis biofilms: Challenges to current therapies and emerging solution. Frontiers in Microbiology, 6, e1528.

Malanchuk, L. M., Malanchuk, S. L., & Nebeso, T. A. (2016). Vaginalna mikrobiota: Yak vidnoviti balans pri disbiozi [Vaginal microbiota: How to restore balance of the dysbiosis]. Zdorov'e Zhenshchiny, 108, 107–111 (in Ukrainian).

Motlagh, A. M., Bhattacharjee, A. S., & Goel, R. (2016). Biofilm control with natural and genetically-modified phages. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 32(4), e67.

Muzny, C. A., & Schwebke, J. R. (2015). Biofilms: An underappreciated mechanism of treatment failure and recurrence in vaginal infections. Clinical Infectious Diseases, 61(4), 601–606.

Nazarenko, L. G., & Solov'eva, N. P. (2013). Primenenie oral'nogo probiotika kak al'ternativnaya klinicheskaya strategiya profilaktiki akusherskih i perinatal'nyh infekcij [The use of oral probiotic as an alternative clinical strategy for the prevention of obstetrical and perinatal infections]. Ukrainian Journal of Dermatology, Venereology, Cosmetology, 51, 147–154 (in Ukrainian).

Radzinskij, V. E., & Ordiyanc, I. M. (2012). Dvuhehtapnaya terapiya vaginal'nyh infekcij [Two-stage therapy of vaginal infections]. Status Praesens, Moscow (in Russian).

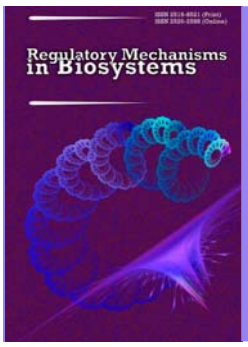
Römling, U., & Balsalobre, C. (2012). Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. Journal of Internal Medicine, 272(6), 541–561.

Stepanova, N. R., & Gevorkyan, M. A. (2015). Bakteriofagi: Aspekty primeneniya v akusherstve i ginekologii [Bacteriophages: Application in obstetrics and gynecology]. Medicinskij Sovet, 9, 10–14 (in Russian).

Swidsinski, A., Verstraelen, H., Loening-Baucke, V., Swidsinski, S., Mendling, W., & Halwani, Z. (2013). Presence of a polymicrobial endometrial biofilm in patients with bacterial vaginosis. PLoSOne, 8(1), e53997.

Verstraelen, H., & Swidsinski, A. (2013). The biofilm in bacterial vaginosis: Implications for epidemiology, diagnosis and treatment. Current Opinion in Infectious Diseases, 26(1), 86–89.

Yilmaz, C., Colak, M., Yilmaz, B. C., Ersoz, G., Kutateladze, M., & Gozlugol, M. (2013). Bacteriophage therapy in implant-related infections: An experimental study. The Journal of Bone and Joint Surgery, 95(2), 117–125.



Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(2), 259–264
doi: 10.15421/021740

Molecular mechanisms of metabolic disorders in the organs of rats of different ages affected by sodium nitrite in the context of tobacco intoxication

P. H. Lyhatskyi, L. S. Fira, D. B. Fira, I. P. Kuzmak

I. Horbachevsky Ternopil State Medical University, Ternopil, Ukraine

Article info

Received 24.03.2017
Received in revised form 22.04.2017
Accepted 25.04.2017

I. Horbachevsky Ternopil State Medical University, majdan Voli, 1, Ternopil, 46001, Ukraine. Tel.: +38-0352-524-492. E-mail: ludafira@mail.ru

Lyhatskyi, P. H., Fira, L. S., Fira, D. B., & Kuzmak, I. P. (2017). Molecular mechanisms of metabolic disorders in the organs of rats of different ages affected by sodium nitrite in the context of tobacco intoxication. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(2), 259–264. doi:10.15421/021740

Among pollutants a significant threat is posed by heavy metals, nitrate fertilizers and industrial waste. However, people also contribute to this threat through bad habits such as smoking and alcohol. All these factors affect health and can cause death. The aim of this study was to investigate the content of reactive oxygen species, markers of cytolysis of hepatocytes, cardoza and the degree of endogenous intoxication in the organism of rats affected by nitrite of sodium on the background of tobacco intoxication. The experiments were carried out on white rats, which were divided into three age categories: immature, mature and old, who for 30 days were exposed to tobacco smoke. The research animals were divided into three groups. One of them for 24 hours before the end of the experiment was given sodium nitrite, the second group was given sodium nitrite 72 hours before the end of the experiment. 30 days after poisoning we tested the contents of reactive oxygen species in neutrophils, cytolysis of erythrocyte membrane was investigated by erythrocytic index of intoxication, hepatocytes and cardiocytes – aminotransferase activity. The degree of endogenous intoxication was evaluated by the content of average weight molecules in blood serum. Poisoning of rats with sodium nitrite in the background of the 30 day intoxication by tobacco smoke led to a significant formation of ROS in neutrophils of rats of different age groups. We investigated the activity of aminotransferases in the blood serum and the above organs of rats after exposing them to sodium nitrite and 30 day tobacco smoke. In the blood serum of adult and aged rats, the activity of alanine aminotransferase increased in these conditions by 2.1 and 1.6 times, respectively. Sodium nitrite, which was an additional factor in the intoxication of the rats of all age groups by smoke, caused more pronounced changes in the activity of the studied enzyme in the blood serum. In the liver and myocardium of rats of different ages was observed a reliable decrease of this index was observed in all experimental groups. Trere was a significant increase in the serum of rats at different ages of aspartate aminotransferase activity. Aspartate aminotransferase activity in the myocardium of all experimental animals showed a reduction by 1.2–1.3 times after smoke inhalation and 1.5–1.6 times with simultaneous intoxication of the rats by sodium nitrite and tobacco smoke. Sodium nitrite, as an additional toxin raised the penetration capacity of erythrocytes among rats poisoned with smoke.By the end of the experiment, the erythrocyte index of intoxication increased in all age groups: immature rats by 31.7%, mature – by 36.0%, in old rats – by 23.6%. The next step of our research was to investigate the markers of endogenous intoxication – average molecular weight. After the simultaneous intoxication of rats by sodium nitrate and tobacco smoke, at the end of the experiment the content of average weight molecules was $\lambda = 254$ and of average mass $\lambda = 280$ in the blood serum of rats of all age groups increased by 3.1–3.3 times compared with the intact control group. Immature rats proved most sensitive to the action of sodium nitrite and tobacco.

Keywords: reactive oxygen species; aminotransferases; endogenous intoxication; molecules of average weight

Молекулярні механізми метаболічних порушень в органах щурів різного віку, уражених натрію нітритом на тлі тютюнової інтоксикації

П. Г. Лихацький, Л. С. Фіра, Д. Б. Фіра, І. П. Кузьмак

Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, Тернопіль, Україна

Ураження щурів натрію нітритом на тлі 30-денної інтоксикації тютюновим димом зумовило посилене утворення активних форм кисню в нейтрофілах крові. Отруєння токсикованих димом щурів натрію нітритом протягом 72 год. спричинило значне збільшення вмісту активних форм кисню порівняно з інтактними тваринами. Найвиразніше збільшення вмісту активних форм кисню відмічене у статевонезрілих щурів (утричі). Ці сполуки проявляють деструктивний вплив на біомакромолекули в організмі, викликають цитоліз гепатоцитів, кардіоцитів та еритроцитів, про що свідчить збільшення активності амінотрансфераз у сироватці крові та зниження їх у печінці та міокарді. Встановлено підвищення активності амінотрансфераз у сироватці крові щурів усіх вікових груп – найчутливішими до

цих показників виявились молоді особини. Аналогічно найвиразніше зниження активностей амінотрансфераз спостерігали у печінці та міокарді статевонезрілих тварин. Протягом дослідження відмічено збільшення проникності еритроцитарних мембран щурів усіх вікових категорій. До кінця експерименту проникність еритроцитарної мембрани виразно збільшилась у молодих і статевозрілих щурів. Еритроцитарні мембрани старих тварин виявились найстійкішими до дії токсичних чинників. За ураження щурів тютюновим димом і натрію нітритом посилюються катаболічні процеси та поглиблюється ендогенна інтоксикація, маркери якої – молекули середньої маси. За одночасного ураження тварин обома токсикантами у сироватці крові спостерігається значне збільшення вмісту молекул середньої маси обох фракцій (фракція $СМ_1$, в якій переважають ланцюгові амінокислоти, та фракція $СМ_2$, в якій переважають ароматичні амінокислоти). Збільшення вмісту молекул середньої маси в сироватці крові тварин усіх вікових груп виявилось на одному рівні. Найчутливіші до дії тютюнового диму та нітриту натрію виявились статевонезрілі особини.

Ключові слова: активні форми кисню; амінотрансферази; ендогенна інтоксикація; молекули середньої маси

Вступ

Тютюновий дим належить до найагресивніших «прооксидантних полютантів». Крім нікотину, в організм людини надходять понад 4 000 різних токсичних речовин. У газоподібній частині тютюнового диму містяться такі високотоксичні хімічні компоненти як ціанистий водень, метан, летючі нітрати, окис азоту, анілін, толуоїдин, деякі поліциклічні ароматичні сполуки вуглецю, низка окиснених сполук – альдегідів, фенолів, кислот, складних эфірів (Wipfli and Samet, 2009; Pappas, 2011; Behera et al., 2014). Агресивність диму зумовлена не тільки газоподібними хімічними активними сполуками, яким властива канцерогенна дія (формальдегід, бензпірен), а й елементами твердої фази цигаркового диму (сполуками кадмію, нікелю, полонію, деякими іншими важкими металами) (Hagstad et al., 2014; Shihadeh et al., 2015; Pikas, 2015).

Отримано також свідчення про те, що не тільки активне паління, а й забруднення атмосфери приміщень тютюновим димом – фактор ризику у виникненні різних захворювань (Stangherlin et al., 2009; Hagstad et al., 2014).

Під час куріння відбувається генерація активних форм кисню (O_2^-, O_2^{1-}, OH^-, RO_2, OH_2, H_2O_2 тощо), які відіграють важливу роль у багатьох фізіологічних (Valavanidis et al., 2009; Westbrook et al., 2010) і біохімічних процесах: регуляції тонусу судин, клітинній проліферації, синтезі простагландинів, передачі сигналів від міжклітинних сигнальних молекул на регуляторні системи, що контролюють експресію генів, мікробоцидній дії фагоцитів (Varela-Carver et al., 2010; Ignatowicz et al., 2012).

В основі патогенної дії забрудненого полютантами або тютюновим димом повітря лежить оксидантна агресія на слизову оболонку дихальних шляхів активними формами кисню, діоксидами азоту та сірки, іншими вільними радикалами (Churg et al., 2008; Halima et al., 2009; Luchese et al., 2009), що викликає активацію перекисного окиснення ліпідів і пошкодження біологічних мембран (Ray et al., 2012; Pickering et al., 2013).

У зв'язку з широким використанням нітратних добрив у сільському господарстві та їх міграцією у ґрунтові води та харчові продукти поширення нітратних отруєнь набуло епідемічного значення. Підвищений вміст нітратів у продуктах став реальним фактом сучасного життя.

Літературні дані свідчать, що за гемічної гіпоксії, спричиненої введеним натрію нітритом (Yrhashev, 2009; Jensen, 2010; Buehler et al., 2011), у тканинах тварин простежується нагромадження рівня активних форм кисню та інтенсифікація процесів ПОЛ. Нітритна інтоксикація супроводжується вираженим мембранотоксичним ефектом (El-Sheikh and Khalil, 2011; Ivanov et al., 2014; Baek et al., 2015). У реальному житті нерідко зустрічається комбінована дія декількох токсичних чинників на організм. Повсякденно людина піддається впливу цих речовин.

Мета нашого дослідження – оцінити вміст активних форм кисню, маркери цитолізу гепатоцитів, кардіоцитів і ступінь ендогенної інтоксикації в організмі щурів, уражених нітритом натрію на тлі тютюнової інтоксикації.

Матеріал і методи досліджень

Для проведення досліджень використовували білих безпородних щурів-самців, яких утримували на стандартному раціоні віварію Тернопільського державного медичного університету. Щури поділені на три вікові категорії: перша – статевонезрілі, масою тіла 60–80 г, друга – статевозрілі, масою тіла 180–200 г, третя – старі щури, масою тіла 300–320 г. Кожна вікова група складалася із двох підгруп: інтактний контроль і дослідна група. Щурів дослідних груп протягом 30 діб піддавали впливу тютюнового диму. Дослідні тварини поділені ще на три групи. Одній із них за 24 год. до закінчення експерименту вводили натрію нітрит у дозі 45 мг/кг маси тіла, другій – натрію нітрит (за 72 год. до евтаназії). Третю групу щурів піддавали токсичному впливу тільки тютюнового диму. Модель залежності від хронічної дії тютюнового диму створювали за допомогою герметичної камери об'ємом 30 л, що дозволило обкурювати тварин у вільних умовах. Тютюновий дим, що утворювався під час горіння шести сигарет «Прима срібна (синя)» (з умістом 0,6 мг нікотину та 8 мг смоли), через отвори в камері подавали всередину. У камері одночасно перебували шість тварин протягом 6 хвилин. Тварин контрольної групи також розміщували протягом 6 хвилин у герметичній камері, але не підлягали дії тютюнового диму.

Через 30 діб після початку ураження тварин тютюновим димом їх виводили з експерименту шляхом евтаназії під тіопенталовим наркозом.

Для дослідження брали кров, сироватку крові, печінку та міокард тварин. Із дослідних тканин готували 10% гомогенат на фізіологічному розчині.

Вміст активних форм кисню (АФК) визначали в нейтрофілах крові методом Maruschak (2012). Популяцію нейтрофілів крові отримували за допомогою центрифугування на подвійному градієнті щільності 1,077 і 1,093 фіколу-верографіну. Після 40 хв центрифугування за температури 4 ºС і швидкості 1 500 об./хв утворювалися дві інтерфази. Верхня інтерфаза (на межі «плазма – верифікол», щільністю 1,077) складалася з мононуклеарних клітин: 80% лімфоцитів, 15–18% моноцитів і незначного (2–3%) додатка гранулоцитів. Нижня інтерфаза (на межі градієнтів розчинів щільністю 1,077–1,092) являла собою на 98–100% популяцію нейтрофілів. Життєздатність клітин у тесті з трипановим синім складала 98–99%. Аналіз зразків клітин для визначення АФК нейтрофілів проводився на проточному цитометрі Epics XL (Beckman Coulter, США) з допомогою 2,7-дигідродихлорфлюоресцеїн діацетату. Значення досліджуваного параметра виражали у відсотках (інтенсивність світіння на клітину). Цитоліз еритроцитарної мембрани досліджували за еритроцитарним індексом інтоксикації (ЕІІ) (Tohaybaev et al., 1988), гепатоцитів і кардіоцитів – за активністю амінотрансфераз (АсАТ і АлАТ) в реакції з 2,4-динітрофенілгідразином (Reitman and Frankel, 1957; Tarrant et al., 2013). Ступінь ендогенної інтоксикації оцінювали за вмістом молекул середньої маси (МСМ) у сироватці крові, зокрема двох фракцій ($СМ_1$ і $СМ_2$) (Nikolaichik, 1989; Winchester and Audia, 2006).

Під час проведення досліджень користувались загальними принципами експериментів на тваринах, схваленими на Національному конгресі з біоетики (Київ, Україна, 2001) та узгодженими з положеннями Європейської конвенції про захист хребетних тварин, яких використовують для експериментальних та інших наукових цілей (Страсбург, Франція, 1985) (Simon and Wilkinson, 2007; Gross and Tolba, 2015). Статистичну обробку даних проводили за допомогою програми Statistica 6.0 з використанням параметричного критерію ANOVA та непара-

метричного критерію Вілкоксона для зв'язаних вибірок. Зміни вважали достовірними за $P < 0,05$.

Результати

Отруєння натрію нітритом на тлі 30-добової інтоксикації тютюновим димом викликало значне утворення активних форм кисню в нейтрофілах крові щурів різних вікових груп (табл. 1).

Найчутливішими до дії токсиканта виявились статевонезрілі щури, в яких уміст активних форм кисню у крові збільшився у 2,6 раза, менш чутливими – старі особини (даний показник перевищував рівень інтактних тварин у 2,1 раза). У статевозрілих щурів вміст активних форм кисню лише в 1,6 раза перевищував норму. Після потрапляння до організму додаткового токсиканта натрію нітриту рівень досліджуваного показника значно підвищувався. На 30-ту добу тютюнової інтоксикації та 24 год. отруєння натрію нітритом вміст активних форм кисню виявився дещо вищим порівняно з таким у щурів, яких піддавали тільки впливу тютюнового диму. Ураження токсикованих димом щурів натрію нітритом протягом 72 год. зумовило значне збільшення вмісту активних форм кисню порівняно з інтактними тваринами. У статевонезрілих щурів цей показник збільшився утричі, у статевозрілих і старих – у 2,0 та 2,6 раза, відповідно.

Очевидно, таке підвищення концентрації активних форм кисню – наслідок зміщення рівноваги між процесами їх утворення та детоксикації та може бути передумовою порушення функціональної активності клітин, розвитку патологічних процесів в організмі.

Таблиця 1

Вміст активних форм кисню (%) у нейтрофілах крові щурів різного віку, уражених натрію нітритом, на тлі 30-добової інтоксикації тютюновим димом ($M \pm m$; $n = 6$)

Термін дослідження	Групи дослідних тварин		
	статевонезрілі	статевозрілі	старі
Інтактні щури	15,06 ± 0,71	18,47 ± 0,22	19,87 ± 0,86
30-та доба ураження тютюновим димом	39,25 ± 1,29***	29,54 ± 0,50***	41,89 ± 0,78***
30-та доба ураження тютюновим димом + 24 год. отруєння натрію нітритом	43,52 ± 1,47***	32,53 ± 0,74***	46,47 ± 0,53***
30-та доба ураження тютюновим димом + 72 год. отруєння натрію нітритом	45,78 ± 0,84*	37,86 ± 0,67***	52,18 ± 1,20***

Примітка: вірогідні зміни між інтактними щурами та щурами, ураженими токсикантами: * – $P < 0,05$, ** – $P < 0,01$, *** – $P < 0,001$.

Важлива частина наших досліджень – оцінювання деструктивних процесів в уражених обраними токсичними речовинами тканинах. Ми дослідили активність амінотрансфераз – маркерних ензимів печінки та міокарда в сироватці крові та вищеназваних органах щурів після одночасного ураження їх натрію нітритом та тютюновим димом (табл. 2, 3).

За 30-добового ураження тютюновим димом найбільші зміни активності аланінамінотрансферази відмічені у сироватці крові статевонезрілих щурів: цей показник у них збільшився у 4,5 раза, порівняно з рівнем у інтактних щурів. У сироватці крові статевозрілих і старих щурів активність аланінамінотрансферази збільшилась за даних умов у 2,1 та 1,6 раза, відповідно. Натрію нітрит, який отримали отруєні димом щури всіх вікових груп, викликав сильні зміни активності досліджуваного ензиму у сироватці крові. Через 72 год. після його потрапляння до організму ензим підвищив активність у 6,5 раза у статевонезрілих щурів і в 2,9 раза у двох інших групах тварин (табл. 2). У печінці та міокарді щурів різного віку спостерігали вірогідне зниження цього показника в усіх дослідних групах. Найвираженіше зниження активності аланінамінотрансферази відмічене у печінці старих щурів, які отримували обидва токсиканти, а термін дослідження становив 72 год. отруєння натрію нітритом на тлі 30-добової інтоксикації тютюновим димом. У міокарді щурів усіх дослідних груп зниження активності аланінамінотрансферази становило близько 50%.

Під час дослідження активності аспартатамінотрансферази виявлено аналогічні зміни. У сироватці крові щурів різного віку активність ензиму зазнала значного підвищення (табл. 3). Найчутливішими виявились старі щури. Цей показник у них підвищився після отруєння димом утричі, а наприкінці дослідження під час ураження обома токсикантами – уп'ятеро. Вірогідне збільшення ($P < 0,001$) активності досліджуваного ензиму відмічене й у двох інших вікових групах.

У печінці щурів після інтоксикації тютюновим димом відмічали зниження активності аспартатамінотрансферази у 1,7, 1,6 та 1,4 раза відповідно у статевонезрілих, статевозрілих і старих щурів. В останній термін дослідження впливу обох токсикантів активність ензиму знизилась у 2,5 раза у печінці щурів різних вікових груп.

Таблиця 2

Активність аланінамінотрансферази у сироватці крові (мкмоль/л год.), печінці та міокарді (мкмоль/кг год.) щурів різного віку, уражених натрію нітритом, на тлі 30-добової інтоксикації тютюновим димом ($M \pm m$, $n = 6$)

Дослідні зразки	Термін дослідження	Групи дослідних тварин		
		статевонезрілі	статевозрілі	старі
Сироватка крові	Інтактні щури	0,56 ± 0,02	1,10 ± 0,11	1,45 ± 0,12
	30-та доба ураження тютюновим димом	2,52 ± 0,19***	2,36 ± 0,14***	2,27 ± 0,20***
	30-та доба ураження тютюновим димом + 24 год. отруєння натрію нітритом	3,03 ± 0,18***	2,76 ± 0,16***	3,41 ± 0,24***
	30-та доба ураження тютюновим димом + 72 год. отруєння натрію нітритом	3,62 ± 0,31***	3,15 ± 0,21***	4,17 ± 0,37***
Печінка	Інтактні щури	6,98 ± 0,10	6,60 ± 0,27	8,03 ± 0,28
	30-та доба ураження тютюновим димом	4,26 ± 0,28***	4,65 ± 0,46***	4,02 ± 0,39***
	30-та доба ураження тютюновим димом + 24 год. отруєння натрію нітритом	3,37 ± 0,26***	3,74 ± 0,27***	2,66 ± 0,14***
	30-та доба ураження тютюновим димом + 72 год. отруєння натрію нітритом	2,10 ± 0,14***	3,45 ± 0,13***	2,05 ± 0,15***
Міокард	Інтактні щури	3,91 ± 0,16	4,67 ± 0,34	4,38 ± 0,09
	30-та доба ураження тютюновим димом	3,04 ± 0,13***	2,93 ± 0,11***	3,23 ± 0,13***
	30-та доба ураження тютюновим димом + 24 год. отруєння натрію нітритом	2,23 ± 0,10***	2,44 ± 0,10***	2,78 ± 0,18***
	30-та доба ураження тютюновим димом + 72 год. отруєння натрію нітритом	1,92 ± 0,11***	2,32 ± 0,13***	2,07 ± 0,14***

Примітка: див. табл. 1.

Таблиця 3

Активність аспартатамінотрансферази у сироватці крові (мкмоль/л год.), печінці та міокарді (мкмоль/кг год.) щурів різного віку, уражених натрію нітритом, на тлі 30-добової інтоксикації тютюновим димом (M ± m, n = 6)

Дослідні зразки	Термін дослідження	Групи дослідних тварин		
		статевонезрілі	статевозрілі	старі
Сироватка крові	Інтактні щури	0,93 ± 0,08	0,63 ± 0,03	0,66 ± 0,05
	30-та доба ураження тютюновим димом	1,71 ± 0,11***	1,58 ± 0,10***	1,98 ± 0,14***
	30-та доба ураження тютюновим димом + 24 год. отруєння натрію нітритом	3,67 ± 0,09***	2,52 ± 0,15***	2,62 ± 0,14***
	30-та доба ураження тютюновим димом + 72 год. отруєння натрію нітритом	4,14 ± 0,13***	3,04 ± 0,12***	3,30 ± 0,11***
Печінка	Інтактні щури	4,37 ± 0,17	4,23 ± 0,22	4,68 ± 0,29
	30-та доба ураження тютюновим димом	2,63 ± 0,13***	2,57 ± 0,13***	3,39 ± 0,08***
	30-та доба ураження тютюновим димом + 24 год. отруєння натрію нітритом	2,07 ± 0,10***	1,95 ± 0,07***	2,35 ± 0,17***
	30-та доба ураження тютюновим димом + 72 год. отруєння натрію нітритом	1,73 ± 0,10***	1,67 ± 0,08***	1,91 ± 0,15***
Міокард	Інтактні щури	7,45 ± 0,25	7,37 ± 0,17	7,23 ± 0,45
	30-та доба ураження тютюновим димом	6,23 ± 0,33**	5,63 ± 0,34***	6,00 ± 0,33
	30-та доба ураження тютюновим димом + 24 год. отруєння натрію нітритом	5,62 ± 0,33***	4,95 ± 0,18***	5,23 ± 0,29***
	30-та доба ураження тютюновим димом + 72 год. отруєння натрію нітритом	4,97 ± 0,37***	4,56 ± 0,20***	4,75 ± 0,20***

Примітка: див. табл. 1.

Дослідження активності аспартатамінотрансферази у міокарді всіх дослідних тварин показало зниження її в 1,2–1,3 раза після отруєння димом та в 1,5–1,6 раза за одночасного ураження інтоксикованих щурів натрію нітритом.

Результати досліджень дозволили відмітити, що натрію нітрит, потрапивши до організму отруєних тютюновим димом тварин, посилює токсичний вплив останнього. Це підтверджується посиленою генерацією активних форм кисню в нейтрофілах крові, а також посиленням деструктивних процесів у печінці та міокарді, на що вказує підвищена активність амінотрансфераз у сироватці крові та зниження у названих органах. Така зміна активності ензимів свідчить про цитоліз гепато- та кардіоцитів за дії обох токсикантів.

Ми дослідили проникність еритроцитарних мембран після ураження щурів тютюновим димом і в поєднанні з натрію нітритом (табл. 4). Інтоксикація тютюновим димом викликає вірогідне підвищення ($P < 0,001$) проникності еритроцитарної мембрани щурів статевозрілого та старого віку. Проникна здатність плазматичної мембрани еритроцитів статевозрілих щурів збільшилась на 18,8%, старих – на 12,9% після отруєння. Натрію нітрит, який отримали токсиковані димом щури, ще більше посилив пропускну здатність еритроцитів, і до кінця експерименту (72 год. ураження натрію нітритом на тлі 30-добового отруєння тютюновим димом) еритроцитарний індекс інтоксикації підвищився в усіх вікових групах: у статевонезрілих щурів – на 31,7%, у статевозрілих – на 36,0%, у старих – на 23,6%.

Наступний етап досліджень – вивчення вмісту маркерів ендогенної інтоксикації – молекул середньої маси (фракцій $СМ_{254}$ та $СМ_{280}$), які у подальшому у разі збільшення їх концентрації в організмі посилюють перебіг патологічного процесу, набуваючи ролі вторинних токсинів, здійснюють вплив на життєдіяльність усіх систем і органів. Показник рівня молекул середньої маси вважають основним біохімічним маркером, що відображає рівень патологічного білкового метаболізму (Nikolsky et al., 2013). Інтоксикація тютюновим димом зумовила збільшення вмісту $СМ_{254}$ у сироватці крові на 30-ту добу отруєння у статевонезрілих і старих щурів у 2,6 раза, у статевозрілих – у 2,8 раза (табл. 5). За комбінованого ураження щурів досліджуваними токсикантами (на 30-ту добу отруєння тютюновим димом і 72 год. застосування натрію нітриту) вміст $СМ_{254}$ у сироватці крові щурів усіх вікових груп збільшився у 3,1–3,3 раза порівняно з інтактною групою тварин. Найвиразнішими виявились зміни цього показника у сироватці крові статевонезрілих щурів (вміст $СМ_{280}$ зазнав найбільшого підвищення в усі терміни дослідження), аналогічні зміни виявлені під час дослідження вмісту фракції $СМ_{280}$ (рис.).

Таблиця 4

Проникність еритроцитарної мембрани (%) у щурів різного віку, уражених натрію нітритом на тлі 30-добової інтоксикації тютюновим димом (M ± m, n = 6)

Термін дослідження	Групи дослідних тварин		
	статевонезрілі	статевозрілі	старі
Інтактні щури	20,81 ± 2,09	17,29 ± 1,29	32,91 ± 2,36
30-та доба ураження тютюновим димом	26,04 ± 2,24	36,04 ± 2,89***	45,83 ± 2,47***
30-та доба ураження тютюновим димом + 24 год. отруєння натрію нітритом	55,21 ± 2,34***	46,46 ± 3,96***	49,79 ± 4,52**
30-та доба ураження тютюновим димом + 72 год. отруєння натрію нітритом	52,46 ± 2,81***	53,33 ± 2,18***	56,46 ± 1,89***

Примітка: див. табл. 1.

Таблиця 5

Вміст молекул середньої маси (фракція $СМ_{254}$) у сироватці крові щурів різного віку, уражених натрію нітритом на тлі 30-добової інтоксикації тютюновим димом (M ± m, n = 6)

Термін дослідження	Групи дослідних тварин		
	статевонезрілі	статевозрілі	старі
Інтактні щури	1,40 ± 0,12	1,10 ± 0,08	1,37 ± 0,06
30-та доба ураження тютюновим димом	3,70 ± 0,11***	3,10 ± 0,11***	3,57 ± 0,06***
30-та доба ураження тютюновим димом + 24 год. отруєння натрію нітритом	4,17 ± 0,06***	3,33 ± 0,10***	3,93 ± 0,10***
30-та доба ураження тютюновим димом + 72 год. отруєння натрію нітритом	4,67 ± 0,07***	3,53 ± 0,10***	4,23 ± 0,09***

Примітка: див. табл. 1.

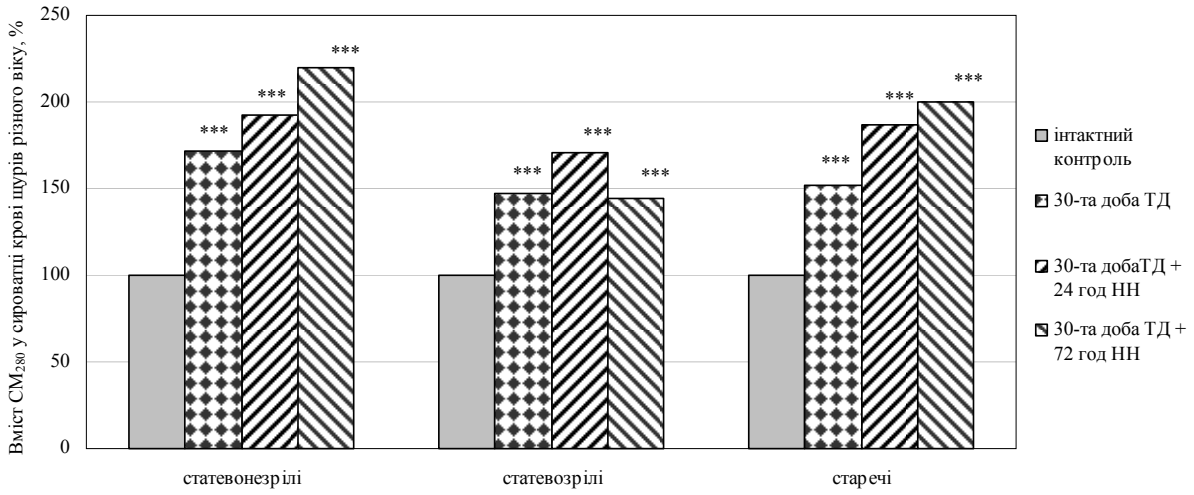


Рис. Вміст $СМ_{280}$ (%) у сироватці крові щурів різного віку, уражених натрію нітритом, на тлі 30-добової інтоксикації тютюновим димом: *** – вірогідні зміни (P < 0,001) між інтактними щурами та щурами, ураженими токсикантами

Імовірно, підищення концентрації молекул середньої маси у сироватці крові зумовлене порушенням їх елімінації з організму, посиленим утворенням у тканинах або поєднанням обох цих механізмів.

Обговорення

За дії екстремальних факторів різного походження (хімічне забруднення, іонізуюче випромінювання, гіпер- і гіпоксія, токсичні речовини, запальні процеси) у живих організмів інтенсифікується утворення активних форм кисню (Stangherlin et al., 2009; Wright and Churg, 2010). За певних умов підвищення інтенсивності утворення активних форм кисню над швидкістю їх детоксикації зумовлює пошкодження клітин (Kuznetsov et al., 2011; Wang et al., 2013). За вираженого або тривалого стресу концентрація активних форм кисню у клітині може підвищуватися, та, починаючи з певного порогового рівня цих сполук, мобілізація захисних систем клітини слабшає, активуються процеси, які спричиняють апоптоз або некроз (Ozer et al., 2008; Maruschak, 2012).

У щурів різного віку, отруєних натрію нітритом на тлі 30-добової інтоксикації тютюновим димом, у крові вірогідно зростає вміст активних форм кисню. Найвищий вміст агресивних кисневмісних сполук спостерігали у крові статевонезрілих щурів, що може бути пов'язано з неспроможністю ферментних систем цієї групи тварин до знешкодження токсинів та зниження активності процесів адаптації.

Один із проявів токсичної дії метаболітів кисню – інтенсифікація реакцій вільнорадикального окиснення. Активація процесів вільнорадикального окиснення за дії активних форм кисню викликає посилення пероксидного окиснення ліпідів, окисної модифікації білків, деструкції нуклеїнових кислот, вуглеводів, що спричиняє структурні та метаболічні порушення у клітинах. Це може спричинити цитоліз та зміни проникності плазматичних мембран клітин різних органів (Panina et al., 2008; Gladwin et al., 2009).

Найефективніше ступінь ураження клітинних мембран відображається співвідношенням активності внутрішньоклітинних ензимів у клітині та поза її межами, оскільки в нормі лише незначна кількість внутрішньоклітинних ензимів міститься в сироватці крові. Активність ензимів корелює зі ступенем пошкодження, який може виражатися від патологічного посилення проникності мембрани клітин до некрозу. Найбільшої уваги заслуговують органоспецифічні, або індикаторні ензими, специфічні тільки для певного типу тканин (Tarrant et al., 2013; McGill, 2016).

Дослідження активності амінотрансфераз у сироватці крові щурів після отруєння їх тютюновим димом показало підвищення аланінамінотрансферази та аспартатамінотрансферази у щурів усіх вікових груп. Ураження, ускладнене дією натрію нітриту, викликало більш виражені зміни активності досліджуваних ензимів у сироватці крові щурів, що може свідчити про значний ступінь цитолізу гепатоцитів і кардіоцитів піля отруєння. Старі щури виявились найчутливішими стосовно цих показників. У печінці та міокарді тварин різних вікових категорій відмічене зниження активності амінотрансфераз після потрапляння натрію нітриту на тлі інтоксикації тютюновим димом, що підтверджує прояв цитолітичного ефекту використаних нами ксенобіотиків.

Для виявлення токсичного впливу активних метаболітів кисню на кров визначено еритроцитарний індекс інтоксикації – маркер проникності еритроцитарної мембрани. За дії використаних нами ксенобіотиків збільшується проникність еритроцитарної мембрани, причому використання обох токсикантів одночасно спричинює сумацію їх токсичного впливу. На нашу думку, таке зростання проникності еритроцитарної мембрани може бути однією з причин підвищеного вмісту метгемоглобіну, яке має місце за нітритного ураження та показане нами у попередніх дослідженнях. Одна з причин зміни проникності клітинних мембран за дії натрію нітриту та тютюнового диму – токсичний вплив їх метаболітів на структурні компоненти саме мембран (як ліпідні, так і білкові).

Розвиток деструктивних процесів в ураженому організмі спричиняє нагромадження у крові вторинних токсичних продуктів, які утворюються після потрапляння до нього екзогенних токсикантів, і поглиблює ендогенну інтоксикацію (Winchester and Audia, 2006; Panina et al., 2008). У наших експериментах це підтверджується вірогідним збільшенням вмісту в сироватці крові статевонезрілих, статевозрілих і старих щурів молекул середньої маси. Після ураження токсикантами у сироватці крові тварин усіх вікових груп зростає вміст молекул середньої маси обох фракцій ($СМ_1$ – переважають ланцюгові амінокислоти та $СМ_2$ – переважають ароматичні амінокислоти), що може бути наслідком деградації в організмі білкових молекул, гормонів, пігментів, нуклеотидів, зумовленої утворенням значної кількості вторинних токсинів (після активації вільнорадикальних процесів) на тлі потрапляння до організму первинних токсикантів.

Таким чином, виявлені нами метаболічні порушення після отруєння щурів токсикантами ускладнюються одночасним їх впливом на організм. Найбільш виражені зміни спостерігали у щурів статевонезрілого віку.

Отримані нами дані вказують на перспективність подальших досліджень із метою пошуку адекватних методів корекції, які можуть бути використані як із лікувальною, так і з профілактичною метою.

Висновки

Ураження щурів натрію нітритом на тлі 30-добової інтоксикації тютюновим димом супроводжується збільшенням концентрації у нейтрофілах крові активних форм кисню. Останні, проявляючи токсичний вплив на різні компоненти мембран і біомакромолекули в організмі, спричиняють зміни проникності мембран гепатоцитів і кардіоміоцитів, а також збільшення проникності еритроцитарних мембран, на що вказує підвищення активності у сироватці крові амінотрансфераз, збільшення еритроцитарного індексу інтоксикації. Нагромадження проміжних токсичних продуктів поглиблює ендогенну інтоксикацію, маркери якої – молекули середньої маси. Їх вміст у сироватці крові вірогідно зростає після ураження натрію нітритом на тлі 30-добової тютюнової інтоксикації. Найчутливіші до дії тютюнового диму та натрію нітриту – статевонезрілі щури. Протягом усього експерименту досліджувані показники саме у цієї групи тварин зазнали найбільших змін.

References

Baek, J., Zhang, X., Williams, M., Hicks, W., Buehler, P., & D'Agnillo, F. (2015). Sodium nitrite potentiates renal oxidative stress and injury in hemoglobin exposed guinea pigs. Toxicology, 333, 89–99.

Behera, S., Xian, H., & Balasubramanian, R. (2014). Human health risk associated with exposure to toxic elements in mainstream and sidestream cigarette smoke. Science of The Total Environment, 472(15), 947–956.

Buehler, P., Butt, O., & D'Agnillo, F. (2011). Sodium nitrite induces acute central nervous system toxicity in guinea pigs exposed to systemic cell-free hemoglobin. Biochemical and Biophysical Research Communications, 409(3), 412–417.

Churg, A., Cosio, M., & Wright, J. (2008). Mechanisms of cigarette smoke-induced COPD: Insights from animal models. American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology, 294(4), L612–631.

El-Sheikh, N., & Khalil, F. (2011). L-arginine and l-glutamine as immuno-nutrients and modulating agents for oxidative stress and toxicity induced by sodium nitrite in rats. Food and Chemical Toxicology, 49(4), 758–762.

Festing, S., & Wilkinson, R. (2007). The ethics of animal research. Talking Point on the Use of Animals in Scientific Research European Molecular Biology Organization Reports, 8(6), 526–530.

Gladwin, M., Grubina, R., & Doyle, M. (2009). The new chemical biology of nitrite reactions with hemoglobin: R-state catalysis, oxidative denitrosylation, and nitrite reductase/anhydrase. Accounts of Chemical Research, 42(1), 157–167.

Gross, D., & Tolba, R. (2015). Ethics in animal-based research. European Surgical Research, 55, 43–57.

Hagstad, S., Bjerg, A., Ekerljung, L., Backman, H., Lindberg, A., Rönmark, E., & Lundbäck, B. (2014). Passive smoking exposure is associated with increased risk of COPD in never smokers. Chest, 145(6), 1298–1304.

Halima, B., Sarra, K., & Kais, R. (2009). Indicators of oxidative stress in weanling and pubertal rats following exposure to nicotine via milk. Human and Experimental Toxicology, 29, 489–496.

Ignatowicz, E., Woźniak, A., Kulza, M., Seńczuk-Przybyłowska, M., & Cimino, F. (2012). Exposure to alcohol and tobacco smoke causes oxidative stress in rats. Pharmacological Reports, 65(4), 906–913.

Ivanov, I., Gluhcheva, Y., Petrova, E., & Antonova, N. (2014). Hemorheological changes and hematometric erythrocyte characteristics in rats after sodium nitrite intoxication. Korea Australia Rheology Journal, 26(2), 225–228.

Jensen, F. (2009). The role of nitrite in nitric oxide homeostasis: A comparative perspective. Biochimica et Biophysica Acta, 1787(7), 841–848.

Kuznetsov, A., Kehrer, I., Kozlov, A., Haller, M., Redl, H., Hermann, M., Grimm, M., & Troppmair, J. (2011). Mitochondrial ROS production under cellular stress: Comparison of different detection methods. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 400(8), 2383–2390.

Luchese, C., Pinton, S., & Nogueira, C. (2009). Brain and lungs of rats are differently affected by cigarette smoke exposure: Antioxidant effect of an organoselenium compound. Pharmacological Research, 59(3), 194–201.

Maruschak, M. I. (2012). Rol' aktivnikh form kisnyu u rozvitku í progresuvanní gostrogo urazhennya legen' v yeksperimentí [The role of reactive oxygen species in the development and progression of acute lung injury in experiments]. Medical Chemistry, 50, 104–108 (in Ukrainian).

McGill, M. (2016). The past and present of serum aminotransferases and the future of liver injury biomarkers. Experimental and Clinical Sciences International Online Journal for Advances in Science, 15, 817–828.

Nikolaichik, V., Kirkovski, V., & Main, V. (1989) Sredniye molekuly obrazovaniye i sposoby opredeleniya [Average molecules formation and methods of determination]. Laboratory Work, 8, 31–33 (in Russian).

Ozer, J., Ratner, M., Shaw, M., Bailey, W., & Schomaker, S. (2008). The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. Toxicology, 245(3), 194–205.

Panina, L., Terletska, S., & Kovalchuk, S. (2008). Otsinka endohennoyi intoksykatsiyi orhanizmu za umov eksperymental′noyi hemichnoyi hipoksiyi [Evaluation of endogenous intoxication under the experimental hypoxia hemic]. Achievements of Clinical and Experimental Medicine, 2, 72–76 (in Russian).

Pappas, R. (2011). Toxic elements in tobacco and in cigarette smoke: Inflammation and sensitization. Metallomics, 3(11), 1181–1198.

Pickering, A., Vojtovich, L., & Tower, J. (2013). Oxidative stress adaptation with acute, chronic, and repeated stress. Free Radical Biology and Medicine, 55, 109–118.

Pikas, O. (2015). Pro stan kurínnya tsigarok u suchasnikh umovakh, yogo vpliv na viniknennya zakhvoryuvan' v organízmí lyudini [On the level of cigarette smoking in modern conditions, its effect on the occurrence of diseases in humans]. Bukovina Medical Journal, 76, 227–230 (in Ukrainian).

Reitman, S., & Frankel, S. (1957) Definition of biochemical indicators of the toxicity of liver. American Journal of Clinical Pathology, 28(1), 56–60.

Shihadeh, A., Schubert, J., Klaiany, J., Sabban, M., Luch, A., & Saliba, N. (2015). Toxicant content, physical properties and biological activity of waterpipe tobacco smoke and its tobacco-free alternatives. Tobacco Control, 24(1), 22–30.

Stangherlin, E., Luchese, C., Ardais, A., & Nogueira, C. (2009). Passive smoke exposure induces oxidative damage in brains of rat pups: Protective role of diphenyl diselenide. Inhalation Toxicology, 21, 868–874.

Tarrant, J., Meyer, D., & Katavolos, P. (2013). Use of optimized aminotransferase methods in regulated preclinica studies. Veterinary Clinical Pathology, 42(4), 535–538.

Tohaybaev, A., Kurhuzkyn, A., & Rykun, I. (1988) Metod diagnostiki endogennoy intoksikatsii [Method of diagnosis endohennoy intoxication Laboratory Work, 22–24 (in Russian).

Valavanidis, A., Vlachogianni, T., & Fiotakis, K. (2009). Tobacco smoke: Involvement of reactive oxygen species and stable free radicals in mechanisms of oxidative damage, carcinogenesis and synergistic effects with other respirable particles. International Journal of Environmental Research and Public Health, 6, 445–462.

Varela-Carver, A., Parker, H., Kleinert, C., & Rimoldi, O. (2010). Adverse effects of cigarette smoke and induction of oxidative stress in cardiomyocytes and vascular endothelium. Current Pharmaceutical Design, 16, 2551–2558.

Wang, X., Fang, H., Huang, Z., Shang, W., Hou, T., Cheng, A., & Cheng, H. (2013). Imaging ROS signaling in cells and animals. Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany), 91(8), 917–927.

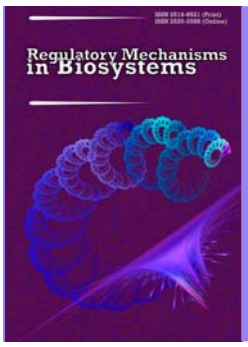
Westbrook, D., Anderson, P., Pinkerton, K., & Ballinger, S. (2010). Perinatal tobacco smoke exposure increases vascular oxidative stress and mitochondrial damage in non-human primates. Cardiovascular Toxicology, 10, 216–226.

Winchester, J., & Audia, P. (2006). Extracorporeal strategies for the removal of middle molecules. Seminars in Dialysis, 19(2), 110–114.

Wipfli, H., & Samet, J. (2009). Global economic and health benefits of tobacco control: Part 1. Clinical Pharmacology and Therapeutics, 86(3), 263–271.

Wright, J., & Churg, A. (2010). Animal models of cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease. Expert Review of Respiratory Medicine, 4(6), 723–734.

Yrhashev, T., & Karimov, A. (2009). Vliyaniye nitratov na organizm cheloveka i zhivotnykh [Effect of nitrates on the organisms of humans and animals]. Nodyr, Dushanbe (in Russian).



Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(2), 265–270
doi: 10.15421/021741

Morphofunctional characteristics of hepatocytes after exposure to intermittent normobaric hypoxia in normotensive and hypertensive rats

R. Yanko, V. Berezovskii, E. Chaka, M. Levashov, L. Plotnikova, I. Litovka

A. A. Bogomolets Institute of Physiology of NAS of Ukraine, Kiev, Ukraine

Article info

Received 24.03.2017
Received in revised form 20.04.2017
Accepted 23.04.2017

A. A. Bogomolets Institute of Physiology of NAS of Ukraine, Bogomolets Str., 4, Kiev, 01024, Ukraine.
Tel.:+38-044-256-24-77.
E-mail: biolag@ukr.net

Yanko, R., Berezovskii, V., Chaka, E., Levashov, M., Plotnikova, L., & Litovka, I. (2017). Morphofunctional characteristics of hepatocytes after exposure to intermittent normobaric hypoxia in normotensive and hypertensive rats. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(2), 265–270. doi:10.15421/021741

There are only few studies in which the effect of intermittent normobaric hypoxia on the liver status in animals and people with arterial hypertension has been investigated. That's why it's necessary to carry out these studies in animals with high blood pressure. The purpose of this work was to carry out comparative studies of the effect of dosed intermittent normobaric hypoxia on the morphofunctional state of hepatocytes of normotensive (line Wistar) and spontaneously hypertensive (line SHR) rats, age 4 months. The experimental rats were daily exposed to hypoxic gas mixture (12% oxygen in nitrogen) in intermittent mode: 15 minutes deoxygenation / 15 minutes reoxygenation for 2 hours. The duration of the experiment was 28 days. Histological, morphometric and biochemical research methods were used. The histological preparations were made by the standard methods. The slides were photographed using a digital camera on the microscope "Nikon" (Japan). The morphometric analysis was performed on digital images using the computer program "Image J". The activity of cytochrome oxidase and succinate dehydrogenase enzymes in a suspension of hepatocytes mitochondria was determined by the method of R. S. Krivchenkov. An increase was observed in the size of hepatocytes and their nucleus, in the number of binuclear hepatocytes and nucleolus in the liver of both experimental lines of animals after exposure to intermittent normobaric hypoxia. The distance between adjacent nuclei of hepatocytes decreased. Cytochrome oxidase activity in a suspension of mitochondria increased. These morphological changes took place in the liver parenchyma of the both experimental lines of rats. But they were more pronounced in the liver of rats of the Wistar line than in the SHR line. Our data indicated that dosed normobaric hypoxia had a one-way, stimulating effect on the morphofunctional activity of hepatocytes, but the severity of this effect in rats of different lines was not the same. The obtained data can have not only theoretical value, but also be of some practical interest when using intermittent normobaric hypoxia for medical and health purposes in patients with impaired liver function and arterial hypertension.

Keywords: intermittent normobaric hypoxia; liver parenchyma; morphometry; arterial hypertension; cytochrome oxidase

Морфофункциональная характеристика гепатоцитов нормотензивных и гипертензивных крыс после воздействия прерывистой нормобарической гипоксии

Р. В. Янко, В. А. Березовский, Е. Г. Чака, М. И. Левашов, Л. Н. Плотникова, И. Г. Литовка

Институт физиологии имени А. А. Богомольца НАН Украины, Киев, Украина

Исследовали влияние дозированной нормобарической гипоксии (12% кислорода в азоте) в прерывистом режиме (15 мин. деоксигенация, 15 мин. реоксигенация в течение 2 часов ежедневно на протяжении 28 суток) на морфофункциональное состояние гепатоцитов нормотензивных (линия Wistar) и спонтанно-гипертензивных (линия SHR) молодых крыс-самцов. Использованы гистологические, морфометрические и биохимические методы исследования. Гистологические препараты изготавливали по стандартной методике. На цифровых изображениях препаратов осуществляли морфометрию с помощью компьютерной программы Image J. В печени подопытных животных обеих линий после воздействия прерывистой нормобарической гипоксии выявлено увеличение размеров гепатоцитов и их ядер, количества двуядерных клеток и ядрышек в ядрах, уменьшение расстояния между ядрами смежных гепатоцитов, а также возрастание активности цитохромоксидазы в суспензии митохондрий. В паренхиме печени крыс линии Wistar эти морфофункциональные изменения были выражены в большей степени, чем в печени крыс линии SHR. Полученные данные свидетельствуют о том, что прерывистая нормобарическая гипоксия оказывает однонаправленный, стимулирующий эффект на морфофункциональную активность гепатоцитов, но степень выраженности данного эффекта у крыс разных линий не одинакова. Результаты могут не только иметь

теоретическое значение, но и представлять определенный практический интерес при использовании прерывистой нормобарической гипоксии в лечебных и оздоровительных целях у больных с нарушением функций печени.

Ключевые слова: прерывистая нормобарическая гипоксия; печень; морфометрия; артериальная гипертензия; цитохромоксидаза

Введение

Вопрос о механизмах и закономерностях адаптации организма к изменениям важнейших факторов внешней среды остается одной из актуальных проблем современной биологии и медицины. Важность данной проблемы для практической медицины обусловлена также тем, что адаптационные реакции составляют основу естественной профилактики болезней и сохранения здоровья человека (Dasgupta, 2016). Согласно широко известной концепции о перекрестной адаптации, возникновение устойчивости организма к одному экстремальному фактору может повышать его устойчивость к иным неблагоприятным воздействиям. Продолжительное воздействие дозированной умеренной гипоксии на человека и животных активирует комплекс защитно-приспособительных механизмов, способствующих повышению неспецифической резистентности организма (Chizhov and Billo, 2007; Berezovsky, 2012).

Функциональное состояние печени является одним из индикаторов гомеостазиса организма в целом. Печень обладает высокой чувствительностью к недостатку кислорода, что обусловлено высокой интенсивностью протекающих в ней метаболических процессов (Rui, 2014). Проблема влияния гипоксии на состояние печени настолько обширна, сложна и многогранна, что многие ее аспекты остаются не решенными и сохраняют свою актуальность до настоящего времени. На протяжении длительного времени исследовали, главным образом, физиологические механизмы адаптации к гипоксии, а также ее роль в патогенезе различных заболеваний. В частности, изучена роль респираторной, циркуляторной, тканевой, гемической гипоксии в патогенезе тяжелых нарушений функции печени (Feng et al., 2010; Aron-Wisnewsky et al., 2011; da Rosa et al., 2012). Большинство этих исследований выполнено в условиях острого и хронического воздействия гипобарической гипоксии различной степени выраженности и продолжительности (Siques et al., 2013; Tian et al., 2016). Пониженное атмосферное давление усугубляет негативные последствия воздействия гипоксии на организм человека. Со времен Н. Н. Сиротинина (Sirotinin, 1949) гипоксия стала рассматриваться не только как повреждающий фактор, а и как немедикаментозный метод повышения защитных приспособительных возможностей организма в лечебно-профилактической практике. Профессором Стрелковым и соавторами разработаны основы использования гипоксических газовых смесей для этих целей в виде прерывистой нормобарической гипоксии (Karash, 1988). Профессором В. А. Березовским (Berezovskiy, 2012) разработана концепция саногенной гипоксии. В соответствии с данной концепцией гипоксия, соответствующая высоте 1,5–3,0 тыс. м над уровнем моря (12–17% кислорода), оказывает лечебное и оздоравливающее действие на организм человека. Воздействие гипоксическими газовыми смесями, соответствующими данной высоте, в прерывистом режиме в условиях нормального атмосферного давления, с одной стороны, исключает неблагоприятные последствия гипобарии и гипоксии, а с другой – потенцирует саногенные эффекты последней. В настоящее время прерывистая нормобарическая гипоксия все более широко используется в клинической практике для лечения и профилактики ряда заболеваний сердечно-сосудистой, дыхательной, эндокринной, пищеварительной, иммунной и других систем организма (Mekjavic et al., 2012; Serebrovskaya and Xi, 2015, 2016; Lutz Schega et al., 2016). Механизмы саногенного действия нормобарической гипоксии требуют дальнейшего изучения и уточнения. Исследования, в которых бы описывалось влияние прерывистой нормобарической гипоксии саногенного уровня на морфофункциональное состояние гепатоцитов, единичны (Lebkova et al., 1999; Yanko, 2011).

Данные литературы о влиянии гипоксических газовых смесей на функциональное состояние печени неоднозначны. Это можно связать, с одной стороны, с существующим многообразием методических подходов, используемых для моделирования гипоксических состояний, а с другой – с индивидуальными, внутри- и межвидовыми различиями устойчивости живых существ к гипоксии (Savransky et al. 2007; Berezovs'kyi et al., 2012). Большинство исследований, посвященных влиянию прерывистой нормобарической гипоксии (ПНГ) на состояние паренхимы печени, проведено на крысах линии Wistar (Yanko, 2011; Simoes et al., 2013). Работ, в которых бы исследовалось влияние ПНГ на состояние печени у животных и людей с артериальной гипертензией, нами не обнаружено. Можно полагать, что воздействие ПНГ на людей или животных с повышенным артериальным давлением может оказать как прямое, так и опосредованное влияние на состояние паренхимы печени. С другой стороны, длительная артериальная гипертензия также может привести к нарушению морфофункционального состояния печени и изменить тем самым характер адаптивных перестроек, характерных для воздействия ПНГ. Широкое распространение сочетанной патологии органов пищеварения и кровообращения требует комплексного подхода не только к лечению таких больных, но и к усовершенствованию существующих методов ранней диагностики и профилактики данных заболеваний. Это обуславливает необходимость проведения исследований на животных с повышенным артериальным давлением.

Цель статьи – сравнить влияние дозированной прерывистой нормобарической гипоксии саногенного уровня на морфофункциональное состояния гепатоцитов нормо- и гипертензивных крыс.

Материал и методы исследований

Исследование проведено на 48 нормотензивных (линия Wistar) и спонтанно-гипертензивных (линия SHR) крысах-самцах. Животные взяты из питомника вивария Института физиологии имени А. А. Богомольца НАНУ. Возраст крыс на конец эксперимента составлял 4 месяца, масса – 270 ± 10 г. Крысы находились в унифицированных условиях на стандартном рационе питания. Артериальное давление у крыс определяли в условиях вивария неинвазивным методом на хвостовой артерии. Все измерения проводили с помощью сфигмоманометра (S-2 SHE, Германия). В эксперимент брали крыс линии SHR с систолическим давлением не ниже 145 мм рт. ст.

Животные были разделены на четыре группы: I и III – контрольные крысы линии Wistar и SHR соответственно, II и IV – подопытные крысы линии Wistar и SHR. Крысы подопытных групп ежедневно дышали гипоксической газовой смесью. Для проведения сеанса гипоксического воздействия крыс размещали в герметичной камере, в которую с мембранного газоразделительного элемента подавали гипоксическую газовую смесь (12% кислорода в азоте) в прерывистом режиме: 15 мин. деоксигенация, 15 мин. реоксигенация в течение 2 часов. Все оставшееся время суток (22 часа) крысы находились в клетке и дышали атмосферным воздухом. Общая продолжительность эксперимента составляла 28 суток. Крыс выводили из эксперимента путем декапитации под эфирным наркозом. Все протоколы исследований соответствовали положениям Конвенции по биоэтике Совета Европы (1997), Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации (1996), Европейской конвенции о защите позвоночных животных, которые используются для экспериментальных и других научных целей (Страсбург, 1985), общим этичным принципам экспериментов на животных, принятым Первым национальным конгрессом Украины по биоэтике

(2001), а также Комитетом по биомедицинской этике Института физиологии имени А. А. Богомольца НАНУ.

Для морфометрических исследований из ткани печени готовили гистологические препараты по стандартной методике: фиксировали в жидкости Буэна, обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации и диоксане, заливали в парафин. Срезы окрашивали гематоксилином Бемера и эозином, а для выявления элементов соединительной ткани – методом Ван-Гизона и Массона (Korzhevskij and Giljarov, 2010). При использовании цифровой камеры микропрепараты фотографировали на микроскопе «Nicon» (Япония). На цифровых изображениях препаратов осуществляли морфометрию с помощью компьютерной программы «Image J».

На гистологических срезах печени подсчитывали количество гепатоцитов, ядрышек (на 100 ядер), измеряли средний диаметр, площадь поперечного сечения гепатоцитов, их ядер и цитоплазмы, расстояние между ядрами смежных клеток. Подсчет количества гепатоцитов проводили в 10 полях зрения микроскопа, а измерения площади осуществляли для каждой клетки с подсчетом среднего значения по отношению к 100 клеткам. Все морфометрические измерения гепатоцитов проводили при увеличении микроскопа в 400 раз (Nikonenko, 2013).

Активность ферментов энергетического метаболизма – цитохромоксидазы и сукцинатдегидрогеназы в суспензии митохондрий гепатоцитов определяли методом Krivchenkova (1977).

Статистическую обработку осуществляли методами вариационной статистики с помощью компьютерной программы Statistica 6.0. Нормальность распределения цифровых массивов проверяли используя критерий Пирсона. При нормальности распределения для оценки коэффициента различий достоверности разницы между контрольными и подопытными группами использовали t-критерий Стьюдента. Различия считали достоверными при $P < 0,05$.

Результаты

После воздействия ПНГ у крыс обеих линий паренхима печени сохраняла физиологическую структуру. Печеночные пластинки имели радиальную направленность, центральные вены, ветви воротной вены, синусоиды оставались умеренно кровенаполненными. Междольковая соединительная ткань была выражена слабо. В центральных венах местами наблюдали скопления эритроцитов. Гепатоциты среднего и большого размера имели хорошо выраженную мембрану. Ядра округлой формы, фиолетовой окраски, расположены в центре клетки. Ядерная мембрана сохранена и имела четкие очертания. Окраска цитоплазмы была умеренно интенсивной, равномерно розовой. Иногда в ней встречались вакуоли или включения. Ядрышки округлой формы, среднего размера (рис. 1).

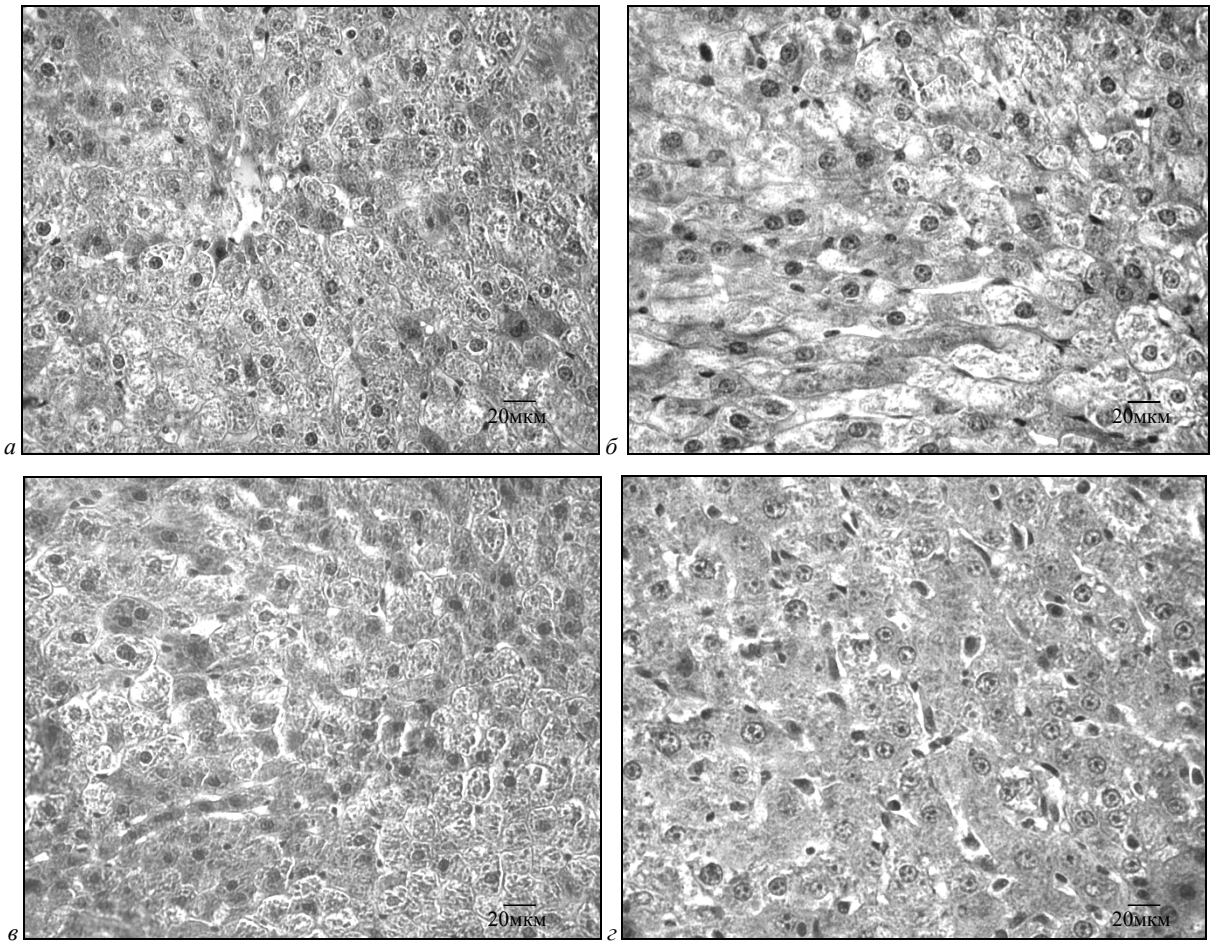


Рис. 1. Микрофотография печени контрольных (*а* – линия Wistar, *в* – линия SHR) и подопытных (*б* – линия Wistar, *г* – линия SHR) крыс: окраска гематоксилином Бемера и эозином

Сравнительные исследования структуры паренхимы печени контрольных крыс разных линий позволили выявить определенные различия. Гепатоциты крыс линии SHR имели достоверно большие размеры: площадь поперечного сечения клетки, ее ядра и цитоплазмы превышали на 22%, 34% и 39% соответствующие показатели крыс линии Wistar. Кроме того, у животных этой линии в поле зрения наблюдали большее количество одноядерных (на 6%) и двуядерных (на 13%, $P < 0,05$) гепатоцитов (табл.).

У крыс обеих линий, подвергавшихся воздействию прерывистой гипоксии, отмечали достоверно больший размер гепатоцитов. У подопытных животных линии Wistar средний диаметр гепатоцитов был больше на 12%, а площадь поперечного сечения клеток, их ядер и цитоплазмы – на 33%, 48% и 51%

соответственно, чем у контрольных крыс. Ядерно-цитоплазматическое соотношение увеличилось на 12% ($P < 0,05$). У подопытных крыс линии SHR наблюдали менее значительное увеличение размеров гепатоцитов: среднего диметра – на 5%, площади клетки – на 7%, ее ядра – на 28% ($P < 0,05$) и цитоплазмы – на 3% по сравнению с контролем. Ядерно-цитоплазматическое соотношение достоверно возросло на 26% (табл.).

После воздействия ПНГ в ядрах гепатоцитов подопытных крыс обеих линий количество ядрышек было на 11% (линия Wistar) и 23% (линия SHR) больше, чем у контрольных. При этом ядрышко-ядерное соотношение, наоборот, уменьшилось на 24% ($P < 0,05$) и 4% соответственно за счет более существенного увеличения площади ядер гепатоцитов по сравнению с суммарной площадью ядрышек (табл.).

Таблица

Морфометрические показатели функционального состояния гепатоцитов контрольных и подопытных крыс разных линий ($M \pm m$, $n = 12$)

Показатели	Линия Wistar		Линия SHR	
	контроль	гипоксия	контроль	гипоксия
Диаметр гепатоцита, мкм	20,0 ± 0,26	22,3 ± 0,71*	21,9 ± 0,56	23,1 ± 0,47
Площадь, мкм^2:				
гепатоцита	340,7 ± 15,20	454,6 ± 18,01*	414,6 ± 17,10**	444,0 ± 18,70
ядра	49,1 ± 1,64	72,7 ± 3,99*	65,9 ± 1,48**	84,5 ± 2,47*
цитоплазмы	291,6 ± 12,91	381,9 ± 22,20*	348,7 ± 13,50**	359,5 ± 17,0
Ядерно-цитоплазматическое соотношение	0,17 ± 0,006	0,19 ± 0,004*	0,19 ± 0,009	0,24 ± 0,008*
Количество гепатоцитов (в поле зрения при ^{x}400 раз):				
общее	125,6 ± 2,90	137,5 ± 2,86	133,3 ± 6,05	130,6 ± 3,95
одноядерных	122,5 ± 3,11	133,7 ± 3,81	129,8 ± 6,13	126,8 ± 3,86
двуядерных	3,1 ± 0,11	3,8 ± 0,12*	3,5 ± 0,10**	3,8 ± 0,27
Соотношение двуядерные/одноядерные гепатоциты	0,025 ± 0,001	0,028 ± 0,001*	0,027 ± 0,001	0,030 ± 0,001
Количество ядрышек в ядре	1,69 ± 0,04	1,87 ± 0,05*	1,64 ± 0,05	2,02 ± 0,05*
Ядрышко-ядерное соотношение	0,034 ± 0,001	0,026 ± 0,001*	0,025 ± 0,002**	0,024 ± 0,001
Расстояние между ядрами смежных гепатоцитов	11,4 ± 0,38	9,85 ± 0,29*	11,7 ± 0,35	9,9 ± 0,27*

Примечание: * – $P < 0,05$ по сравнению с контролем; ** – $P < 0,05$ по сравнению с контролем линии Wistar.

В печени подопытных животных линии Wistar выявлена тенденция к увеличению (на 9%) как общего количества, так и количества одноядерных гепатоцитов. Количество одноядерных гепатоцитов у подопытных животных линии SHR не отличалось от контрольных значений. После воздействия ПНГ количество двуядерных гепатоцитов у крыс линии Wistar и SHR было больше на 23% ($P < 0,05$) и 9% соответственно, чем в контроле (табл.).

В паренхиме печени подопытных крыс как линии Wistar, так и линии SHR выявлено достоверное уменьшение расстояния между ядрами смежных гепатоцитов на 11% и 15% соответственно, по сравнению с контрольными показателями (табл.).

Активность сукцинатдегидрогеназы в суспензии митохондрий гепатоцитов подопытных крыс обеих линий после воздействия ПНГ, не отличалась от такового показателя контрольных животных, тогда как активность цитохромоксидазы в суспензии митохондрий гепатоцитов подопытных животных линии Wistar и SHR возросла, соответственно, на 14% и 40% ($P < 0,05$) (рис. 2).

Обсуждение

После воздействия ПНГ в паренхиме печени крыс линии Wistar отмечали более выраженные морфометрические изменения, чем в печени подопытных крыс линии SHR. В печени подопытных животных обеих линий выявлено увеличение размеров гепатоцитов и их ядер, количества двуядерных клеток и ядрышек в ядрах, уменьшение расстояния между ядрами смежных гепатоцитов. Гипертрофия гепатоцитов, их ядер и увеличение ядерно-цитоплазматического соотношения свидетельствует, прежде всего, о повышении их функциональной активности. Увеличение размеров гепатоцитов может быть показателем активации внутриклеточных пластических процессов, повышающих энергетические возможности клеток. Такие изменения также могут указывать на подготовку клетки к митозу и связанную с ним интенсификацию синтеза нуклеиновых кислот, белков и т. д. Увеличение плоидности гепатоцитов может свидетельствовать об активации процессов физиологической регенерации (Duncan et al., 2010).

К основным функциям ядрышек относят синтез рРНК, участвующей в образовании субъединицы рибосом. Полагают, что увеличение количества ядрышек может свидетельствовать о повышении белоксинтетической активности клеток, а их гиперплазия – один из признаков активации физиологической регенерации гепатоцитов на внутриклеточном уровне (Boisvert et al., 2007). Для печени всех млекопитающих характерно наличие двуядерных гепатоцитов, количество которых изменяется на протяжении жизни. У взрослых животных и человека двуядерные гепатоциты встречаются постоянно, но их процент по отношению к общему количеству клеток может варьировать.

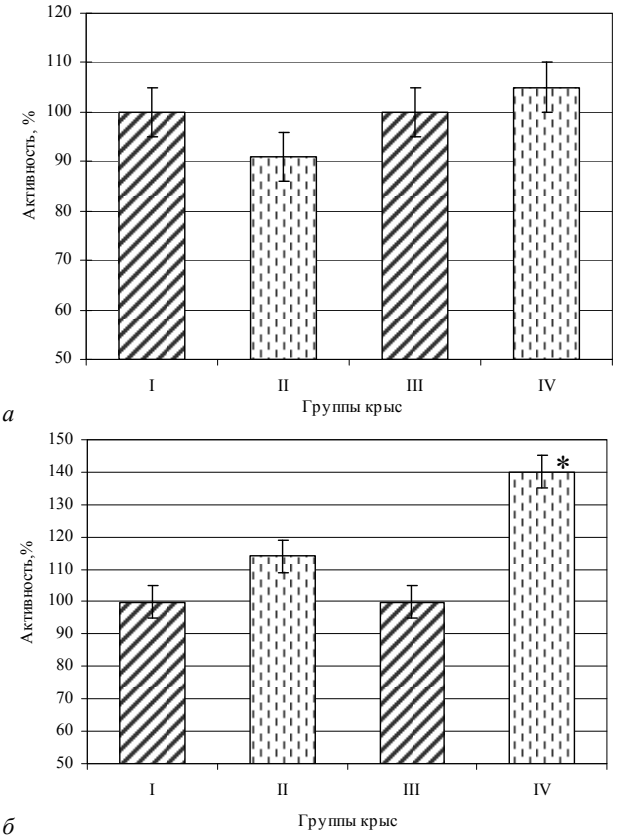


Рис. 2. Активность сукцинатдегидрогеназы (*а*) и цитохромоксидазы (*б*) в суспензии митохондрий гепатоцитов контрольных и подопытных крыс: * – $P < 0,05$ по сравнению с контролем; I и III – контрольные крысы линии Wistar и SHR соответственно, II и IV – крысы линии Wistar и SHR после воздействия прерывистой нормобарической гипоксии

Большинство исследователей склонны считать, что образование двуядерных гепатоцитов из одноядерных в процессе регенерации представляет собой резерв полиплоидизации, которая является эквивалентом клеточному размножению (Duncan et al., 2010; Romanova and Malyshev, 2011).

Уменьшение расстояния между ядрами смежных гепатоцитов может указывать на их более плотное расположение и снижение количества межклеточной соединительной ткани, что является характерным признаком активации процессов регенерации ткани.

Под воздействием ПНГ у крыс как линии Wistar, так и линии SHR (в большей степени) повышается энергетический потенциал митохондрий гепатоцитов, что выражается в возрастании активности цитохромоксидазы – фермента цикла Кребса. Ферменты сукцинатдегидрогеназа и цитохромоксидаза непосредственно участвуют в метаболизме кислорода и синтезе АТФ. Повышение их активности свидетельствует о большей сопряженности субстратного окисления и фосфорилирования, что приводит к увеличению энергетического потенциала в ткани (Ivanskaya and Antoneeva, 2004).

Положительное влияние прерывистой нормобарической гипоксии саногенного уровня на функциональную активность печени выявили и другие исследователи. После воздействия гипоксическими газовыми смесями (10% кислорода в азоте) в режиме 5 мин. деоксигенация, 5 мин. реоксигенация в течение 2 часов ежедневно на протяжении 10 дней активизировались пластические процессы в печени крыс: возросло количество митохондрий, пероксисом, мембран эндоплазматического ретикулума, лизосомных и липофусциновых образований. Выявлено также гипертрофию ядер гепатоцитов, гиперплазию агранулярного эндоплазматического ретикулума, полнокровие синусоидов (Lebkova et al., 1999). После воздействия дозированной гипоксии отмечены: улучшение кровенаполнения печени, активация микросомального окисления в гепатоцитах, стабилизация клеточных мембран, нормализация активности аминотрансфераз (Kurhaluk et al., 2013). При исследовании действия гипоксической газовой смеси Michael et al. (2003) наблюдали усиление экспрессии индуцируемых гипоксией транскрипционных факторов HIF-1α и HIF-2α в печени. При краткосрочном периодическом воздействии гипоксии происходит активация антиоксидантной системы, повышающей защиту клеточных мембран гепатоцитов (Arkhipenko et al., 2005).

Выводы

Результаты наших исследований свидетельствуют о том, что 28-суточная прерывистая нормобарическая гипоксия саногенного уровня активирует процессы физиологической регенерации и функциональной активности паренхимы печени. Об этом свидетельствует увеличение размеров гепатоцитов и их ядер, количества двуядерных клеток и ядрышек в ядрах, уменьшение расстояния между ядрами смежных гепатоцитов, а также возрастание активности цитохромоксидазы в суспензии митохондрий. Однако в паренхиме печени крыс линии Wistar данные морфофункциональные изменения были выражены в большей степени, чем в печени подопытных крыс линии SHR. Таким образом, дозированная нормобарическая гипоксия оказывает однонаправленный, стимулирующий эффект на морфофункциональную активность гепатоцитов, но степень выраженности данного эффекта у крыс разных линий не одинакова. Полученные данные могут не только иметь теоретическое значение, но и представлять определенный практический интерес при использовании прерывистой нормобарической гипоксии в лечебных и оздоровительных целях у больных с нарушением функций печени.

References

Arkhipenko, Y., Sazontova, T., & Zhukova, A. (2005). Periodic hypoxia and hyperoxia improves resistance of membrane structures in heart, liver and brain. Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 140(3), 278–281.

Aron-Wisnewsky, J., Minville, C., Tordjman, J., Lévy, P., Bouillot, J. L., Basdevant, A., Bedossa, P., Clément, K., & Pépin, J. L. (2012). Chronic intermittent hypoxia is a major trigger for non-alcoholic fatty liver disease in morbid obese. Journal of Hepatology, 56(1), 225–233.

Berezovskiy, V. A. (2012). Prirodnaya i instrumentalnaya oroterapiya [Natural and instrumental orotherapy]. Zaslavskiy A. Y., Donetsk (in Russian).

Berezovs'kyĭ, V. I., Ianko, R. V., Litovka, I. H., Chaka, O. H., & Zamors'ka, T. M. (2012). Dosed normobaric hypoxia as a non-medication approach of stimulation of physiological regeneration of liver parenchyma. Fiziolohichnyi Zhurnal, 58(3), 43–49.

Boisvert, F., Konningsbruggen, S., Navascues, J., & Lamond, A. (2007). The multifunctional nucleolus. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 8(7), 574–585.

Chizhov, A. J., & Billo, E. E. (2007). Gipoksicheskaja stimuljacija nespecificheskoj rezistentnosti organizma – metod povyshenija ustojchivosti k neblagoprijatnym jekologicheskim faktoram [Hypoxic stimulation of nonspecific resistance of the organism – a method of increasing resistance to unfavorable environmental factors]. Vestnik Rossijskogo Universiteta Druzhby Narodov, 6, 324–329 (in Russian).

da Rosa, D. P., Forgiarini, L. F., Baronio, D., Feijó, C. A., Martinez, D., & Marroni, N. P. (2012). Simulating sleep apnea by exposure to intermittent hypoxia induces inflammation in the lung and liver. Mediators of Inflammation, 879419.

Dasgupta, P. (2016). Climate sensitive adaptation in health. Springer, India.

Duncan, A. W., Taylor, M. H., Hickey, R. D., Hanlon Newell, A. E., Lenzi, M. L., Olson, S. B., Finegold, M. J., & Grompe M. (2010). The ploidy conveyor of mature hepatocytes as a source of genetic variation. Nature, 467(7316), 707–710.

Feng, S. Z., Tian, J. L., Zhang, Q., Wang, H., Sun, N., Zhang, Y., & Chen, B. Y. (2011). An experimental research on chronic intermittent hypoxia leading to liver injury. Sleep and Breathing, 15(3), 493–502.

Ivanskaja, N. N., & Antoneeva, I. I. (2004). Aktivnost' sukcinatdegidrogenazy i citohromoksidazi v pecheni krys pri ostroj cirkuljatornoj gipoksii [The activity of succinate dehydrogenase and cytochrome oxidase in the liver of rats with acute circulatory hypoxia]. Fundamental'nye Issledovanija, 4, 67–68 (in Russian).

Karash, J. M., Strelkov, R. B., & Chizhov, A. J. (1988). Normobaricheskaja gipoksija v lechenii, profilaktike i reabilitacii [Normobaric hypoxia in treatment, prevention and rehabilitation]. Moscow (in Russian).

Korzhevskij, D. J., & Giljarov, A. V. (2010). Osnovy gistologicheskoj tehniki [Fundamentals of histological technique]. SpecLit, Sankt-Peterburg (in Russian).

Krivchenkova, R. S. (1977). Opredelenie aktivnosti sukcinatdegidrogenazy v suspenzii mitohondrij [Determination of the activity of succinate dehydrogenase in a mitochondrial suspension]. Sovremennye Metody v Biohimiii. Medicina, Moscow, 44–46 (in Russian).

Kurhaluk, N., Tkachenko, H., & Nosar, V. (2013). The effects of intermittent hypoxia training on mitochondrial oxygen consumption in rats exposed to skeletal unloading. Annals of Clinical and Laboratory Science, 43(1), 54–63.

Lebkova, N. P., Chizhov, A. J., & Bobkov, J. I. (1999). Adaptacionnye vnutrikletochnye mehanizmy reguljacii jenergeticheskogo gomeostaza pri preryvistoj normobaricheskoj gipoksii [Adaptive intracellular mechanisms of regulation of energy homeostasis with intermittent normobaric hypoxia]. Rossiĭskii Fiziologicheskiĭ Zhurnal imeni I. M. Sechenova, 85(3), 403–411 (in Russian).

Mekjavic, I. B., Debevec, T., Amon, M., Keramidas, M. E., & Kounalakis, S. N. (2012). Intermittent normobaric hypoxic exposures at rest: Effects on performance in normoxia and hypoxia. Aviation, Space and Environmental Medicine, 83(10), 942–950.

Michael, S. W., Jan, S. J., Christian, R., Charlotte, K. S., & Jan, H. H. (2003). Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2a in distinct cell populations of different organs. FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 17(2), 271–273.

Nikonenko, A. G. (2013). Vvedenie v kolichestvennuju gistologiju [Introduction to quantitative histology]. Kniga-Pljus, Kiev (in Russian).

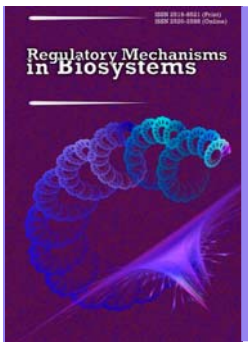
Romanova, L. P., & Malyshev, I. I. (2011). Rol' dvujadernyh gepatocitov v regeneracii pecheni posle mehanicheskoj travmy v rannem ontogeneze u krys [Role of binuclear hepatocytes in liver regeneration after mechanical trauma in early ontogenesis in rats]. Vestnik Chuvashskogo Universiteta, 3, 398–402 (in Russian).

Rui, L. (2014). Energy metabolism in the liver. Comprehensive Physiology, 4(1), 177–197.

Savransky, V., Nanayakkara, A., Vivero, A., Li, J., Bevans, S., Smith, P. L., Torbenson, M. S., & Polotsky, V. Y. (2007). Chronic intermittent hypoxia predisposes to liver injury. Hepatology, 45(4), 1007–1013.

Schega, L., Peter, B., Brigadski, T., Leßmann, V., Isermann, B., Hamacher, D., & Törpel, A. (2016). Effect of intermittent normobaric hypoxia on

aerobic capacity and cognitive function in older people. Find, Browse, and Follow Biomedical Journals, 19(11), 941–945.
Serebrovskaya, T. V., & Xi, L. (2015). Intermittent hypoxia in childhood: The harmful consequences versus potential benefits of therapeutic uses. Frontiers in Pediatrics, 19(3), 44.
Serebrovskaya, T. V., & Xi, L. (2016). Intermittent hypoxia training as non-pharmacologic therapy for cardiovascular diseases: Practical analysis on methods and equipment. Experimental Biology and Medicine (Maywood), 241(15), 1708–1723.
Simoes, R. R., Dutra, A. L., Finamor, I. A., Saccal, E. M., Pavanato, M. A., Llesuy, S. F., Portela, L. O., & Zanehet, E. M. (2013). The effect of intermittent hypoxic training under oxidative stress parameters in Wistar rats fed on standard and high fat diet. Caderno de Pesquisa, Serie Biologia, 25(2), 12–23.
Siques, P., Brito, J., Naveas, N., Pulido, R., De la Cruz, J. J., Mamani, M., & León-Velarde, F. (2014). Plasma and liver lipid profiles in rats exposed to chronic hypobaric hypoxia: Changes in metabolic pathways. High Altitude Medicine and Biology, 15(3), 388–395.
Sirotinin, N. N. (1949) Gipoksija i ee znachenie v patologii [Hypoxia and its importance in pathology]. Gipoksija, AN USSR, Kiev, 19–27 (in Russian).
Tian, Y., Liu, Y., Wang, S., Dong, Y., Su, T., Ma, H., & Zhang, Y. (2016). Anti-diabetes effect of chronic intermittent hypobaric hypoxia through improving liver insulin resistance in diabetic rats. Life Sciences, 150(1), 1–7.
Yanko, R. V. (2011). Physiological regeneration and functional activity of hepatocytes at normobaric hypoxia. International Journal of Physiology and Pathophysiology, 2(1), 35–42.



Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(2), 271–276
doi: 10.15421/021742

Immunohistochemical and clinical changes in the respiratory tract of chickens, naturally infected with the fowlpox virus

M. S. M. Al Rawashdeh

Mutah University, Al-Karak, Jordan

Article info

Received 24.03.2017
Received in revised form 20.04.2017
Accepted 23.04.2017

Animal Production Department, School of Agriculture, Mutah University, Al-Karak, P.O. Box 7, 61710, Jordan.
Tel: 00962-799-973-354.
E-mail: Drmsmr77 @yahoo.com

Al Rawashdeh, M. S. M. (2017). Immunohistochemical and clinical changes in the respiratory tract of chickens, naturally infected with the fowlpox virus. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(2), 271–276. doi:10.15421/021742

It is clear that currently the question of study of the pathological changes in the respiratory tract of chickens due to the impact of the fowlpox virus remains relevant, as the pathogenesis of nutritional deficiency, the presence of mycotoxins or the papilloma virus are characterized by the same clinical manifestations. We analyzed 88 chickens, naturally infected with the fowlpox virus, using clinical and immunohistochemical methods of investigation. Among all species of birds, we studied only chickens, data on which were collected for five years from veterinary clinics. The investigation revealed lesions basically characterized by the presence of changes in the typical structure of the chicken's respiratory tract. As a result, we found clear criteria for the pathological process in the respiratory tract of chickens, which are typical for fowlpox. Thus, we discovered respiratory tract obstruction, as well as many intracytoplasmic pale eosinophilic inclusions in hyperplastic cells. We found an accumulation of mononuclear cells consisting mainly of macrophages, lymphocytes, plasma and mononuclear cells inside the mucous and muscle membranes. Bronchial lumens were blocked by necrotic and desquamated epithelial cells, red blood cells, bacterial colonies and amorphous eosinophilic material. We found accumulations of lymphocytes and macrophages in the parenchyma of the lungs. The hyperplastic epithelial cells reacted immunohistochemically with antibodies against the fowlpox virus in the respiratory tract. Immunoreaction occurred mainly in the cytoplasm of infected cells, inclusions, and necrotic and desquamated cells. The study proved immunohistochemical methods of investigation can be a useful additional tool for establishing a final diagnosis, especially in acute and subacute phases of the disease. The following respiratory signs were observed in severe cases of fowlpox: damage to the lungs in 33 cases (46.5%), parabronchium – 20 (28.2%), parabronchial connective tissue – 8 (11.3%), and mucous membrane of the larynx and trachea – 10 (14.1%). In mild and moderate cases of fowlpox, the following respiratory signs were observed: hyperemia and thickening of the mucous membrane of the trachea – 14 (82.4%), as well as hyperemia in the nasal conchae and paranasal sinuses – 3 (17.7%). In the future, it will be necessary to conduct deeper studies to detect pathological manifestations of this disease, not only in the respiratory tract, but also in other organs and systems of chickens.

Keywords: study of pathogenesis; immunological disorders; histological changes; viral infection

Introduction

According to the literature, fowlpox is a disease that is widespread all over the world and is caused by the virus of the family Poxviridae, the genus *Avipoxvirus* (Fauquet, 2005; Tripathy, 2000). In addition, it is known that in the bird population its incidence is about 10% to 95%, and the mortality rate is about 50%. In fact, chickens are the main hosts of the fowlpox virus, but other bird species such as pheasants, peacocks, and turkeys (Medina et al., 2004) can be affected as well. Moreover, fowlpox is characterized by large economic losses, which is mainly due to the decline in egg production and excess mortality among birds (Ali et al., 2016; Bande et al., 2016).

There is a wealth of data in the literature various forms of the course of the disease. Thus, it has been reported that fowlpox is a slowly spreading viral infection which is often characterized not only by proliferative skin lesions, but also by changes in the upper gastrointestinal tract, respiratory tract (diphtheria form) (Singh et al., 1987; Docherty et al., 1991; Fallavena et al., 1993; Gortázar et al., 2002; Cavanagh, 2007; Bande et al., 2016).

However, it should be noted that this disease can occur in any age group of birds, but young birds are considered to be the most vulnerable age group (Smits et al., 2005). There are also no specific data on the time of year in which fowlpox is most prevalent, however, there are some data which indicate that the disease most often poses a risk to chickens during the warm months of the year. Along with that, the virus can be present in abundance in the focal points of infection and transmitted by contact through skin abrasions. Skin lesions (crusts), which are separated as a result of removal of birds from poultry houses, can also become the source of aerosol infection. Mosquitoes and other biting insects can serve as mechanical vectors of the disease. In addition, the disease tends to persist for extended periods in a birds of different ages in poultry production units due to the slow spread of the virus and the presence of susceptible birds (Smits et al., 2005).

So, the authors call attention to the fact that the fowlpox virus is considered sustainable in the environment over the course of observation. It has been reported that there are most likely special genes in the genome of the fowlpox virus that protect the virus from environmental hazards. In this case, the fowlpox virus is destroyed only at extremely high temperatures. Drying and cold can preserve it. In lyophilized form (a soft drying method, in which the freezing is first carried out, followed by putting a material into a vacuum chamber for sublimation of the solvent), it persists for up to 8 years,

and in pathological material (crust) at –15 °C remains virulent for more than two years (Smits et al., 2005).

According to the literature, the virions of the fowlpox virus have an oval or rectangular shape, sizes about 140 - 450 nm, as well as a complex type of symmetry. The virions of the fowlpox virus consist of a nucleoid containing a genome, lateral bodies and an external lipoprotein shell forming protrusions (da Silva et al., 2009).

Since it is known that viruses of different genera differ in biological properties, the principal properties are as follows: spectra of pathogenicity, virulence and hemagglutinating activity, according to which they differ significantly among themselves. In addition, all fowlpox viruses are DNA genomic and have a virion containing enzyme for their own transcription. In this connection, all viruses of this family replicate in the cytoplasm of cells without the need for cellular transcription enzymes. It is also important to note that strains of the fowlpox virus are identical in antigenic terms. It has been noted that field and vaccinal strains of the disease have only minor differences in the genomic profile (Smits et al., 2005).

In addition, structurally the virions of the fowlpox virus contain an external protein antigen as part of the surface villi (filaments), which can induce the formation of antihemagglutinating virus neutralizing antibodies, which in turn ensures the immune development after the disease. Internal polypeptides induce complement-fixing and precipitating antibodies (da Silva et al., 2009). Interestingly, the antigenic variability in this type of virus has not been established. However, strains of the fowlpox virus differ not only in the pathogenicity spectrum, but also in virulence (da Silva et al., 2009).

It is shown that the fowlpox virus is able to agglutinate erythrocytes of chickens of some species (0.5% suspension of erythrocytes in physiological saline, pH 7.2–7.4, 37 °C). When preserved with 0.5% formalin and stored at 4°C, the suspension of the virus retains hemagglutinating activity for more than 8 months and can be used in the hemagglutination and hemagglutination inhibition reactions (da Silva et al., 2009).

It is emphasized that the experimental infection is reproduced on nonimmune chicks and chickens when infected in a scarified crest, jowls and feather follicles (da Silva et al., 2009).

The incubation period of the disease lasts an average of 15 to 20 days. Further, sick birds show deteriorating appetite, lethargy, decline in egg production. The course of the disease can acquire cutaneous, diphtheritic or mixed forms. In diphtheritic form of fowlpox, lesions develop on the mucous membranes of the mouth, esophagus, pharynx, larynx and trachea. Sometimes lesions are observed in one or more of these organs (Pringle, 1999). In addition, scaly patches, closely adjacent to the mucous membrane of the larynx and oral cavity, or proliferative masses may develop. However, damage to the oral cavity often interferes with the birds' ability to feed. Tracheal lesions affect the respiratory tract. Mortality is usually high in the case of diphtheric infection, and can reach 70% (Bande et al., 2016).

Pathologicoanatomic changes are quite specific and are based primarily on the form of the course of the disease. Most often, ochroleucous soaring spots of different size, sometimes covered with red bloodstains, caseous masses or pseudomembranes in the respiratory tract and intestines (da Silva et al., 2009) can often be found in the patterns of dead birds. In the body of a sick bird, the virus is localized in the pock marks of the featherless areas of the head, on the pharyngeal, laryngeal, and tracheal mucosa. On the 17–20th day after infection, the virus can be found in the blood, kidneys, ovaries, spleen, brain. A bird which has experienced the disease retains a long-standing virus infection carrier state (for more than 10 months) (da Silva et al., 2009).

The literature actively discusses the issue of choosing a method for diagnosing fowlpox, which is usually based on epizootological, clinical, pathologicoanatomic and laboratory data. However, some scientists note that the diagnosis should be based primarily on laboratory tests (da Silva et al., 2009). Thus, histological examination of cutaneous or diphtheritic lesions reveals epithelial hyperplasia with intracytoplasmic inclusions in the affected cells. Elementary bodies can be found in smears of lesional tissues using the Gimenez staining technique. The researchers differentiate the diphtheritic form of fowlpox with tracheal injury from infectious laryngotracheitis, which is caused by the herpes virus and characterized by the presence of nucleoids (Ali et al., 2016; Bande et al., 2016).

Microscopic examination of invaded tissues stained with hematoxylin and eosin reveals eosinophilic cytoplasmic inclusions, which are also detected with fluorescent antibodies and immunohistochemical methods (Ali et al., 2016; Bande et al., 2016). Viral particles with a typical virus morphology are determined by transmission electron microscopy with negative coloration, as well as in ultrathin sections of lesions (Preis et al., 2014).

Immune responses to the fowlpox virus can be detected by virus neutralization, agar gel immunodiffusion, immunofluorescence, passive hemagglutination tests, enzyme immunoassay and immunoblotting (Ali et al., 2016; Bande et al., 2016). There are also indications in the literature that there is no cure for fowlpox. That is why chickens at poultry farms should be vaccinated with a virus vaccine derived from live embryos or a cell culture. The most widely used vaccines are attenuated fowlpox viruses and varicella-zoster viruses with high immunogenicity and low pathogenicity. In high-risk areas, vaccination with an attenuated vaccine in the first few weeks of life and revaccination between 12 and 16 weeks is often a sufficient preventive measure against the onset of the disease. The naturally infected or vaccinated birds develop a humoral, as well as a cell-mediated response (Shi et al., 2011).

Jordan has developed and currently uses two types of live respiratory vaccines: from a non-reactogenic heterologous strain of the fowlpox virus of New Jersey and from a naturally attenuated fowlpox cholera strain of AS-27, as well as a vaccine from an attenuated cultural strain of the fowlpox virus that is injected into the wing web. In vaccinated chicks immunity is maintained for an average of 3 to 6 months, in chickens up to 10 months.

Thus, fowlpox can be diagnosed by a veterinarian based on the history of the flock, the presence of typical lesions, and in some cases by microscopic and immunohistochemical examination of affected tissues (Ali et al., 2016; Bande et al., 2016).

However, it should be noted that currently there are reports in the literature that it is the immunohistochemical method of studying the fowlpox virus that is the most common and quickest way to diagnose the disease (Crespo et al., 2007).

In view of the above, the focus of this paper was to study immunohistochemical and clinical changes in the respiratory tract of chickens, naturally infected with the fowlpox virus.

Materials and Methods

Among all species of birds we dealt with chickens only, data on which had been collected from veterinary clinics for 5 years. The study included 88 chickens naturally infected with the fowlpox virus examined using clinical and immunohistochemical methods. Paranasal sinuses, nasal conchae, larynx, trachea, bronchi, parabronchial connective tissue, air sacs, and lungs served as samples for histopathological examination (Tripathy et al., 2000). The studied chickens weighed from 40.0 g to 3.5 kg. Pockmarks (crusts) were cut out of the sick birds and placed in a 50% glycerin solution and delivered to the laboratory in a thermos with a cooling mixture. The pockmarks were used directly to make impression smears, with subsequent drying, fixing in an alcohol ester mixture, staining and examination. The preserved pockmarks (crusts) were used to prepare a 10% suspension, which was used to isolate the virus.

Laboratory diagnostics included the identification of fowlpox virions (elementary bodies) by transmission electron microscopy – virusoscopy, chick-embryo culture, as well as by immunofluorescence test (IFT) and diffusion precipitation test in the gel (DPT).

Impression smears were stained by Morozov silver impregnation. The smears were covered with Ruge's liquid (reagent No. 1: 1.0 ml of glacial acetic acid, 2.0 ml of a 40% formaldehyde solution and 100 ml of distilled water) for 1 minute; washed with distilled water; etched with tannin solution (reagent No. 2: 1 g of

tannin and 5 ml of distilled water) for 1 to 2 minutes, preheated until the appearance of fumes; washed and treated with a solution of ammonia silver (reagent No. 3: 5 g of ammoniacal silver crystals were dissolved in 100 ml of distilled water, and a 25% ammonia solution was added dropwise to 80 ml of the resulting solution until the resolution of precipitate; for staining the resulting reagent was diluted with distilled water 1:10); slightly warmed to a dark brown colour of the smear; washed with distilled water and viewed under immersion oil using a transmission electron microscope. Virusoscopy was considered positive only in the presence of characteristic dark brown formations (Borrel elementary bodies – fowlpox virions) located in abundance throughout the yellowish smear.

Retrospective diagnosis of the fowlpox virus is rare. In the case of an expired course of the disease, chickens without visible clinical signs have paired sera examined by diffuse precipitation reaction (DPR). However, the precipitating serum of convalescents often appears to be subactive, with no antibodies detected in 15% of chickens with fowlpox. That's why we did not resort to this kind of diagnostic.

DPR strengths: simplicity of technique; quick response time; possibility of photographic recording of the result.

A bioassay test at negative virusoscopy was performed on 10 to 12-day chicken embryos, with the fowlpox virus isolated from pathological material. Chicken embryos were infected on the chorion allantoic and amniotic sacs (CAS), and incubated for 5 to 6 days. The detection of specific inclusion bodies (Bollinger bodies) in the cytoplasm of infected cells was an indicative method of indicating the fowlpox virus. Individual or homogenous pockmarks on CAS as well as a significant thickening or a tremelloid edema of the whole CAS (with a high infectious dose) were considered an indication of the virus replication. In the absence of pockmarks, three blind passages were made. CAS pockmarks were used to make impression smears and virusoscopy.

Sometimes, scientists also recommend that a bioassay test be performed on 3–4-month-old chicks which are nonimmune to the fowlpox virus and are inoculated with a 10% suspension of the pathological material by rubbing it (epicutaneously) into the scarified surface of the crest, or into the feather follicles of the drum. If there is a virus in the material, the variolar tissue lesions develop in the place of rubbing on the 5–6th day. The specific character of these lesions is identified by smear virusoscopy.

For stained sections established practices were used. For general examination, sections were stained with hematoxylin-eosine, with connective tissue stained to van Gieson. Histochemical methods involved Sudan III total grease staining, Brachet nucleic acid staining, mucicarmine staining. Hemosiderin pigment was identified by Perls staining, with glycogen and alkaline phosphatase activity identified by Iabadai and Gomori staining, respectively (Tripathy et al., 2000). Specimens were cut into 4 micron thick pieces, which were evaluated using a transmission electron microscope following dehydration (Tripathy et al., 2000).

To study immunohistochemical changes in tissues, material samples were stained with immunoperoxidase using polyclonal hyperimmune serum. All sections were dewaxed in xylene and rehydrated by means of alcohols. Endogenous peroxidase was blocked by means of 3% hydrogen peroxide. After washing with phosphate buffer for 5 minutes, specimen slides were incubated with normal rabbit serum for 30 minutes at an ambient temperature. Sections were incubated with polyclonal hen's hyperimmune serum against the fowlpox virus with 1/64 concentration in phosphate buffer for 30 minutes. Tissues were rinsed in phosphate buffer after each stage. Primary antibodies were omitted and replaced with a phosphate control buffer (Tripathy et al., 2000).

The arithmetic mean of the initial data and the Student's t-test – a method for estimating the significance of differences in mean values – were used as the basic statistical parameters. The Student's t-test allowed us to check the difference of mean values in two samples.

The statistical significance of the findings was a measure of reliability ("representative sampling"). The statistical data processing used methodological instructions on the principal methodological methods of statistical analysis in biological studies.

Results

In describing the abnormalities in occurring in chickens with this disease, we used the clinical features characterized by the presence of apathy in birds, as well as dyspnoea from moderate to severe severity. Some hens revealed conjunctival redness, palpebral and paranasal sinus edema. Studies have shown that tissue lesions were also characterized by typical changes in the structure of the respiratory tract of chickens. It was found, that in 71 individuals (80.7%) the disease was considerably severe, with 17 (19.3%) cases demonstrating mild to moderate severity.

When studying the course of the disease in birds with a severe degree of course of the disease, the following respiratory signs were observed: pulmonary involvement in 33 cases (or 46.5%), parabronchi in 20 cases (28.2%), parabronchial connective tissue in 8 cases (11.3%), as well as laryngeal and tracheal mucosa in 10 cases (14.1%). When studying the course of the disease in chickens in cases of mild and moderate severity, the following respiratory signs were observed: tracheal blennosis in 14 cases (82.4%), as well as hyperemia in the nasal conchae and paranasal sinuses in 3 cases (17.7%).

The course of fowlpox was characterized by the appearance of skin lesions on various parts of the body and mucous membranes of the nasal and oral cavities. The abnormalities in fowlpox were notable for their staging: macular erythema (local redness of the skin area), papule (compaction of the skin area due to cellular infiltration), vesicle (filling with vesicular serous fluid), pustule (transition of serous inflammation to purulent) and crust (appearance of crusts at the site of tissue lesion).

Fowlpox virus was confirmed in the pathological material, with characteristically scattered virions found in the smears of the affected areas. Histological examination of the material from the affected areas was carried out simultaneously with the detection of elementary bodies. At the same time, cytoplasmic inclusions, intranuclear vacuoles, epidermal hyperplasia of the skin were detected. A positive result of viroscopic examination afforded grounds for final diagnosis of fowlpox. Thus, respiratory obstruction and numerous pale eosinophilic intracytoplasmic inclusions were identified in the hyperplastic cells. The interior of lamina propria of mucosa and muscular tunic of pharynx revealed accumulation of mononuclear cells consisting mainly of macrophages, lymphocytes, plasma and mononuclear cells.

Bronchial lamina were covered by necrotic and desquamated epithelial cells, red blood cells, bacteria colonies and amorphous eosinophilic material. Accumulations of parenchyma cells and macrophages were found in the pulmonary parenchyma. Thus, histological examination of lesions in all chicken specimens showed similar pathology. Epithelial cells were swollen, round-shaped, separated from one another. The cytoplasm of hyperplastic epithelial cells contained typically substantial eosinophilic inclusions (identified as Bollinger bodies). Inclusions stretched cytoplasm of cells, resulting in their death.

Virusoscopy was considered positive, as we detected characteristic dark brown formations (Borrel elementary bodies – fowlpox virions) located in abundance throughout the yellowish smear. Viruses were large, comparable to the size of the smallest bacteria. Viruses were notable for a complex type of symmetry due to the presence of two additional structures that make up the virion. They represented the membranes, with the outer one having a greater thickness and a large number of hollow helicoidal filaments without definite ordering constituting the lipoprotein shell of the virions, which is a characteristic morphological sign of this virus. The nucleoid at the heart of the virion had a characteristic biconcave shape. The mature virion had a size of about 330 × 280 × 200 nm. The surface of the virions was covered with tubular structures with an average size of 8 nm. So, we found that the

morphology of the fowlpox virus was similar to the morphology of other viruses of the family Poxviridae. It has been proven that the inclusions of fowlpox consisted of lipids.

Our study showed that a notable increase in the number of lipidic vacuoles can be instrumental in the formation of inclusion bodies, since we observed an initial localization of the virus around the lipidic vacuoles. Further, the staining confirmed that there were empty vacuoles at the heart of the inclusion bodies. Thus, it can be concluded that the center of inclusions can contain lipidic vacuoles and lipid granules, which can be instrumental in the formation of inclusion bodies.

Changes in the material under examination, which were caused by the impact of the fowlpox virus, were mainly characterized by degeneration and proliferation of epithelial cells, as well as the formation of cytoplasmic inclusions. Hyperplastic lesions caused by the fowlpox virus were classified by abnormalities in tissues close to tumoral and inflammatory processes. We observed that the hyperplastic epithelial cells containing cytoplasmic inclusions were separated from one another. In addition, it was found that the inclusions increased in size and stretched epithelial cells, resulting in degeneration and cell death. Thus, it can be assumed that the epithelial cell changes found in our study might have been caused by viral replication in the cells.

Our study revealed that it was the epithelium of the lower respiratory tract that was significantly affected in the chickens, which was characterized not only by hyperplasia of epithelial cells in the trachea and bronchi, but also by accumulation of mononuclear cells in the underlying layers, tissue damage near the bronchi, which confirms the severe degree of course of this infection. The obtained data presumably bear witness to the multiplication of the fowlpox virus in the lungs through the lymphatic or circulatory system.

In this study, the immunohistochemical diagnosis was confirmed in 88 (100%) cases, which indicates the high performance of this method for diagnosing viral diseases in birds. Immunohistochemical study of material collected from the chickens' respiratory tracts revealed that the hyperplastic epithelial cells reacted with antibodies against the fowlpox virus. Immunoreaction occurred mainly in the cytoplasm of infected cells, in inclusions, desquamated and necrotic cells. In addition, the presence of matrix inclusions was determined using immunoperoxidase. This study showed that immunoperoxidase based diagnostics can be used in the establishing of a morphological diagnosis and detection of infection of the fowlpox virus at early stages of the disease.

The obtained results indicate the need for further research in this field, especially for the detection of pathological and immunohistochemical manifestations of this disease not only in the respiratory tract, but also in other organs and systems of chickens. Despite the fact that a multilevel study is cost-intensive and potentially time consuming, it is precisely special and comparative methods of studying viral particles using immunoperoxidase which can be used to conduct immunoreactions as part of experimental studies. Thus, this study has shown that immunohistochemical methods of research can be successfully applied in multilevel studies, which is especially important in the case of loss of egg production by birds at poultry farms.

Discussion

Despite the fact that the incidence of mortality due to fowlpox has been significantly reduced of late, this disease remains damaging for producers of meat and eggs of birds, as evidenced by data from the literature (Ali et al., 2016; Bande et al., 2016). According to researchers, members of the genus Avipoxvirus typically infect birds (Vanderplasschen, and Pastoret, 2003).

It has been reported that *Avipoxvirus* is caused by symptoms such as the appearance of pustules in the skin of birds, as well as signs of disease similar to diphtheria, which may include characteristic necrotic lesions covering the oral cavity and upper respiratory tract (Zhao et al., 2014), which may be due to the fact that, like other avian viruses, the fowlpox virus can be transmitted through vectors mechanically, for example, through mosquitoes. Other authors note that in this disease the virus affects the mucous membranes of the pharynx, larynx and, more rarely, the epithelium of the lower respiratory tract (Bande et al., 2016).

According to the findings of other scientists, lesions of the skin and respiratory tract are often found only in domesticated and wild birds infected with *Avipoxvirus* (da Silva et al., 2009). However, there are two common forms of clinical signs. The cutaneous form is considered the most common and manifests itself in the form of featherless carbuncles around the eyes and other areas of the skin of chickens, sometimes in large clusters. The diphtheritic variety of fowlpox is characterized by the presence of elevated yellowish spots on the mucous membranes of the mouth, esophagus, trachea and lungs, which can result in dyspnoea or swallowing. In both cases, birds may be weak and exhausted (Zhao et al., 2014). We have also found that the clinical signs of the disease in chickens were characterized by lethargy, mild to severe dyspnoea, conjunctival redness, excessive tearing, palpebral and paranasal sinus edema.

In addition, our studies have shown that tissue lesions are mainly characterized by typical changes in the structure of the respiratory tract of chickens. The obtained data coincide with the data of other scientists (Beytutl, and Haligür, 2007), who noted similar manifestations in chickens during a clinical research.

We have found that the following respiratory signs were observed in birds suffering from mild to moderately severe cases of the disease: pulmonary involvement in 46.5%), parabronchi in 28.2%, parabronchial connective tissue in 11.3%, as well as laryngeal and tracheal mucosa in 14.1%. In the course of disease, the following was observed in birds with mild to moderate respiratory signs: hyperemia and thickening of tracheal mucosa in 82.4%, as well as hyperemia in the nasal turbinates and paranasal sinuses in 17.7%. The literature review also showed that in most birds the disease typically occurs with mild severity and rarely leads to death, particularly in the cutaneous form of the disease (da Silva et al., 2009). However, our study showed that in 80.7% the disease was of considerable severity, with only 19.3% demonstrating an average degree of severity of the disease process. It should be noted that we studied a separate form of the disease that affects just the respiratory system of chickens.

In addition, our study showed a heavy mortality among chickens, naturally infected with fowlpox virus. The literature has such data in this regard. Thus, the mortality rate is usually high when the fowlpox virus affects the mucous membrane of the oral cavity and upper respiratory tract, or when a flock is affected by a consecutive infection or maintained in not sufficiently sound environmental conditions (Singh et al., 1987; Docherty et al., 1991; Fallavena et al., 1993; Gortázar et al., 2002; Cavanagh, 2007).

We hypothesized that the high mortality rate of birds found in this study could be caused by consecutive infection, decreased chick immunity or unusual pathogenicity of the pathogen, as the birds were kept in satisfactory environmental conditions.

There is evidence that changes due to the fowlpox virus are mainly characterized by degeneration and proliferation of epithelial cells, as well as formation of cytoplasmic inclusions (Bande et al., 2016), as observed in this study. In addition, the resulting hyperplastic lesions caused by the fowlpox virus were classified by abnormalities in tissues close to tumoral and inflammatory processes.

It is known that *Avipoxvirus* is a brick-shaped virus typically 200 nm in diameter, which is much larger than regular viruses, whose diameter is about 60 nm (da Silva et al., 2009). Our study showed that the morphology of the fowlpox virus was similar to that of other viruses of the Poxviridae family, with the elementary body having brick shape and size of about 330 × 280 × 200 nm, which concurred with the data from the literature (da Silva et al., 2009).

The factual findings furnish convincing proof that viral replication occurs in the cytoplasm of virus-infected epithelial cells, which has also been noted by various scientists (da Silva et al., 2009).

According to the findings of this research, the virion consisted of a dense centered biconcave nucleus or nucleoid with two lateral bodies in each concave and surrounded by a shell, as noted by many authors (Tripathy, 2000). In this study, it was noted that the inclusions consisted of lipids. Previous researchers also suggested that the inclusion of fowlpox viral particles might have an outer layer that can be lipid by nature of origin (da Silva et al., 2009). Our study also showed that a notable increase in the number of lipidic vacuoles can be instrumental in the formation of inclusion bodies, since we observed an initial localization of the virus around the lipidic vacuoles. In addition, staining showed that there were empty vacuoles at the heart of the inclusion bodies. Thus, it can be concluded that the center of inclusions can contain lipidic vacuoles and lipid granules, which can be instrumental in the formation of inclusion bodies. These findings were similar to previous studies (Halıgür et al., 2009).

In previous studies, viral particles were described at various stages of development during electron microscopy examination (da Silva et al., 2009). In our study, intracytoplasmic inclusions were presented, which resembled classical inclusions easily detectable with a light microscope. We observed that the hyperplastic epithelial cells containing cytoplasmic inclusions were separated from one another (Tanizaki et al., 1989). In addition, it was found that the inclusions increased in size and stretched epithelial cells, resulting in degeneration and cell death. Thus, it can be argued that the epithelial cell changes found in our study could be caused by viral multiplication in cells, which concurs with the factual findings (Reed, and Schrader, 1989; Tanizaki et al., 1989; Pringle, 1999; Smits et al., 2005; Shi et al., 2011; Susta et al., 2013; Preis et al., 2014; Ali et al., 2016).

There is evidence in the literature that reproduction of the fowlpox virus in the lungs is possible through the lymphatic or circulatory system (Singh et al., 1987). In our study, the lower respiratory epithelium was significantly affected in chickens, which was characterized by hyperplasia of epithelial cells in the trachea and bronchi, accumulation of mononuclear cells in the underlying layers, tissues lesions close to bronchi, thus proving a persistent infection.

In this study, the immunohistochemical diagnosis was confirmed in 100% cases, which indicates the high performance of this method for diagnosing viral diseases in birds. In addition, the presence of matrix inclusions was determined using immunoperoxidase. Thus, this study showed that immunoperoxidase based diagnostics can be used in the establishing of a morphological diagnosis and detection of infection of the fowlpox virus at early stages of the disease.

We concluded that although a multilevel study is cost-intensive and potentially time consuming, it is precisely special and comparative studies of viral particles using immunoperoxidase which can be used to conduct immunoreaction in experimental studies, which concurs with research data of other scientists (Halıgür et al. 2009). Thus, this study has shown that immunohistochemical research methods can be successfully applied in multilevel studies, which is especially important in case of loss of egg production in birds at poultry farms, since our study confirmed the very high sensitivity of these techniques at the early stage of diagnosing fowlpox.

Conclusion

It has been established that up to the present the issue of study of pathological changes in the respiratory tract of hens due to exposure to the fowlpox virus continues to be relevant since pathogenesis of deficiency of nutrients, presence of mycotoxins or papilloma virus is characterized by identical clinical implications. We hypothesized that the high mortality rate of chickens found in this study could be caused by consecutive infection, decreased bird immunity or unusual pathogenicity of the pathogen, as the chickens were kept in satisfactory environmental conditions. It was revealed that the tissue lesions in chickens were mainly characterized by the presence of changes in the typical structure of the respiratory tract and skin. Clear criteria were clarified for the pathological process in the respiratory tract of chickens, which are specific for this type of fowlpox. It was found that the morphology of the fowlpox virus was similar to that of other viruses of the family Poxviridae. It is assumed that the epithelial cell changes found in our study might have been caused by viral replication in the cells. It was established that it is the epithelium of the lower respiratory tract that was significantly affected in the chickens, which was characterized not only by hyperplasia of epithelial cells in the trachea and bronchi, but also by accumulation of mononuclear cells in the underlying layers, tissue damage near the bronchi, which confirms the severe degree of course of this infection. The obtained data presumably bear witness to the multiplication of the fowlpox virus in the lungs through the lymphatic or circulatory system. It is proved that a noticeable increase in the number of lipidic vacuoles can be instrumental in the formation of inclusion bodies.

Immunohistochemical diagnosis was confirmed in 100% of cases, which indicates the high performance of this method for diagnosing viral diseases in birds, which can also be used in the future as the most common and quickest way of diagnosing the fowlpox virus. It has been shown that immunohistochemical methods of research can be successfully applied in multilevel studies, which is especially important in the case of loss of egg production by birds at poultry farms. In the future, more in-depth studies should be conducted to identify pathological and immunohistochemical manifestations of this disease not only in the respiratory tract, but also in other organs and systems of chickens.

References

Ali, A. M. A., Mansour, S. M., Fathy, A. M., & Eid, A. A. (2014). Detection of avian poxvirus in an egyptian goose (*Alopochen aegyptiacus*). Global Animal Science Journal, 1(3), 64–68.

Bande, F., Arshad, S. S., Omar, A. R., Bejo, M. H., Abubakar, M. S., & Abba, Y. (2016). Pathogenesis and diagnostic approaches of avian infectious bronchitis. Advances in Virology, 2016, article ID 4621659.

Cavanagh, D. (2007). Coronavirus avian infectious bronchitis virus. Veterinary Research, 38(2), 281–297.

Da Silva, P. S., Batinga, T. D. B., Sales, T. S., Herval, E. F. G., Ramos, I., Maia, P. C. C., & Fernandes, L. M. B. (2009). Fowlpox: Identification and adoption of prophylactic measures in backyard chickens in Bahia, Brazil. Revista Brasileira de Ciência Avícola, 11(2), 115–119.

Docherty, D. E., Long, R. I., Flickinger, E. L., & Locke, L. N. (1991). Isolation of poxvirus from debilitating cutaneous lesions on four immature grackles (*Quiscalus sp.*). Avian Diseases, 35(1), 244–247.

Fallavena, L. C. B., Rodrigues, N. C., Scheufler, W., Martins, N. R. S., Braga, A. C., Salle, C. T. P., & Moraes, H. L. S. (1993). Atypical fowlpox in broiler chickens in southern Brazil. Veterinary Record, 132(25), 635.

Fauquet, C. M., Mayo, M. A., Maniloff, J., Desselberger, U., & Ball, L. A. (2005). Virus taxonomy: VIIIth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press.

Weli, S. C., & Tryland, M. (2011). Avipoxviruses: Infection biology and their use as vaccine vectors. Virology Journal, 8, 49.

Gortázar, C., Millán, J., Höfle, U., Buenestado, F. J., Villafuerte, R., & Kaleta, E. F. (2002). Pathology of avian pox in wild red-legged partridges (*Alectoris rufa*) in Spain. Annals of the New York Academy of Sciences, 969(1), 354–357.

Halıgür, M., Özmen, Ö., Vural, S. A., & Berkin, Ş. (2009). Pathological, immunohistochemical and electron microscopical examinations on chorioallantoic membrane lesions in experimental fowl Poxvirus infection. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 15(3), 345–350.

Hitchner, S. B. (2004). History of biological control of poultry diseases in the USA. Avian Diseases, 48(1), 1–8.

Hsu, S. M., Raine, L., & Fanger, H. X. (1981). Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 29(4), 577–580.

Medina, F. M., Ramírez, G. A., & Hernández, A. (2004). Avian pox in white-tailed laurel-pigeons from the Canary Islands. Journal of Wildlife Diseases, 40(2), 351–355.

Michener, H., & Michener, J. R. (1936). Abnormalities in Birds. Condor, 38(3), 102–109.

Nuttall, P. A., Brooke, M. D. L., & Perrins, C. M. (1985). Poxvirus infection of the manx shearwater (*Puffinus puffinus*). Journal of Wildlife Diseases, 21(2), 120–124.

Preis, I. S., Fiúza, A. T. L., Silva, C. C., Braga, J. F. V., Couto, R. M., Martins, N. D. S., & Ecco, R. (2014). Pathological, immunohistochemical, and molecular findings in commercial laying hens and in backyard chickens naturally infected with the infectious laryngotracheitis virus. Revista Brasileira de Ciência Avícola, 16(4), 359–366.

Pringle, C. R. (1999). Virus taxonomy – 1999. Archives of Virology, 144(2), 421–429.

Reed, W. M., & Schrader, D. L. (1989). Pathogenicity and immunogenicity of mynah pox virus in chickens and bobwhite quail. Poultry Science, 68(5), 631–638.

Shi, X. M., Zhao, Y., Gao, H. B., Jing, Z., Wang, M., Cui, H. Y., & Wang, Y. F. (2011). Evaluation of recombinant fowlpox virus expressing infectious bronchitis virus S1 gene and chicken interferon-γ gene for immune protection against heterologous strains. Vaccine, 29(8), 1576–1582.

Smits, J. E., Tella, J. L., Carrete, M., Serrano, D., & López, G. (2005). An epizootic of avian pox in endemic short-toed larks (*Calandrella rufescens*) and berthelot's pipits (*Anthus berthelotti*) in the Canary Islands, Spain. Veterinary Pathology Online, 42(1), 59–65.

Suarez, D. L., & Schultz-Cherry, S. (2000). Immunology of avian influenza virus: A review. Developmental and Comparative Immunology, 24(2), 269–283.

Susta, L., Cornax, I., Diel, D. G., Garcia, S. C., Miller, P. J., Liu, X., & Afonso, C. L. (2013). Expression of interferon gamma by a highly virulent strain of Newcastle disease virus decreases its pathogenicity in chickens. Microbial Pathogenesis, 61, 73–83.

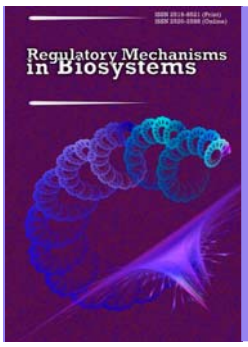
Tanizaki, E., Kotani, T., Odagiri, Y., & Horiuchi, T. (1989). Pathologic changes in chickens caused by intravenous inoculation with fowlpox virus. Avian Diseases, 33(2), 333–339.

Tripathy, D. N., Schnitzlein, W. M., Morris, P. J., Janssen, D. L., Zuba, J. K., Massey, G., & Atkinson, C. T. (2000). Characterization of poxviruses from forest birds in Hawaii. Journal of Wildlife Diseases, 36(2), 225–230.

Weinstein, L., & Meade, R. H. (1956). Respiratory manifestations of chicken pox: Special consideration of the features of primary varicella pneumonia. AMA Archives of Internal Medicine, 98(1), 91–99.

Winterfield, R. W., & Reed, W. (1985). Avian pox: Infection and immunity with quail, psittacine, fowl, and pigeon pox viruses. Poultry Science, 64(1), 65–70.

Zhao, K., He, W., Xie, S., Song, D., Lu, H., Pan, W., & Gao, F. (2014). Highly pathogenic fowlpox virus in cutaneously infected chickens, China. Emerging Infectious Diseases, 20(7), 1200.



Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(2), 277–282
doi: 10.15421/021743

Optimization of postoperative analgesia after adenoidectomy in children

M. A. Georgiyants*, M. B. Pushkar*, O. V. Vysotska**, A. P. Porvan**

**Kharkiv Medical Academy of Postgraduate Education, Kharkiv, Ukraine*
***Kharkiv National University of Radio Electronics, Kharkiv, Ukraine*

Article info

Received 24.03.2017
Received in revised form 20.04.2017
Accepted 23.04.2017

Kharkiv Medical Academy of Postgraduate Education, Department of Pediatric Anesthesiology and Intensive Therapy, Kultury Str., 11/83, Kharkiv, 61058, Ukraine
Tel. +38-066-523-32-13
E-mail: eniram@bigmir.net

Georgiyants, M. A., Pushkar, M. B., Vysotska, O. V., & Porvan, A. P. (2017). Optimization of postoperative analgesia after adenoidectomy in children. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(2), 277–282. doi:10.15421/021743

It is known that pharyngalgia is very common after tonsillectomy. It should be emphasized that the intensity of pain after adenoidectomy in children is not less important than after adenotonsillectomy. Despite the availability of standardized pain assessment scales and existing postoperative analgesia recommendations, unresolved postoperative pain still occurs in children. The research included 117 children with an average age of 7.5 ± 0.4 years, who underwent adenoidectomy at the Department of Anesthesiology and Intensive Care of "Regional Children's Clinical Hospital" of Kharkov city in 2014. Depending on the method of general anesthesia, patients were divided into 3 groups: group I (n = 41) those who received propofol in combination with fentanyl; group II (n = 40) those who received sevoflurane in combination with fentanyl; group III (n = 36) those who received thiopental sodium combined with fentanyl. We monitored the heart rate, systolic blood pressure, diastolic blood pressure, mean arterial pressure, BIS-index, heart rate variability, respiration rate, and SpO_2. We determined the levels of cortisol and insulin in the blood serum, glucose level, the ratio of cortisol/insulin was calculated. Assessment of the efficiency of postoperative analgesia was performed using the Wong-Baker FACES Pain Scale («Faces») and the Oucher Scale. The result of analysis of the intensity of postoperative pain determined that at the 1st hour after the operation by the «Faces» and Oucher scales, it was significantly higher in patients of group II compared with the patients of group I and group III. The morning after the operation there was no significant difference in the pain scales, and the number of scale points showed that children from all groups did not have pain. According to the data of ANOVA it was determined that only the patients in group I with indicator ΔBIS-index «intubation – traumatic moment of operation» experienced postoperative pain intensity on the «Faces» scale. A very strong correlation between «cortisol – BIS index» was observed during the traumatic moment of operation and unidirectional positive correlations were seen both between ΔBIS-index «intubation-the traumatic moment of operation» and between the level of cortisolemia (Δcortisol before surgery – the traumatic moment of operation, Δcortisol extubation – the 1st day after the surgery and Δcortisol before surgery – the 1st day after the surgery) and the intensity of postoperative pain by the «Faces» and Oucher scales. The around-the-clock prescribed administration of ibuprofen at dose 10 mg/kg after adenoidectomy provided effective postoperative analgesia. At the 1st hour after the operation lower pain intensity was revealed in patients using propofol in combination with fentanyl by both pain scales. We believe that propofol is able to influence the level of cortisol and assume that due to minimal changes in the level of cortisol during the perioperative period, propofol can reduce the intensity of postoperative pain.

Keywords: removal of the adenoid vegetations, children, intravenous anaesthesia, inhalation anaesthesia, postoperative pain

Introduction

It is known that the greater the severity of surgical stress, the higher incidence of complications in the perioperative period. The most important aggressive factors of surgical stress are: psycho-emotional aggression, pain, blood loss, nonpainful reflexes and damage to vital organs. In each case, the severity of the stress factors is quite different and depends on many factors. The leading factors are the initial state of vital body systems, traumatism of surgical intervention and the effectiveness of the techniques that the anaesthesiologist provides to protect the patient from nociceptive effects of surgical stress.

Speaking about surgical stress, it should be remembered that the basis of perioperative stress response is the reaction of the hypothalamic-pituitary-adrenal system, which causes hyperglycemia, an excessive production of adrenocorticotropic hormone (ACTH), cortisol, somatotropin, catecholamines, angiotensin II, glucagon, lactate formation and reduces the secretion of insulin, testosterone and activation of the sympathetic nervous system (Palmieri et al., 2006). Despite the fact that at the present time there is no direct method for measuring the stress level during general anesthesia, one of the most common criteria for evaluating stress is the level of stress hormones with hemodynamic parameters, which characterize the effectiveness of a patient's protection from surgical stress during surgery (Paola et al., 2015).

Today some of the most widely studied parameters in evaluating surgical stress in children and adults are cortisol and glucose (Wolf, 2012; Yang et al., 2013; Sekhon et al., 2013; Naguib et al., 2013; Gupta et al., 2013; Chen et al., 2013; Wang et al., 2014; Das et al., 2015). However, some of the existing attempts to evaluate stress reactions by studying the level of cortisol during diagnostic procedures and invasive urological interventions in children under general anesthesia have shown mixed results (Hsu et al., 2012; Taylor et al., 2013).

Thus, the main purpose of anesthesia is to protect the child from surgical stress. Stress has special significance in children with imperfections in their central and peripheral systems of neurohumoral regulation, which leads to low adaptability in such children's

organism. That is why one of the main problems in ear, nose and throat (ENT)-surgery is to optimize the maintenance of perioperative analgesia (Strauss, 2012). However, recently the bulk of research on surgical stress in a variety of types of surgery (depending on the duration and extent of trauma) has been conducted on adult patients under different methods of general anesthesia compared to the pediatric patients. In addition, until now in the literature there has been a lack of data about the effectiveness of protecting children from surgical stress during "minimally invasive" operations, for example during adenoidectomy in children.

One of the most important factors which determine the postoperative period is pain in various degrees of severity (Tsekhmister et al., 2016). Acute pain is the most common adverse factor which affects children as a result of surgery, illness, injury or any necessary medical treatment. Adenotonsillectomy is associated with severe pain, which sometimes lasts until the seventh postoperative day (Uysal et al., 2011). However, in the literature, we have found only a few works about the intensity of postoperative pain after adenoidectomy in children.

This opinion is shared in the survey conducted by Russell et al. (2013), who noted that at present there is still a paucity of data which shows how painful the most common surgical procedures in children can be. Previous work has indicated that more than 80% of children need to receive analgesics after ambulatory adenoidectomy and discharge from the hospital (Kokki and Ahonen, 1997). Korpela et al. (2007) compared the efficacy of naproxen and acetaminophen with or without pethidine during adenoidectomy in children. They found that 83% of children of the naproxen group and 97% of the acetaminophen group who had not been given pethidine during surgery required the administration of additional analgesics in the ward (fentanyl 1 μg/kg). Thus, the usage of pethidine reduced the need for additional analgesia in the postoperative period (Korpela et al., 2007). Therefore, the abovementioned work indicates that the intensity of pain in children after adenoidectomy is not less important than after adenotonsillectomy.

According to the results of a study conducted by Schnelle et al. (2013), which evaluated the intensity of postoperative pain in 134 children in the first 24 hours after ENT-operations using the German-wide project Quality Improvement in Postoperative Pain Management in Infants (QUIPSI) questionnaire, it was determined that the maximum intensity of pain in children is significant within the first 24 hours, and most children require additional analgesics. From the total number of surveyed patients, the majority of patients had undergone adenoidectomy (60%) and combined with tonsillectomy (16%). The authors concluded that the strategy of treating pain in children is not sufficient (Schnelle et al., 2013).

Vons et al. (2014) also evaluated the prevalence and severity of postoperative pain in 167 children, who underwent adenoidectomy (78 patients) and adenotonsillectomy (89 patients) in outpatient settings. The percentage of patients with significant pain, who were already at home on the 1st day after the surgery, according to the Parent's Postoperative Pain Measure Scale (over 6 points) and the visual analogue scale (over 4 points), was 25% and 35% respectively of the total number of patients who had undergone adenoidectomy (Vons et al., 2014). Probably, this may be due to the insufficient dose of non-narcotic analgesics in the postoperative period.

Based on the foregoing we believe that, despite the existing methods of general anesthesia which are designed to protect children from surgical stress, not enough attention has been devoted to the quality of antistress protection during «minimal» traumatic surgery and providing effective postoperative analgesia following ENT-operations in children. The aim of this research is to improve the experience of children during the postoperative period after adenoidectomy by reducing the intensity of postoperative pain.

Materials and methods

The research was conducted at the Department of Anesthesiology and Intensive Care "Regional Children's Clinical Hospital" (Kharkiv, Ukraine) during 2014. It included 117 children with an average age of 7.5 ± 0.4 years, who underwent adenoidectomy and responded to ASA I-II. The average duration of surgery was 7.3 ± 0.3 min. All patients were divided into three groups depending on the method of general anesthesia.

Patients in group I (n = 41) underwent anesthesia using 1% solution of propofol (2.5 ± 0.03 mg/kg), maintenance performed by bolus administration of propofol (1 mg/kg) for an average of 2.5–3.0 minutes after previous administration.

Patients in group II (n = 40) underwent anesthesia using a sevoflurane-oxygen mixture given by the "bolus" method without filling the breathing circuit of 8 % sevoflurane with oxygen flow 4 l/min. Upon reaching the clinical- surgical stage of anesthesia, maintenance of anesthesia was performed at feed 2.0–2.5% sevoflurane in fresh gas flow of 2 l/min.

Patients in group III (n = 36) underwent anesthesia using a 1% solution of thiopental sodium (5–6 mg/kg). Given the short duration of the intervention, there was no need for repeated administration of anesthetic to maintain the anesthesia.

In all groups, muscle relaxation was ensured by administering a 2% solution of suxametonium iodide at a dose (2 mg/kg). As needed, further bolus administration of suxametonium iodide was performed at average dose (1 mg/kg). Intraoperative analgesia was carried out by 0.005% solution of fentanyl at a dose (2 mg/kg).

In order to prevent nausea and vomiting in patients of all groups, ondansetron was administered (0.1 mg/kg) intraoperatively. Postoperative analgesia in all groups was performed by around-the-clock prescribed ibuprofen at a dose (10 mg/kg).

Perioperative non-invasive monitoring of the heart rate, ECG, systolic, diastolic and mean arterial pressure (MAP), heart rate variability (HRV), respiration rate, blood oxygen saturation index (SpO2) was carried out by the UM-300 monitor (Utas, Ukraine) at the following stages: 1st is before surgery; 2nd is induction of anesthesia; 3rd is tracheal intubation; 4th is traumatic moment of operation; 5th is extubation; 6th is 1st hour after the surgery; 7th is 6th hour after the surgery; 8th is 1st postoperative day.

The HRV parameters were examined at all stages, except for the 3rd stage (tracheal intubation). BIS-index was investigated by the UM-300 monitor (Utas, Ukraine) and BIS Vista (Aspect Medical Systems, USA). The data at the 1st, 3rd, 4th and 5th stages were evaluated. Doses were titrated to maintain BIS-index in the range of 40–60%.

The level of cortisol (C) in serum was determined by ELISA using a set of reagents of production (XEMA-MEDICA, Russia). Insulin levels (I) were determined by a set of reagents of production (DRG, Germany). Glucose was determined by the glucose oxidase method using a set of reagents of production (Filisit-Diagnostics, Ukraine). They were evaluated in the following stages: 1st, 4th, 5th and 8th.

Evaluating the effectiveness of pain relief in the early postoperative period was performed by using the Wong-Baker FACES Pain Scale «Faces» and the Oucher scale at the following stages: at the 1st, 6th, 8th hour and on the 1st day after the operation.

Statistical analysis of the data was performed using SPSS 19 for Windows. Results of descriptive statistics are presented as Mean ± SE (mean ± standard error of mean). Check for normal distribution was carried out by the Kolmogorov-Smirnov criterion. We used t-Student test to compare quantitative indicators and determine the differences between them for dependent and independent samples with Bonferroni correction. Correlation analysis was carried out using the criterion of Pearson (r). An ANOVA was carried out with the calculation of Fisher's F-test in order to assess the effect of the studied factors on the pain intensity.

Results

Patients of all groups were matched by sex, age, anthropometric data and the duration of surgery. Hemodynamic parameters in

patients of all groups did not differ and were stable during surgery. BIS-index had the same tendency to change in patients of all groups (40% < BIS-index < 60%), but in the stages of study some differences were found between patients of groups I and III and patients of groups II and III (P = 0.002 and P = 0.014, respectively), which were not clinically significant (Table 1).

Table 1
The changes of the hypnotic component of general anaesthesia (BIS-index) in patients of all groups in the perioperative period (Mean ± SE)

Groups	Stages of study			
	1st	3rd	4th	5th
group I, n = 41	95.8 ± 0.5**	52.2 ± 1.7	51.5 ± 1.6*	76.5 ± 0.9
group II, n = 40	96.6 ± 0.3*	42.1 ± 1.1$^{***;\#\#\#}$	46.4 ± 2.6***	78.5 ± 0.6
group III, n = 36	97.5 ± 0.2	54.8 ± 1.0	56.0 ± 1.2	78.3 ± 0.6

Note: significant difference between the groups at appropriate stages: ### – P < 0.001 compared with group 1; * – P < 0.05 compared with group 3, ** – P < 0.01 compared with group 3, *** – P < 0.001 compared with group 3.

In assessing the effectiveness of the antistress protection of children during surgery we found that the largest fluctuations were inherent in the level of cortisol among stress markers. During the traumatic moment of operation in the patients of group I and during all stages of the study, the level of cortisol did not exceed the limits of the reference values. However, the patients of groups II and III had a more significant tendency to increase its level. But it should be noted, that there was no significant difference between the groups at this stage (P > 0.05) (Table 2–5).

Table 2
Comparative dynamics of cortisol (nmol/l) in the studied groups throughout different research stages (Mean ± SE)

Stages of study	Groups			Reference values
	group 1, n = 21	group 2, n = 19	group 3, n = 20	
1st	260.0 ± 24.4	322.0 ± 88.3	308.1 ± 44.5	370 ± 230
4th	333.3 ± 37.2	830.0 ± 322.3	506.3 ± 218.2	
5th	413.3 ± 44.3$^{\#\#}$	606.7 ± 48.1$^{***;\#\#\#}$	322.5 ± 62.4	
8th	310.0 ± 75.3	304.0 ± 61.4	207.6 ± 38.1	

Note: significant difference between cortisol values at different stages: *** – P < 0.001 compared with 8th stage; significant difference between the groups: $^{\#\#}$ – P < 0.01 compared with group 2, $^{\#\#\#}$ – P < 0.001 compared with group 3.

Table 3
Comparative dynamics of insulin (μunit/ml) in the studied groups throughout different research stages (Mean ± SE)

Stages of study	Groups			Reference values
	group 1, n = 21	group 2, n = 19	group 3, n = 20	
1 th	11.8 ± 1.0 $^{\#\#\#}$	7.2 ± 0.6	12.0 ± 1.9	13.5 ± 11.5
4 th	14.7 ± 2.3	12.9 ± 6.4	15.0 ± 2.0	
5 th	12.5 ± 1.9	12.9 ± 1.9	14.3 ± 2.2	
8 th	10.0 ± 2.1	16.5 ± 1.9$^{***;\#\#}$	11.2 ± 0.6	

Note: significant difference between insulin values at different stages: *** – P < 0.001 compared with 1st stage; significant difference between the groups: $^{\#\#}$ – P < 0.01 compared with group 3, $^{\#\#\#}$ – P < 0.001 compared with group 2.

Table 4
Comparative dynamics of ratio cortisol / insulin (C/I) in the studied groups throughout different research stages (Mean ± SE)

Stages of study	Groups			Reference values
	group 1, n = 21	group 2, n = 19	group 3, n = 20	
1 st	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1**	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1
4 th	1.2 ± 0.2	2.3 ± 0.6	1.1 ± 0.3	
5 th	1.2 ± 0.4	2.0 ± 0.5**	1.4 ± 0.5	
8 th	1.1 ± 0.2	0.5 ± 0.1$^{\#\#}$	0.8 ± 0.3	

Note: significant difference between C/I values at different stages: ** – P < 0.01 compared with 8th stage; significant difference between the groups: $^{\#\#}$ – P < 0.01 compared with group 1.

At all stages of the study, the level of insulin did not exceed the limits of reference values in the patients of all groups. Among all studied groups only in the patients of group II was there a tendency to increase the ratio of C/I up to 2.3 ± 0.6 at the stage of the traumatic moment of operation, which indicates the intensity of adaptation abilities of patients in this group. The level of glycemia in patients of all groups did not exceed the limits of reference values (4.4 ± 1.1 mmol/l) during all stages of the study.

Based on this, a correlation analysis was made between stress markers, hemodynamic parameters and the BIS-index.

Table 5
Comparative dynamics of glucose (mmol/l) in the studied groups throughout different research stages (Mean ± SE)

Stages of study	Groups			Reference values
	group 1, n = 21	group 2, n = 19	group 3, n = 20	
1 st	3.5 ± 0.1	3.3 ± 0.5	3.7 ± 0.2	4.4 ± 1.1
4 th	3.9 ± 0.2**	3.4 ± 0.4	3.6 ± 0.2	
5 th	4.5 ± 0.1	4.6 ± 0.4	4.2 ± 0.3	
8 th	3.8 ± 0.3	3.9 ± 0.3	4.3 ± 0.1^{++}	

Note: significant difference between glucose values at different stages: $^{++}$ – P < 0.01 compared with 1st stage, ** – P < 0.01 compared with 5th stage.

In the patients of group I at the stage of the traumatic moment of operation we noted strong negative "insulin – heart rate" (r = –0.81; P = 0.05); strong positive "C/I – heart rate" (r = 0.81; P = 0.05) and a very strong positive "cortisol – BIS-index" (r = 0.97; P = 0.001) correlations. On the 1st postoperative day we noted a strong connection "cortisol – heart rate" (r = 0.83, P = 0,041).

In the patients of group II within all stages of the study at the stage of extubation we established only one strong positive correlation "glucose – BIS index" (r = 0.75, P = 0.011).

In the patients of group III at the preoperative stage we noted moderate positive connection "glucose – MAP" (r = 0.44, P = 0.048). At the traumatic moment of operation strong correlation links were recorded: "glucose – BIS-index" (r = 0.72, P = 0.004) and "insulin – BIS-index" (r = -0.85; P = 0.031). On the 1st postoperative day there was a noticeable positive correlation "glucose – heart rate" (r = 0.51, P = 0.02).

When examining the pain intensity using the "Faces" scale in the early postoperative period there was more pronounced pain in the patients of group II (1.4 ± 0.2 points) in comparison with the patients of the group I (0.8 ± 0.1 points) and group III (0.8 ± 0.1 points) (P = 0.013 and P = 0.014, respectively) (Fig. 1).

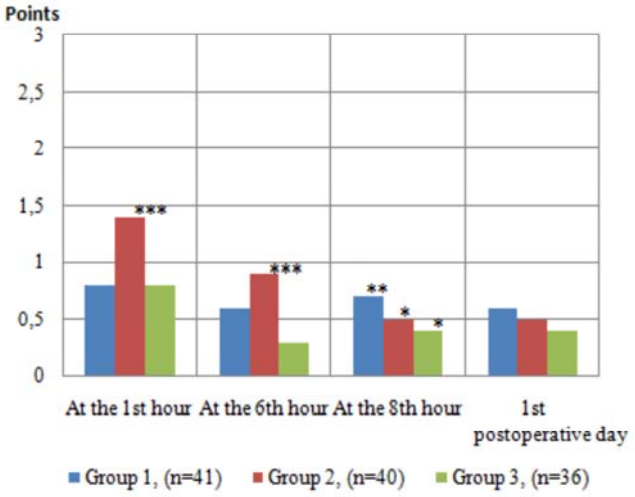


Fig. 1. Dynamics of "Faces" scale indicators in the postoperative period in patients of all groups

By the Oucher scale a similar pattern was traced, but at the same time apart from the above differences we detected the difference between the patients of groups I and III (P = 0.011) (Fig. 2).

At the 6th hour after the operation the intensity of postoperative pain on the "Faces" scale was significantly lower in the patients of group III (0.3 ± 0.1 points) compared with the patients of group I (0.6 ± 0.1 points) and group II (0.9 ± 0.2 points) (P = 0.013 and P =

0.001, respectively) and by the Oucher scale – the same in the patients of group III (0,3 ± 0,1 points) compared only with the patients of group II (0.6 ± 0.1 points) (P = 0.014).

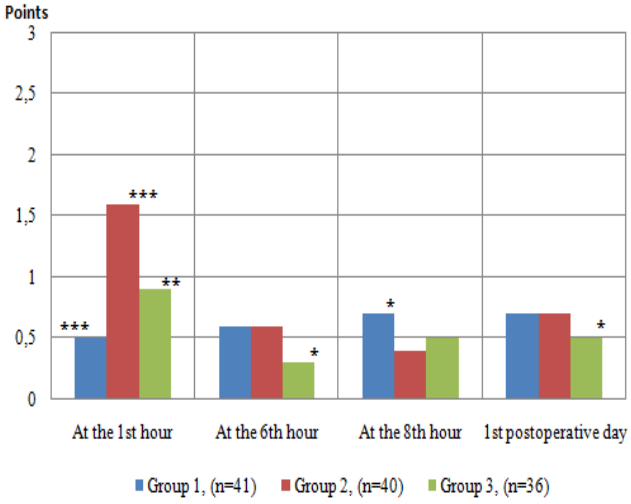


Fig. 2. Dynamics of Oucher scale indicators in the postoperative period in patients of all groups

In the dynamics of observation in the patients of all groups a tendency was noted to increase of pain intensity in the postoperative period, but only in the patients of group I did we not observe significant differences of the pain intensity between the stages of the study (P > 0.05). The next morning after the operation the number of scale points showed that postoperative pain did not trouble children of all groups (P > 0.05).

Given the very strong positive correlation "cortisol – BIS-index" (r = 0.97, P = 0.001) in the patients of group I at the stage of the traumatic moment of the operation, we carried out a more detailed analysis of the relationships between the level of stress markers, hemodynamic parameters, BIS-index and the differences of these parameters between the stages of the study, which have been marked (Δ). We noted, that patients for whom the value of ΔBIS-index "intubation – traumatic moment of operation" (ΔBIS) was negative did not experience postoperative pain according to the "Faces" and Oucher scales starting from the 6th hour after the operation until the 1st postoperative day inclusive.

Following the analysis of variance, it was found that only in the patients of group I did ΔBIS affect the intensity of postoperative pain according to the "Faces" scale at the following stages: at the 6th hour after the operation (F = 4.278; P = 0.039), at the 8th hour after the operation (F = 4.583, P = 0.032) and on the 1st postoperative day (F = 4.583, P = 0.032). Patients of groups II and III felt no effect of ΔBIS on the intensity of postoperative pain during all stages of the study (P > 0.05). In addition, it should be noted that the value of ΔBIS in the patients of groups II and III (4.54 ± 1.45% and 3.76 ± 0.66%, respectively) was significantly higher in comparison with the patients of group I (–0.73 ± 1.03%) (P = 0.007 and P = 0.002, respectively).

The results of studying the effect of the level of stress markers in the perioperative period on the intensity of postoperative pain in the patients of all groups showed: first, only changes in the level of cortisol influenced the intensity of postoperative pain according to pain scales; secondly, it was registered only in the patients of group I.

In particular, the value of Δcortisol at the stage "before surgery – the traumatic moment of operation" affected the pain intensity: on the "Faces" scale on the 1st day after the operation (F = 4.321; P = 0.038), according to the Oucher scale at the 6th hour after the operation and on the 1st day after the operation (F = 3.900; P = 0.048 and F = 5.417; P = 0.020, respectively). Also it was found that Δcortisol at the stage "extubation – the 1st day after the surgery" affected the pain intensity on the "Faces" scale at the 1st hour after the operation (F = 4.792; P = 0.029) and on the Oucher scale at the 1st hour after the operation (F = 4.309; P = 0.038); the value of Δcortisol at the stage "before surgery – the 1st day after the surgery" affected the pain at the 1st hour after the operation according to the "Faces" scale (F = 4.684; P = 0.030). Regarding the patients of groups II and III, we did not register the influence of Δcortisol on the intensity of postoperative pain during any of the stages of the study (before surgery – the traumatic moment of operation; the traumatic moment of operation – extubation; extubation – the 1st day after the surgery) (P > 0.05).

However attention should be drawn to the following: in the patients of group II, the value of Δcortisol "before surgery – the traumatic moment of operation" was significantly higher (582.5 ± 203.7 nmol/l) compared with the patients of group I (46.0 ± 12.6 nmol/l) (P = 0.010) and group III (122.7 ± 144.8 nmol/l) (P = 0.013), which is likely to contribute to the development of more severe postoperative pain in the patients of group II. Moreover, the intensity of postoperative pain in the patients operated on under general anesthesia using sevoflurane in combination with fentanyl, was higher compared with the patients of groups I and III according to the pain scales.

Based on the results of the correlation analysis it was established that a noticeable positive correlation was marked: between the ΔBIS-index "intubation – the traumatic moment of operation" and the "Faces" scale at the 6th hour after the operation (r = 0.65, P = 0.029); between the ΔBIS-index "intubation – the traumatic moment of operation" and the "Faces" scale at the 8th hour after the operation (r = 0.67; P = 0.022) and between the ΔBIS-index "intubation – traumatic moment of operation" and the "Faces" scale on the 1st day after the operation (r = 0.70, P = 0.019).

In the study of the correlation between Δcortisol and pain intensity by pain scales, significant positive correlation was observed on the 1st day after the operation in the patients of group I: Δcortisol (before surgery - the traumatic moment of operation) – the "Faces" scale (r = 0.58; P = 0.031); Δcortisol (before surgery – the traumatic moment of the operation) – the Oucher Scale (r = 0.64; P = 0.013). Also, noticeable positive correlation relationships were found at the 1st hour after the operation: Δcortisol (extubation – the 1st day after surgery) the "Faces" scale (r = 0.57, P = 0.031), Δcortisol (extubation – the 1st day after surgery) the Oucher scale (r = 0.52, P = 0.04). In addition, at the 1st hour after the operation we found a noticeable positive correlation between Δcortisol (before surgery – the 1st day after the operation) – pain on the "Faces" scale (r = 0.58, P = 0.031).

Discussion

The evaluation of the efficiency of antistress protection during adenoidectomy in children found that the most sensitive indicator of surgical stress among all studied stress markers was the level of cortisol. In summary, during all stages of the research, the cortisol level did not differ between the groups. However, at first, only in the patients of group I its level did not go beyond reference values for all stages of the research and secondly, in the patients of groups II and III a significant upward trend in cortisol was noted during the traumatic moment of operation, but there were no significant differences between groups at this stage (P > 0.05).

First of all, it is necessary to note that cortisol secretion is increased as a result of stimulation of the adrenal cortex by means of ACTH. An increase in the concentration of ACTH and cortisol in plasma can be detected almost immediately after the onset of surgery and their increase is related to the intensity of the surgical stimulus (Paola et al., 2015). But despite this, there are current studies which show that propofol can reduce the secretion of cortisol by inhibiting γ-aminobutyric acid and glutamate receptors (Sakai et al., 1995; Kelbel and Weiss, 2001).

Apparently, that is why the results obtained on the effectiveness of the antistress protection of general anesthesia with the use of propofol and sevoflurane are confirmed in some existing works. Chen et al. (2013) in his study determined which of the methods of

general anesthesia has more advantages during fibrobronchoscopy in children. According to the study, they found that anesthesia with propofol in combination with remifentanil has more advantages in comparison with sevoflurane, one of which is a significantly lower stress hormone level during surgery.

In another study (Yusupov et al., 2015), based on analysis of 64 patients who underwent surgery for the correction of congenital malformations also came to the conclusion that general anesthesia with propofol and analgesia nalbuphine provides sufficient protection of children from surgical stress without signs of activation of hormonal regulation. It should also be noted that the present works which investigate the level of stress markers in adult patients when intravenous and inhalation anesthesia are compared also demonstrate the advantages of propofol in combination with remifentanil in relation to sevoflurane (Ihn et al., 2009; Marana et al., 2010).

By the way, if we recall the depth of the hypnotic component of general anesthesia, we also found work in the current literature that discusses of the depth of the hypnotic component caused by propofol on surgical stress. Yang et al. (2013) compared the effect of varying depths of the hypnotic component of anesthesia using propofol in combination with remifentanil on perioperative changes in hemodynamics and stress hormones during adenotonsillectomy in children. According to the results of the study, they concluded that a deeper level of sleep (BIS-index – 25–35%) can more effectively inhibit perioperative cortisol reaction.

Jung and Cho (2015) compared the reaction of stress markers (norepinephrine and glucose) at different depths of sleep in patients operated on for the lung resection. The authors also concluded that a deeper level of anesthesia, which is achieved by the high rate infusion of propofol during surgery, provides a low perioperative response of the above indices.

During the course of our research, we did not study the effect of the depth of the hypnotic component of anesthesia on surgical stress. However, the data obtained from the level of stress markers confirm the fact that despite a shallow level of sleep (BIS-index – 51.9 ± 1.9%) in patients of the group I, compared to previous studies (BIS-index – 25–35%), they were sufficiently protected from the effects of surgical stress. The revealed strong positive correlation "cortisol – BIS-index" ($r = 0.97$, $P = 0.001$) in the patients of this group, in our opinion, is the evidence of the influence of the depth of sleep, caused by propofol, on the level of cortisol, and hence the severity of surgical stress.

Regarding the patients of groups II and III and the tendency to increase in cortisol level at the stage of the traumatic moment of operation, in view of the lack of understanding of the current range of increase in the cortisol level in response to various types of stress, including surgical, we believe that this fact requires further studies.

Returning to postoperative analgesia, despite the availability of standardized pain assessment scores and existing reviews and recommendations on the efficiency of analgesics, postoperative pain is still found in children (Messerer et al., 2010; Pierce and Voss, 2010; Russell et al., 2013; Schultz-Machata et al., 2014; Misiołek et al., 2014).

The analysis of postoperative analgesia in the work Schnelle et al. (2013) pointed out that only about 32% of the total number of children received ibuprofen in an average dose 8.39 ± 1.62 mg/kg, while 38% did not receive non-narcotic analgesics in the postoperative period. Maximum pain intensity over the first 24 hours in children was significant, prompting the authors to conclude that a higher percentage of children need more analgesics. The obtained results can be interpreted in different ways, as they can also be the consequence of the administration of analgesics according to the child's specific needs, but not according to their planned use. Therefore, we assume that a child's refusal to accept analgesia cannot for certain be considered as an indicator of adequate analgesia (or absence of pain), because there may also exist the factor of the neglect of postoperative analgesia by the child or its parents. During our study, around-the-clock prescribed administration of ibuprofen to all patients at the maximum single dose of 10 mg/kg, in our opinion, provided more effective postoperative analgesia in comparison with the above results, which was demonstrated by using the pain scales.

Frederick et al. (2011) in their work examined 40 children aged 2–8 years and studied the effect of controlled sleep depth under anesthesia using sevoflurane on the emergence delirium by distributing patients into two groups: a "low normal" range (40–45%) and a "high normal" range (55–60%) by means of the BIS index during ophthalmic operations. They found, that in the patients of the group (BIS-index – 40–45%) the score on the behavioral pain scale FLACC was significantly higher – 7 points compared with the other group (BIS-index – 55–60%) – 3.5 points ($P = 0.03$), despite the same amount of intraoperatively administered fentanyl in both groups (Frederick et al., 2011). During our study, we also recorded similar data, in particular, in children who were operated on under general anesthesia using sevoflurane, the BIS-index at the tracheal intubation stage was significantly lower (42.1 ± 1.1%) compared with children who were operated on under intravenous general anesthesia with propofol and thiopental sodium (52.2 ± 1.7% and 54.8 ± 1.0%, respectively; $P = 0.001$). Later during the traumatic moment of operation for children of the sevoflurane group a tendency remained towards lower values in the hypnotic component of general anesthesia relative to the other two groups (46.4 ± 2.6%, 51.5 ± 1.6% and 56, 0 ± 1.2%, respectively). In the 1st hour after the operation, the pain intensity in children who were operated on under general anesthesia using sevoflurane was higher on the "Faces' and Oucher scales (1.4 ± 0.2 and 1.6 ± 0.3 points, respectively) compared with children who were operated on under intravenous general anesthesia with propofol and thiopental sodium (0.8 ± 0.1, 0.5 ± 0.1, 0.8 ± 0.1 and 0.9 ± 0.2 points, respectively). Therefore, we also share the opinion of Frederick et al. (2011), that further research is needed to investigate the effect of the depth of the hypnotic component of anesthesia, caused by various methods of general anesthesia, on the intensity of postoperative pain.

Currently, the question of the influence of propofol on the intensity of postoperative pain is being discussed, in particular it is stated that it provides a more powerful analgesic effect in the postoperative period in comparison with other anesthetics (Hasani et al., 2013; Tan et al., 2010). However, none of the authors explain why this is happening. Our data also showed that in the 1st hour after adenoidectomy in children operated on under general anesthesia using propofol in combination with fentanyl, the pain intensity was the lowest, assessed by the "Faces" and Oucher scales, compared with two other methods of general anesthesia. We assume that this may be related to the ability of propofol to reduce the secretion of cortisol. The strong positive correlation "cortisol – BIS-index" ($r = 0.97$; $P = 0.001$) in patients of group I is direct evidence of the influence of the depth of the hypnotic component of anesthesia caused by propofol on the level of cortisol. As a result, the level of cortisol changed minimally during all stages of the study in patients operated on under general anesthesia using propofol in combination with fentanyl.

It is known that if the level of some hormones increases above reference values (cortisol, progesterone, estrogen, testosterone and thyroid hormones), it will be impossible to provide adequate pain relief (Mensah-Nyagan et al., 2009).

The results of our study revealed the unidirectional positive correlation between ΔBIS and postoperative pain intensity, and between the level of cortisol (Δcortisol before surgery – the traumatic moment of operation, Δcortisol extubation – the 1st day after surgery and Δcortisol before surgery – the 1st day after surgery) and postoperative pain intensity. The obtained results, in our opinion, to some extent explain the relationship between the level of cortisol and postoperative pain. Given this, we assume, that it is due to the relative balance of cortisol level (remaining within the reference values – 140–600 nmol/l) in the perioperative period in patients operated on under general anesthesia using propofol in combination with fentanyl, that we were able to provide more adequate pain relief and less pain intensity in the early postoperative period, compared with the patients from two other groups. However,

our hypothesis requires further research. In the case of its confirmation, given the direct impact of the depth of the hypnotic component of general anesthesia based on propofol on the secretion of cortisol, further studies are needed to determine which optimal range of BIS-index anesthesiologists must use during operations in order to not only avoid an excessively deep or too superficial hypnotic component of general anesthesia, but also to predict the likely quality of postoperative analgesia. It is worth noting the fact that patients operated on under general anesthesia using propofol in combination with fentanyl, in which the value of ΔBIS "intubation – the traumatic moment of operation" was negative, did not experience postoperative pain on the "Faces" and Oucher scales, starting from the 6th hour after the operation until the 1st postoperative day inclusive.

Conclusion

A lower pain intensity, assessed by the "Faces" and Oucher scales, was observed at the 1st hour after the operation in patients using propofol in combination with fentanyl compared with the patients who received general anesthesia with sevoflurane or thiopental sodium in combination with fentanyl ($P = 0.013$ and $P = 0.011$, respectively).

The around-the-clock administration of ibuprofen at a dose 10 mg/kg after adenoidectomy provides effective postoperative analgesia in children of all groups and there is no need for additional prescription of analgesics during their entire stay in hospital.

References

Chen, L., Yu, L., Fan, Y., & Manyande, A. (2013). A comparison between total intravenous anaesthesia using propofol plus remifentanil and volatile induction/maintenance of anaesthesia using sevoflurane in children undergoing flexible fibreoptic bronchoscopy. Anaesthesia and Intensive Care, 41(6), 742–749.

Das, W., Bhattacharya, S., Ghosh, S., Saha, S., Mallik, S., & Pal, S. (2015). Comparison between general anesthesia and spinal anesthesia in attenuation of stress response in laparoscopic cholecystectomy: A randomized prospective trial. Saudi Journal of Anaesthesia, 9(2), 184–188.

Frederick, H. J., Wofford, K. A., deL Dear, G., Funk, E., Weldon, B. C., & Schulman, S. R. (2011). A randomized controlled trial in children having ophthalmic surgery to determine the effect of depth of anesthesia on emergence agitation. American Society of Anesthesiologists (ASA) Annual Meeting (Chicago, Illinois, October 15–19, 2011), A043.

Gupta, K., Maggo, A., Jain, M., Gupta, P. K., Rastogi, B., & Singhal, A. B. (2013). Blood glucose estimation as an indirect assessment of modulation of neuroendocrine stress response by dexmedetomidine versus fentanyl premedication during laparoscopic cholecystectomy: A clinical study. Anesthesia, Essays and Researches, 7(1), 34–38.

Hasani, A., Gecaj-Gashi, A., Llullaku, S., & Jashari, H. (2013). Postoperative analgesia in children after propofol versus sevoflurane anesthesia. Pain Medicine, 14(3), 442–446.

Hsu, A. A., von Elten, K., Chan, D., Flynn, T., Walker, K., Barnhill, J., Naun, C., Pedersen, A. M., Ponaman, M., Fredericks, G. J., Crudo, D. F., & Pinsker, J. E. (2012). Characterization of the cortisol stress response to sedation and anesthesia in children. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 97(10), 1830–1835.

Ihn, C. H., Joo, J. D., Choi, J. W., Kim, D. W., Jeon, Y. S., Kim, Y. S., Jung, H. S., & Kwon, S. Y. (2009). Comparison of stress hormone response, interleukin-6 and anaesthetic characteristics of two anaesthetic techniques: Volatile induction and maintenance of anaesthesia using sevoflurane versus total intravenous anaesthesia using propofol and remifentanil. Journal of International Medical Research, 37(6), 1760–1771.

Jung, S. M., & Cho, C. K. (2015). The effects of deep and light propofol anesthesia on stress response in patients undergoing open lung surgery: A randomized controlled trial. Korean Journal of Anesthesiology, 68(3), 224–231.

Kelbel, I., & Weiss, M. (2001). Anaesthetics and immune function. Current Opinion in Anaesthesiology, 14(6), 685–691.

Kokki, H., & Ahonen, R. (1997). Pain and activity disturbance after paediatric day case adenoidectomy. Paediatric Anaesthesia, 7(3), 227–231.

Korpela, R., Silvola, J., Laakso, E., & Meretoja, O. A. (2007). Oral naproxen but not oral paracetamol reduces the need for rescue analgesic after adenoidectomy in children. Acta Anaesthesiologica Scandinavica, 51(6), 726–730.

Marana, E., Colicci, S., Meo, F., Marana, R., & Proietti, R. (2010). Neuroendocrine stress response in gynecological laparoscopy: TIVA with propofol versus sevoflurane anesthesia. Journal of Clinical Anesthesia, 22(4), 250–255.

Mensah-Nyagan, A. G., Meyer, L., Schaeffer, V., Kibaly, C., & Patte-Mensah, C. (2009). Evidence for a key role of steroids in the modulation of pain. Psychoneuroendocrinology, 34(Suppl. 1), 169–177.

Messerer, B., Gutmann, A., Weinberg, A., & Sandner-Kiesling, A. (2010). Implementation of a standardized pain management in a pediatric surgery unit. Pediatric Surgery International, 26(9), 879–889.

Misiołek, H., Cettler, M., Woroń, J., Wordliczek, J., Dobrogowski, J., & Mayzner-Zawadzka, E. (2014). The 2014 guidelines for post-operative pain management. Anaesthesiology Intensive Therapy, 46(4), 221–244.

Naguib, A. N., Tobias, J. D., Hall, M. W., Cismowski, M. J., Miao, Y., Barry, N., Preston, T., Galantowicz, M., & Hoffman, T. M. (2013). The role of different anesthetic techniques in altering the stress response during cardiac surgery in children: A prospective, double-blinded, and randomized study. Pediatric Critical Care Medicine, 14(5), 481–490.

Palmieri, T. L., Lerine, S., Schonffeld-Warden, N., O'Mara, M. S., & Greenhalgh, D. G. (2006). Hypothalamic–pituitary–adrenal axis response to sustained stress after major burn injury in children. Journal of Burn Care and Research, 27, 742–748.

Paola, A., Carlo, L., Cinzia, D. R., Valter, P., Pierluigi, N., & Sollazzi, L. (2015). Stress response to surgery, anesthetics role and impact on cognition. Journal of Anesthesia and Clinical Research, 6(7), 1–5.

Pierce, C. A., & Voss, B. (2010). Efficacy and safety of ibuprofen and acetaminophen in children and adults: a meta-analysis and qualitative review. Annals of Pharmacotherapy, 44, 489–506.

Russell, P., von Ungern-Sternberg, B. S., & Schug, S. A. (2013). Perioperative analgesia in pediatric surgery. Current Opinion in Anaesthesiology, 26(4), 420–427.

Sakai, T., O'Flaherty, D., Giesecke, A. H., Kudo, A., Hirota, K., & Matsuki, A. (1995). Effects of total intravenous anesthesia with propofol on immuno-endocrine changes during surgical stress. Journal of Anesthesia, 9(3), 214–219.

Schnelle, A., Volk, G. F., Finkensieper, M., Meissner, W., & Guntinas-Lichius, O. (2013). Postoperative pain assessment after pediatric otolaryngologic surgery. Pain Medicine, 14(11), 1786–1796.

Schultz-Machata, A. M., Weiss, M., & Becke, K. (2014). What's new in pediatric acute pain therapy? Current Opinion in Anaesthesiology, 27(3), 316–322.

Sekhon, V., Menon, P., Arora, S., & Rao, K. L. (2013). Nephrectomy in children: Comparison of stress response to laparoscopic and open methods. Journal of Indian Association of Pediatric Surgeons, 18(2), 53–57.

Strauss, L. (2012). Anaesthetic management of paediatric adenotonsillectomy. South African Family Practice, 54(3), 17–20.

Tan, T., Bhinder, R., Carey, M., & Briggs, L. (2010). Day-surgery patients anesthetized with propofol have less postoperative pain than those anesthetized with sevoflurane. Anesthesia and Analgesia, 111(1), 83–85.

Taylor, L. K., Auchus, R. J., Baskin, L. S., & Miller, W. L. (2013). Cortisol response to operative stress with anesthesia in healthy children. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 98(9), 3687–3693.

Uysal, H. Y., Takmaz, S. A., Yaman, F., Baltaci, B., & Başar, H. (2011). The efficacy of intravenous paracetamol versus tramadol for postoperative analgesia after adenotonsillectomy in children. Journal of Clinical Anesthesia, 23(1), 53–57.

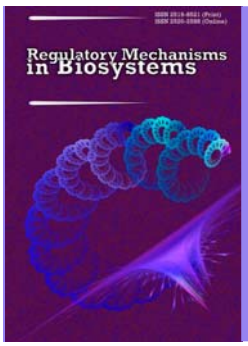
Vons, K. M., Bijker, J. B., Verwijs, E. W., Majoor, M. H., & de Graaff, J. C. (2014). Postoperative pain during the first week after adenoidectomy and guillotine adenotonsillectomy in children. Paediatric Anaesthesia, 24(5), 476–482.

Wang, X., Jiang, T., & Zhao, B. (2014). Effects of different maintain doses of dexmedetomidine on plasma cortisol and glucose during anesthesia recovery period in patients undergoing uvulopalatopharyngoplasty under sevoflurane inhalation anesthesia. Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi, 28(15), 1154–1157.

Wolf, A. R. (2012). Effects of regional analgesia on stress responses to pediatric surgery. Paediatric Anaesthesia, 22(1), 19–24.

Yang, L. Q., Li, J. J., Chen, S. Q., & Wang, Y. W. (2013). Effect of different depths of anesthesia on perioperative stress response in children undergoing adenoidectomy and tonsillectomy. CNS Neuroscience and Therapeutics, 19(2), 134–135.

Yusupov, A. S., Agzamhodjaev, T. S., Fayziev, O. Y., Mamatkulov, I. A., & Avazov, J. H. (2015). Research of a hormone of stress-cortisol and concentration of blood sugar for an estimation efficiency anesthesia. Austrian Journal of Technical and Natural Sciences, 3(4), 29–31.



Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(2), 283–286
doi: 10.15421/021744

The influence of radio-mimetic chemical mutagen on the chromosomal complex of winter wheat cells

M. M. Nazarenko

Dnipro State Agrarian and Economic University, Dnipro, Ukraine

Article info

Received 12.03.2017
Received in revised form 28.04.2017
Accepted 07.05.2017

Dnipro State Agrarian and Economic University, Sergiи Efremov Str, 25, Dnipro, 49600, Ukraine.
Tel.: +7-095-848-53-86.
E-mail: nik_nazarenko@ukr.net

Nazarenko, M. M. (2017). The influence of radio-mimetic chemical mutagen on the chromosomal complex of winter wheat cells. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(2), 283–286. doi:10.15421/021744

In this article we report the results of our investigation of cytogenetic parameters of changes in the chromosomal complex of new Ukrainian winter wheat varieties and some relationships between values of cytological indexes and different concentrations of DAB (1,4-bis-diazoacetyl butane). Analysis of chromosomal aberrations following mutagenic action of any kind of mutagen by the anaphase method is one of the most widely investigated and most precise methods which can be used to determine the fact of mutagenic action on plants and identify the nature of the mutagen. We combined in our investigation sensitivity of genotype to mutagen using cytological analysis of mutagen treated wheat populations with the corresponding different varieties by breeding methods to reveal their connections and differences, specific sensitivity to mutagenic action on the cell level. Dry seeds of 7 varieties and 1 line of winter wheat were subjected to DAB in 0.1% and 0.2% concentration, which is standard practice for mutation breeding of winter wheat. We investigated rates and spectra of chromosomal aberrations in the cells of the primary root tips of winter wheat during mitosis. The coefficient of correlations between the rate of chromosomal aberrations and the concentration of DAB was at the level 0.6%. Fragments/bridges ratio is a clear and sufficient index for determining the nature of the mutagen agent. We distinguished the following types of chromosomal rearrangements: chromatid and chromosome bridges, single and double fragments, micronuclei, and lagging chromosomes. Investigation of DAB action confirmed the reliability of the fragments-bridges ratio (prevalence of fragments over bridges for chemical mutagens and vice versa for gamma-rays) for identification of the nature of the mutagen. Complicated (or combined) aberrations, micronucleus, lagging chromosomes were not observed for some varieties under DAB action. Genotypes selected after action of chemical mutagens are less sensitive to recurrent mutagenesis with chemical mutagens.

Keywords: chromosomal aberrations; recurrent mutagenesis; wheat; genotype

Introduction

DAB (1,4-bisdiazoacetyl butane) as a mutagen is not so widely used in breeding practice as the mutagens previously investigated in our experiments (gamma-rays and nitrosoalkylureas), but it more suitable for use in the reverse genetic approach in modern functional genomics and for programmes for genetic improvement of indigenous cultivars in South-East Asia (FAO-IAEA programmes for coordination of research into chemical mutagenesis) (Shu et al., 2011). DAB as a mutagen factor is traditionally related to radio-mimetic chemical mutagens due to the similarity of appearance of mutagenic action of this mutagen and physical mutagens such as gamma- and x-rays (Eiges, 2013).

Mutagenic effects on the level of the cell and the plant as a whole are the key factors which limit both winter wheat productivity for agricultural purposes and the number of families for the breeding programme to obtain next generation material for identification and selection of mutants. The consequences of mutagen action on the cell level (chromosomal aberrations) are closely connected with the future mutation rate. The influence of the action of mutagens depends on the following parameters: physiological parameter of the object of mutagenic action, genotype of the object, type of mutagenic action (acute, chronic), nature of the mutagen, doses or concentration of the mutagen, fractional of dose or concentration, time of exposure, concentration or presence of free active oxygen, temperature and other environmental conditions (Zhang et al., 2015; Nazarenko, 2016).

This article is the third part of our investigation of recurrent mutagen treatment of winter wheat varieties. In the previous parts we researched the effects of genotype-mutagen interaction following gamma-ray irradiation and nitrosomethylurea (NMU) nitrosoethylurea (NEU) (Nazarenko, 2016; Nazarenko, Izhboldin, 2017).

Recurrent mutagenesis includes the exposure to mutagenic action of the progeny of plants that have been treated by mutagens in previous generations. The strategy of treating the progeny of previously treated plants is well-known as recurrent action. Based on the assumption that recurrent action would increase both the rates and spectra of mutation events, recurrent mutagen treatment was the subject of widespread investigation from the 1940s through to the 1960s, a period of almost thirty years. It was expected that recurrent treatments would further broaden the induced genetic variability exploitable in crop improvement and increase the chances of obtaining some types of valuable mutations. Researchers studied a wide range of mutagens including different types of physical mutagens (different types of radiation) and the chemical mutagen (EMS); the alternation of EMS with irradiation was also studied. The results of these experiments did not bear out the expected results and were at best mixed. In most cases, radiosensitivity, mutation rate and spectra remained unaffected by repeated irradiation of subsequent generations (Ali Sakin et al., 2005; Waugha, 2006). In our research we used other types of chemical mutation factors and alternation these mutagens with gamma-rays. And we obtained other valuable results related to reduction in radiosensetivity and

mutagen depression but also decrease in mutation rate in case of repeated exposure to the same mutagen. In the case of mutagen alternation we found a usual, normal reaction to mutagenic action (Nazarenko, 2016; Nazarenko and Izhboldin, 2017).

In modern scientific practice three main methods are exploited for investigation of mutagenic action on the chromosomal level. The first, the oldest one, is the observation of different types of chromosomal aberration which appear in mitotic cells during cell division. The second, FISH (fluorescence in situ hybridisation), is based on hybridisation of chromosome by specific DNA probes to metaphase preparations followed by detection with immuno-staining procedures. This technique allows detection of translocations involving different painted chromosomes (Jovtcheva et al., 2002). The third one is the micronucleus (MN) test in detecting small micronuclei compared with untreated and treated objects (Juchimiuk-Kwasniewska et al., 2011).

In our research we used the first method because of the advantages of this approach, which are simplicity, objectivity of the results, its reliability and its ability to assess the wide variety of different mutagens (Karthika and Subba, 2006; Albokari, 2014).

Analysis of the variability of chromosomal aberrations following mutagenic action of any type of mutagen by the anaphase method is one of the best-known and the most precise methods which can be exploited for determining the fact of mutagenic action and identifying the nature of the mutagen (Lifang et al., 2001; Adlera et al., 2004; Ukai, 2006). For example, this method is widely used for determining a radionuclide's pollution of the environment, its level, the danger of this pollution, as well as for identification of the optimal doses of radiation and concentrations of chemical mutagens in breeding practice (Ahloowalia et al., 2004; Nazarenko, 2017). The relation between clastogenic adaptation shown in reduction of chromatid type of aberrations, micronuclei and changes in number of chromosomes in cells is the manifestation of the clastogenic effect (Grant and Owens, 2001; Bignold, 2005).

Influence of different types of chemical mutagens or any type ionizing radiation according to this method can be analyzed by the number and kinds of chromosomal damage (Rakhmatullina, 2007). Both structural and numerical aberrations occur spontaneously due to intraneous and extraneous factors and appear during the cell division of the mitotic cycle (Nikolova et al., 2015).

Chromosomal rearrangements leading to visible mutations or modifications were first described in plants by de Vries (de Vries, 1918). A break in either single (resting stage) or divided (prophase) chromosomes is the consequence of direct action on the chromosome by the ionization produced by any elementary particle. Such a break may remain and give rise to terminal deletion, rejoin in the original position (restitution) or join with an indigenous break in the same or different chromosome to produce various types of rearrangements (Natarajan, 2005).

Changes in chromosome number and structure in mitotic cells are initiated after irradiation. Chromosomal changes result from damage, through exchanges, laggards and anaphase bridges, dicentric and centric ring formations, terminal fragments with telomeric signal at only one end and interstitial fragments that appear as double minutes without any telomeric signals changes in irradiated mitotic cells (Bolzarn and Bianchi, 2006; Rakhmatullina, 2007).

Together with genetic mutations, chromosomal aberrations may be generated in the form of rebuilding of different structures (deletions, inversions, translocations, etc.) (Shu et al., 2011). Translocation, a type of aberration which possibly results from the rejoining of broken chromosome parts, is the most important for mutation breeding on the chromosome level. Cytological aberrations observed in cells mitosis include the production of micronuclei and other types of chromosomal changes (Ukai, 2006; Shu et al., 2011).

All the effects which are summarized above have led to the development of many practical protocols. *In vitro* "chromosome aberration test" in cultured mammalian cells and *in vivo* "micronucleus assay" in bone marrow cells have been incorporated in the guidelines of mutagenic testing by national and international regulatory bodies. Several international inter-laboratory studies were carried out in 1970s and 1980s to standardise the test protocols and these exercises are still going on (Natarajan, 2002).

The main purpose of our research is to determine the damage capacity of mutagens and their capacity for producing different types of chromosomal aberrations and, in perspective, mutations in subsequent generations, the assessment of cytogenetic variability of the modern Ukrainian winter wheat varieties and relationship between cytogenetic parameters and different concentration of DAB.

Material and methods

Winter wheat seeds (*Triticum aestivum* L.) (approx. 14% moisture content) of (in brackets method of obtaining varieties or mutagens used) Favoritka, Lasunya, Hurtovina (irradiation by gamma rays), line 418, Kolos Mironovschiny (field hybridization), Sonechko and Kalinova (chemical mutagenesis), Voloshkova (thermomutagenesis – low plus temperature under vernalization was used as the mutagen factor) were subjected to 1,4-bis-diazoacetyl butane (DAB) – 0,1% and 0,2% presoaked. Each treatment used of 1000 wheat seeds. Exposure to chemicals mutagens lasted 18 hours. These concentrations and exposure are optimal for the breeding process, as has been repeatedly established earlier (Ahloowalia et al., 2004; Nazarenko, 2016). Non-treated varieties were used as a control for each variety.

The seeds used in this study were of the M_0 generation. After mutagen treatment, the dry seeds were germinated in Petri dishes for 24–48 hours (depending on presoaking and mutagen action), temperature +25 ºC. Afterwards, the central primary roots were cut (if their length was from 10–15 mm) and fixed in solution of alcohol and acetic acid (in proportion 3 : 1) for 24 hours. The fixation material was stored in 70% alcohol solution at a temperature of 2 ºC (30–35 roots per variant). We conducted cytological analysis by the standard method by temporary press-time preparations of primary roots tips (1.0–1.5 mm length) stained with acetocarmine (prepared by the Remsdorf method). Tissue maceration was conducted at 45% solution of acetic acid (during 5 minutes under 60 ºC). Anaphase of cell division was observed by light microscope JNAVAL. No less than 900 cells in corresponding phases of mitosis were observed in each variant, the number of samples was about 20–25 per variant (Lifang et al., 2001; Rank et al., 2002; Natarajan, 2005).

Statistical analysis of the obtained data was conducted by the method of multi-factor analysis, the variability of the index difference was evaluated by ANOVA, we used the standard tools of the program Statistica 8.0 (StatSoft Inc., USA).

Results and discussion

In Table 1 we present the data of the results of the following parameters analyzed: total number of observed mitoses in the primary root tips, number of cells in the corresponding phase with visible rearrangements of chromosomal aberrations, total rate of chromosomal aberrations. Standard error (± SE) values of the treated variants is shown in Table 1 too. As we can see from Table 1, frequencies of aberrations ranged from 3.3 % (Kalinova, DAB 0.1%) to 14.2% (Voloshkova, DAB 0.2%) of the total number of dividing cells in the experimental microscope samples. All the variants are statistically significantly dissimilar from each other and from the control.

Lower frequency of aberrations in any cases was peculiar to varieties obtained by chemical mutation breeding (Sonechko, Kalinova) and we can predict that these varieties are less sensitive to this mutagen (lower rate of visible mutations) (this corresponds to our previous investigations). A higher frequency of aberrations was obtained by use of DAB at 0.2% as usual.

Rates of chromosomal aberrations were statistically lower when we used DAB for varieties obtained with chemical mutagenesis. The same situation we observed with the varieties Kalinova and Sonechko, when NMU and NEU were used in our previous investi-

gations, but in this case we cannot see statistically significant difference between these two varieties in contrast to the much sharper decrease for Sonechko under nitrosoalkylureas than for Kalinova.

Table 1
Rate of chromosomal aberrations in winter wheat division cells

Variety	Mitosis, number	Chromosomal aberrations		Mitosis, number	Chromosomal aberrations	
		number	percent		number	percent
	Favoritka			418		
Control	984	19	1.9 ± 0.3	962	11	1.1 ± 0.1
DAB, 0.1 %	912	54	5.9 ± 0.7*	1024	41	4.0 ± 0.6*
DAB, 0.2 %	1007	102	10.1 ± 1.0*	984	88	9.0 ± 0.9*
	Lasunya			Hurtovina		
Control	1056	15	1.4 ± 0.2	1034	12	1.2 ± 0.1
DAB, 0.1 %	1033	57	5.5 ± 0.7*	1017	61	6.0 ± 0.7*
DAB, 0.2 %	1020	104	10.2 ± 1.1*	994	111	11.2 ± 1.1*
	Sonechko			Voloshkova		
Control	1026	8	0.8 ± 0.1	1003	31	3.1 ± 0.3
DAB, 0.1 %	1003	58	5.8 ± 0,3*	1014	81	8.0 ± 0.8*
DAB, 0.2 %	984	85	8.6 ± 0.5*	979	139	14.2 ± 1.1*
	Kalinova			Kolos Mironivschini		
Control	1047	9	0.9 ± 0.1	909	10	1.1 ± 0.1
DAB, 0.1 %	1003	33	3.3 ± 0.1*	1003	58	5.8 ± 0.7*
DAB, 0.2 %	1013	77	7.6 ± 0.4*	1014	104	10.3 ± 1.0*

Note: * – difference statistically significant at $P < 0,05$.

Therefore, we can affirm that DAB as a mutagen by its nature does not so much depend on the object of genotypes as nitrosoalkylureas or less damaging mutagens with lower rates, which are not so evident in their action (by the lower rate of aberrations in similar variants of treatments). The varieties Sonechko and Kalinova are less sensitive to DAB action. DAB as a mutagen initiated lower rates of chromosome damage than nitrosoalkylureas or gamma-rays (Nazarenko, 2016). We can range mutagens in the following sequence according to genetic activity (from the minimum to the maximum) DAB → NEU → NMU → gamma-rays.

From the Table 1 we can see that higher rates of chromosomal changes in any cases are characteristic for varieties obtained by mutation breeding with use of thermo-mutagenesis (Volochkova). All other varieties (field hybridization and after irradiation) were similar in their reaction to DAB – rate of chromosome rebuilding was around 9–10%. According to this fact, recurrent mutagenesis is an acceptable method for exploiting DAB as a mutagen if we exploit physical mutagens or classical breeding methods for obtaining the objects of action (for example DAB after gamma-rays in our pattern or vice versa).

We found the following types of aberrations of chromosomes after investigation of spectra in our samples: chromosomal bridges and double-bridges, fragments of chromosomes and double-fragments, micronucleus, lagging chromosomes. Cases with complicated aberrations (two or more kinds of changes in one mitosis) and ratio of fragments to bridges were counted separately (Table 2). The number of any type of chromosomal change sharply increased when the concentration was raised (correlation coefficients is 0.6 – significantly lower than for other mutagens). In this case, as with nitrosoalkylureas, more fragments and double-fragments were caused by DAB (fragments-bridges ratio was more than 1) (Nazarenko and Izhboldin, 2017). We will be able to use this parameter for identifying the difference between the action of gamma-rays and chemical mutagenesis in cases of unknown mutagen factors.

Table 2
Types of chromosomal rebuilding in first generation winter wheat

Variant	Fragments (single and double)		Bridges (chromosome and chromatide)		Fragments/ bridges	Micronucleus, lagging chromosomes		Complicated aberrations	
	number	percent	number	percent		number	percent	number	percent
Favoritka, control	6	54.6	5	45.5	1.2	0	0.0	2	18.2
DAB, 0.1%	4	21.1	14	73.7	0.3	1	5.3	1	5.3
DAB, 0.2%	41	75.9	13	24.1	3.2	0	0.0	0	0.0
Lasunya, control	4	26.7	11	73.3	0.4	0	0.0	0	0.0
DAB, 0.1%	37	64.9	17	29.8	2.2	3	5.3	0	0.0
DAB, 0.2%	68	65.4	36	34.6	1.9	0	0.0	2	1.9
Hurtovina, control	7	58.3	5	41.7	1.4	0	0.0	0	0.0
DAB, 0.1%	34	55.7	27	44.3	1.3	0	0.0	0	0.0
DAB, 0.2%	59	53.2	52	46.9	1.1	0	0.0	4	3.6
Line 418, control	6	54.6	5	45.5	1.2	0	0.0	2	18.2
DAB, 0.1%	29	70.7	11	26.8	2.6	1	2.4	0	0.0
DAB, 0.2%	58	65.9	27	30.7	2.2	3	3.4	0	0.0
Kolos Mironovschiny, control	5	50.0	5	50.0	1.0	0	0.0	0	0.0
DAB, 0.1%	38	65.5	20	34.5	1.9	0	0.0	2	3.5
DAB, 0.2%	61	58.7	37	35.6	1.7	6	5.8	14	13.5
Sonechko, control	6	75.0	2	25.0	3.0	0	0.0	0	0.0
DAB, 0.1%	41	70.7	17	29.3	2.4	0	0.0	4	6.9
DAB, 0.2%	63	74.1	22	25.9	2.9	0	0.0	8	9.4
Kalinova, control	2	22.2	7	77.8	0.3	0	0.0	0	0.0
DAB, 0.1%	18	54.6	15	45.5	1.2	0	0.0	0	0.0
DAB, 0.2%	34	50.8	33	49.3	1.0	0	0.0	0	0.0
Voloshkova, control	16	51.6	13	41.9	1.2	2	6.5	5	16.1
DAB, 0.1%	51	63.0	30	37.0	1.7	0	0.0	3	3.7
DAB, 0.2%	86	61.9	52	37.4	1.7	1	0.7	7	5.0

The number of complicated (or combined) aberrations was significantly lower both for micronuclei and lagging chromosomes than for previous mutagens. Generally, when concentration of DAB was increased the rate of fragments and bridges also increased. But the opposite situation applied to other types. We could not observe these types for the variety Kalinova at all, only fragments and bridges. For line 418, complicated aberrations were also absent, but other types they were present. For varieties Favoritka, Lasunya, Hurtovina (all varieties are radiomutants) in some variants under DAB action complicated aberrations were also absent. On the other hand micronuclei and lagging chromosomes were absent for the varieties Sonechko and Hurtovina. The results of three-factor analysis ("genotype", "dose/concentration" and "mutagen") in the general scheme of analysis we include our data from previous investigation of chemical mutagens and gamma-rays action (Nazarenko, 2016), show us that the factors which influence the rate of chromosome aberrations are in order of importance, "dose", then "genotype", then the "mutagen". The role of the second and third factors was increased as compared with our previous investigations. Equally, if we included in the factor scheme only chemical mutagens, we would observe a different situation with the following order of importance, "genotype", "concentration", "mutagen". Thus, we found that repeated exposure to a similar mutagen (for example, DAB on the variety obtained by the action of this mutagen) leads to

a substantially lower rate of chromosomal aberrations and absence of some types of rare aberrations in the spectra. Chemical mutagens have been shown to have a higher level of mutagen-genotype interaction and depend more in their action on genotype of the object.

Therefore, investigation of DAB action confirmed the reliability of fragments-bridges ratio (prevalence of fragments over bridges for chemical mutagens and vice versa for gamma-rays) for identification of the nature of a mutagen. Complicated (or combined) aberrations, micronuclei, lagging chromosomes were not observed for some varieties under DAB action. Genotypes selected after action of chemical mutagens are less sensitive to recurrent mutagenesis with chemical mutagens (in case of DAB, NEU, NMU). Previous patterns for other mutagens were confirmed for DAB too.

Conclusions

DAB as a mutagen was shown to be substantially lower in chromosomal aberration induction in comparison with previous mutagens (gamma-rays and nitrosoalkylureas). We ranged mutagens in the following sequence (from minimum to maximum) DAB → NEU → NMU → gamma-rays. We can predict a lower amount of mutations if we use DAB for mutation breeding purposes.

The varieties obtained through chemical mutations, Kalinova and Sonechko, are less sensitive to recurrent mutagenesis with this mutagen. In contrast with other chemical mutagens, DAB was less specific in genotype-mutagen interaction on the level of chromosomal rebuilding, but more specific for spectra of aberrations. Complicated (or combined) aberrations were not observed for Kalinova and we did not find micronuclei, lagging chromosomes after DAB action for Kalinova and Sonechko. Chemical mutagens showed a higher level of dependence in its action on the genotype of the object.

Comparison between bridges and fragments following DAB action confirmed reliability of the fragments-bridges ratio (prevalence of fragments over bridges for chemical mutagens and the opposite situation for gamma-rays) for identification of the nature of a mutagen. In general, the rate of chromosomal aberrations showed a linear increase with the concentration of the mutagen.

References

Adlera, I., Carereb, A., & Eichenlaub-Ritterc, U. (2004). Gender differences in the induction of chromosomal aberrations and gene mutations in rodent germ cells. Environmental Research, 17, 53–59.

Ahloowalia, B. S., Maluszynski, M., & Nicoterlein, K. (2004). Global impact of mutation-derived varieties. Euphytica, 135, 187–204.

Ali Sakin, M., Yildirim, A., & Gikmen, S. (2005). Determining some yield and quality characteristics of mutants induced from a durum wheat (*Triticum durum* Desf.) cultivar. Turkean Journal Agriculture and Forestry, 29, 61–67.

Albokari, M. (2014). Induction of mutants in durum wheat using gamma irradiation. Pakistan Journal of Botany, 46, 317–324.

Bignold, L. P. (2009). Mechanisms of clastogen-induced chromosomal aberrations: A critical review and description of a model based on failures of tethering of DNA strand ends to strand-breaking enzymes. Mutation Research, 681, 271–298.

Bolzarn, A. D., & Bianchi, M. S. (2006). Telomeres, interstitial telomeric repeat sequences, and chromosomal aberrations. Mutation Research, 612, 189–214.

Eiges, N. (2013). The historical role of Iosif Abramovch Rapoport in genetics. Further studies using chemical mutagenesis. Russian Journal of Genetics: Applied Research, 3(4), 316–324.

Grant, W. F., & Owens, E. T. (2001). Chromosome aberration assays in *Pisum* for the study of environmental mutagens. Mutation Research, 488, 93–118.

Jovtcheva, G., Stergiosa, M., & Schubert, I. (2002). A comparison of N-methyl-N-nitrosourea-induced chromatid aberrations and micronuclei in barley meristems using FISH techniques. Mutation Research, 517, 47–51.

Juchimiuk-Kwasniewska, J., Brodziak, L., & Maluszynska, J. (2011). FISH in analysis of gamma ray-induced micronuclei formation in barley. Journal of Applied Genetics, 52, 23–29.

Karthika, I. R., & Subba, B. (2006). Effect of gama rays and EMS on two varieties of soybean. Asian Journal of Biological Sciences, 5, 721–724.

Lifang, W., & Zengliang, Y. (2001). Radiobiological effects of a low-energy ion beam on wheat. Radiation Environmental Biophysics, 40, 53–57.

Natarajan, A. T. (2002). Chromosome aberrations: Past, present and future. Mutation Research, 504, 3–16.

Natarajan, A. T. (2005). Chromosome aberrations: Plants to human and feulgen to FISH. Current Science, 89, 335–340.

Nazarenko, M. (2017). Specific features in the negative consequences of a mutagenic action. Russian Journal of Genetics: Applied Research, 7(2), 195–196.

Nazarenko, M. (2016). Parameters of winter wheat growing and development after mutagen action. Bulletin of Transilvania University of Brasov – series II – Forestry, Wood Industry, Agricultural, Food Engineering, 58(2), 109–116.

Nazarenko, M. (2016). Specify of nitrosoalkylureas action on cell level in winter wheat. Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology, Ecology. 24(2), 258–263.

Nazarenko, M., & Izhboldin, O. (2017). Chromosomal rearrangements caused by gamma-irradiation in winter wheat cells. Biosystems Diversity, 25(1), 25–28.

Nikolova, I., Georgieva, M., Kruppa, K., Molnor-Long, M., Liu, L., Manova, V., & Stoilov, L. (2015). Cytogenetic effects in barley root apical meristem after exposure of dry seeds to lithium ion beams. Genetics and Plant Physiology, 5, 3–9.

Rakhmatullina, E. M., & Sanamyan, M. F. (2007). Estimation of efficiency of seed irradiation by thermal neutrons for inducing chromosomal aberration in M_2 of cotton *Gossypium hirsutum* L. Russian Journal of Genetics, 43(5), 518–524.

Rank, J., Lopez, L. C., & Nielsen, M. H. (2002). Genotoxicity of maleic hydrazide, acridine and DEHP in *Allium cepa* root cells performed by two different laboratories. Hereditas, 136, 13–18.

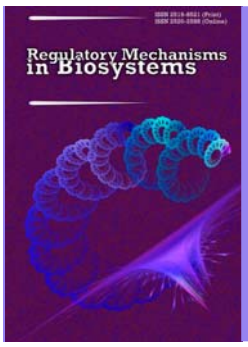
Shu, Q. Y., Forster B. P., & Nakagava, H. (2011) Plant mutation breeding and biotechnology. CABI publishing, Vienna.

Ukai, Y. (2006). Effectiveness and efficiency of mutagenic treatments. Gamma Field Symposia, 45, 1–4.

de Vries, H. (1918). Mass mutations and twin hybrids in *Oenothera grandiflora* Ait. Botanical Gazette, 65, 377–422.

Waugha, R. (2006). Harvesting the potential of induced biological diversity. Trends in Plant Science, 11, 71–79.

Zhang, J., Jiang, Y., Guo, Y., Li, G., Yang, Z., Xu, D., & Xuan, P. (2015). Identification of novel chromosomal aberrations induced by ^{60}Co-γ-irradiation in wheat – *Dasypyrum villosum* lines. Intternational Journal of Molecular Sciences, 16, 29787–29796.



Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(2), 287–292
doi: 10.15421/021745

Protein kinase C (PKC) involved in enhancement of α_1-adrenoceptor-mediated responses of the main pulmonary artery in rats with diabetes mellitus

I. V. Kizub*, O. I. Kharchenko*, O. S. Kostiuk*, L. I. Ostapchenko*, A. I. Soloviev**

*Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine
**Institute of Pharmacology and Toxicology of National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

Article info

Received 24.03.2017
Received in revised form 20.04.2017
Accepted 23.04.2017

Taras Shevchenko National University of Kyiv, Academician Glushkov Ave., 2, Kyiv, 03022, Ukraine. Tel. +38-044-456-02-88. E-mail: buzzmann@ukr.net, 77olgaz@gmail.com, alexkostyuk@mail.ru, decanat_bf@univ.kiev.ua, tonysolpharm@gmail.com.

Kizub, I. V., Kharchenko, O. I., Kostiuk, O. S., Ostapchenko, L. I., & Soloviev, A. I. (2017). Protein kinase C (PKC) involved in enhancement of α1-adrenoceptor-mediated responses of the main pulmonary artery in rats with diabetes mellitus. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(2), 287–292. doi:10.15421/021745

Diabetes mellitus (DM) causes multiple dysfunctions including circulatory disorders such as cardiomyopathy, angiopathy, atherosclerosis and arterial hypertension. Moreover, DM can strongly affect pulmonary circulation, enhancing the wall thickness of the pulmonary arteries, changing their tone and contractility, and gas exchange in the lungs. It can lead to marked loss of lung function and respiratory efficiency. It is also known that protein kinase C (PKC) activity increases in DM and that PKC is involved in the mechanisms of DM-associated vascular complications. However, the effect of DM on pulmonary artery tone has been poorly investigated and the role of PKC in this remains unknown. The aim of this study was to investigate changes in contractility of pulmonary arteries in rats with DM and to determine the possible role of PKC in this process. Experimental type 1 DM was elicited in male Wistar rats by single streptozotocin (STZ, 65 mg/kg) injection. DM was verified by the presence of hyperglycaemia. The investigation was performed on the isolated rings of the main pulmonary arteries using the method of vascular tone registration. Phenylephrine (PhE, 0.1 nM – 1 mM) caused dose-dependent constriction of the pulmonary arteries. The pD_2 (negative logarithm of the agonist concentration required for half-maximum response) of this constriction increased in rats with DM, however significant changes in amplitude of PhE-induced constriction were not observed. PKC inhibition with chelerythrine and staurosporine (1 μM) significantly shifted PhE the concentration-response curve to the right in intact diabetic vessels but had no effect on sensitivity to PhE in deendothelised diabetic vessels. Our data suggest that type 1 DM leads to enhancement in pulmonary artery α_1-adrenoceptor-mediated contractility and PKC activity in the endothelium rather than in vascular SMCs is involved in this process.

Keywords: diabetes mellitus; protein kinase C; vascular tone; vascular smooth muscle; endothelium; pulmonary artery

Introduction

Diabetes mellitus (DM) is a complex syndrome that is rapidly rising in incidence throughout the world. Hyperglycemia and alterations in metabolism are the most severe components of DM (Zimmet, 2011). The adverse long-term effects of DM involve many organ systems and are associated with a complex pathology leading to a large number of secondary cellular and subcellular changes.

DM leads to multiple dysfunctions including cardiovascular diseases, one of the major causes of morbidity, mortality, end-stage renal disease, and blindness (Madonna and de Caterina, 2011). The macrovascular manifestations of DM include angiopathy, atherosclerosis, medial calcification, and arterial hypertension mostly located in the coronary and carotid arteries (Whiteley et al., 2005; Cosson et al., 2006), cerebral vessels, and the large peripheral arteries of the lower extremities (Funk et al., 2012). Increased blood flow and vascular tone elevation have been documented in diabetes (Madonna and de Caterina, 2011).

Hyperglycaemia is a key factor responsible for the development of vascular complications in diabetes (Boussageon et al., 2011; Madonna and de Caterina, 2011). Several hyperglycaemia-associated mechanisms have been identified as contributing to the development of vascular dysfunction associated with DM. One of such mechanisms may involve activation of protein kinase C (PKC) pathways (Kizub et al., 2014). PKC is a family of regulatory enzymes (serine/threonine kinases) (Cosentino-Gomes et al., 2012) that plays a prominent role in the signal transduction of several vascular functions including regulation of vascular smooth muscle contractility (Somlyo and Somlyo, 2003; Cosentino-Gomes et al., 2012). It has been shown that dysfunctions of these systems are associated with the diabetic state and involve PKC-dependent mechanisms which are implicated as an important players in the pathogenesis of diabetic microangiopathy (Clarke and Dodson, 2007; Kizub et al., 2014) and macroangiopathy (Geraldes and King, 2010; Kizub et al., 2014). Numerous PKC isozymes (α, β_1, β_2, γ, ε, η, ζ, δ, and ι/λ) have been shown to be activated or overexpressed in vascular smooth muscle cells (SMCs) and the endothelium of different vascular regions in subjects with diabetes (Ramana et al., 2005; Klymenko et al., 2014).

Despite a number of studies addressed to vascular complications in DM, there is little known about the effect of DM on pulmonary circulation. The present study has been devoted to an investigation of alterations in pulmonary artery tone associated with DM and the possible role of PKC in this process.

Material and methods

Experiments were performed on isolated vascular rings obtained from the main pulmonary artery of male Wistar rats

weighing 190–210 g. All experimental procedures conformed to the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes and were approved by the Ethics Committee of the Educational and Scientific Centre "Institute of Biology and Medicine" of Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ukraine and State Institution "Institute of Pharmacology and Toxicology of NAMS of Ukraine", Kyiv, Ukraine. Two groups of animals were used: diabetic rats injected with streptozotocin (STZ, 60–65 mg/kg, i.p.) and maintained for 9 weeks, and age-matched controls. STZ was dissolved in buffer solution containing 0.9% NaCl and 10 mM citrate (pH = 4.6). DM development was verified by the presence of hyperglycaemia (plasma glucose higher than 20 mM) every 4 weeks after streptozotocin injection, and on the day of experimentation. The diabetic group of animals (blood glucose 26.02 ± 5.04 mM, n = 8) was compared with the control rats (blood glucose 6.74 ± 0.12 mM, n = 8; two-tailed t-test $P < 0.05$). Blood samples were obtained from the tail tip and analyzed using a glucose meter Bionime Rightest GS300 (Bionime Gmbh, Switzerland).

The animals were killed by cervical dislocation. The heart and lungs were rapidly removed and placed into Krebs' physiological salt solution (composition in mM: 133.00 NaCl, 16.30 $NaHCO_3$, 1.05 $MgCl_2$, 1.38 NaH_2PO_4, 4.70 KCl, 7.00 D-glucose, 2.75 $CaCl_2$ and 10 HEPES, pH 7.4). For rings from diabetic animals, the concentration of glucose was increased to 25 mM. Vessels were dissected free, cleaned of connective and adipose tissue, cut into 2–3 mm rings and mounted on fine stainless steel hooks in organ baths perfused with warmed to 37 °C Krebs' solution. For vascular tone measurement capacitive tension detectors (Danish Myo Technology, Aarhus, Denmark) and LabScribe 2 (World Precession Instrument Inc., USA) software were used. The resting tension of the vessels was gradually increased to 0.7–0.8 g. After 1 hour equilibration, each vascular ring was exposed twice to 60 mM KCl exposure to assess its viability and reproducibility of contractions.

In experiments with deendothlised vessels the endothelium was disrupted chemically with 15 min incubation of the vascular rings in Krebs' solution containing 0.1 mg/ml of saponine. Successful endothelium removal was determined by absence of 10 μM acetylcholine-induced relaxation following the contraction in response to 1 mM phenylephrine (PhE) application.

Data are presented as mean ± SE with n indicating the number of vascular preparations tested. Contractile responses were expressed as a percentage of the maximum response produced by 60 mM KCl or 1 mM PhE. The sensitivity to the agonist was expressed as pD_2 (negative logarithm of the agonist concentration required for half-maximum response). In order to determine this parameter, data points were calculated using the Origin 8.1 software (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) with the 'DoseResp' function in the following form:

$$T = \frac{100}{1+10^{Log(x0-x)\bullet p}},$$

where T is normalized tension (expressed as % of maximal contraction) at the agonist concentration x (expressed as negative logarithm), x_0 is the midpoint of the concentration-effect curve (e.g. $T = 50\%$) and p is the slope factor of the curve. Mean values were obtained by averaging pD_2 values obtained from individual preparations. Statistical comparisons were made using Student's unpaired two-tailed t-test for two groups. Differences for $P < 0.05$ were considered to be statistically significant.

Results

Effect of DM on intact pulmonary artery contractility. In control intact pulmonary artery rings isolated from non-diabetic rats, phenylephrine (PhE), a selective α_1-adrenoceptor agonist, applied at ascending concentrations (0.1 nM – 1 mM) evoked concentration-dependent contractions with a maximal response (E_{max}) 146.76 ± 18.92 % (n = 16) of constriction evoked by 5-minute application of 60 mM KCl (Fig. 1 and 2*A*). A plateau response was obtained after the addition of each test PhE concentration before the addition of a subsequent dose. pD_2 value of PhE in control vessels consisted 7.49 ± 0.19 (n = 16) (Fig. 2*B*).

In intact pulmonary arteries isolated from diabetic rats, the responsiveness to PhE was enhanced since the diabetic vessels responded to lower concentrations of the agonist. pD_2 value of PhE in diabetic vessels was 8.02 ± 0.09 (n = 16, $P < 0.05$) (Fig. 2). In contrast, pulmonary artery rings from diabetic animals showed no significant difference in E_{max} between nondiabetic control and diabetic rats. It was 130.4 ± 10.5% (n = 16; $P > 0.05$) of constriction evoked by 60 mM KCl (Fig. 1).

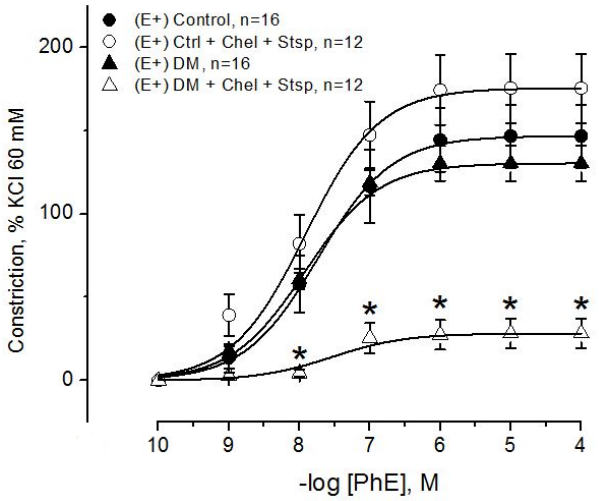


Fig. 1. Mean data of relevant amplitude of the contractile responses to phenylephrine (PhE, 0.1 nM – 1 mM) in intact (E^+) pulmonary artery from control (Ctrl) and diabetic (DM) rats before and after PKC inhibition with chelerythrine (Chel, 1 μM) and staurosporine (Stsp, 1 μM); * – $P < 0.05$

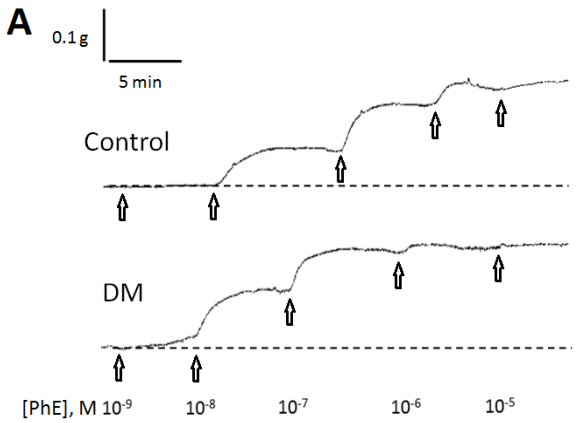
Effect of DM on deendothelised pulmonary artery contractility. To evaluate the role of the endothelium in pulmonary artery contractility in DM experiments were performed on deendothelised vascular rings. In deendothelised pulmonary arteries from control rats, 0.1 nM – 1 mM PhE application led to vasoconstriction development with a maximal amplitude of 99.4 ± 22.5% (n = 8) of contraction evoked by 60 mM KCl (Fig. 3). pD_2 value of PhE-induced constriction in these vessels was 7.55 ± 0.16 (n = 8) (Fig. 4).

In the deendothelised pulmonary artery of animals with experimental DM, the dose-response curve of PhE was significantly shifted to the right as compared to the intact vessels of the control animals, showing decrease in vascular sensitivity to the agonist with pD_2 value of 7.09 ± 0.22 (n = 8, $P < 0.05$) (Fig. 4). In contrast to deendothelised control vessels, significant changes in the amplitude of PhE-evoked contraction in diabetic pulmonary artery rings were not observed (138.7 ± 24.0%; n = 8; $P > 0.05$; Fig. 3).

Effect of PKC inhibition on intact pulmonary artery contractility in norm and DM. To investigate the role of PKC in pulmonary artery tone alterations in DM, vascular tissues were pretreated for 20 min with combination of potent cell-permeable PKC inhibitors chelerythrine (1 μM) and staurosporine (1 μM). PKC inhibition had no significant effect on the amplitude of Phe-induced constriction in intact pulmonary arteries of control rats. Maximum contraction in response to 100 μM PhE was 175.5 ± 20.8% (n = 12; $P > 0.05$ as compared to control) (Fig. 1). On the other hand, PKC inhibition resulted in an unexpected leftward shift of the concentration-response curve for PhE with pD_2 value 8.55 ± 0.49 (n = 8; $P < 0.05$) (Fig. 2).

In diabetic pulmonary arteries PKC inhibition significantly shifted the concentration-response curve for PhE to the right (Fig. 2). Mean pD_2 value in diabetic arteries was 6.67 ± 0.29 (n = 12;

P < 0.05) compared with the control tissue. PKC inhibition also significantly decreased amplitude of PhE-induced constriction in pulmonary arteries from diabetic animals (Fig. 2). In these conditions its maximum was 28.3 ± 8.6% (n = 12; P < 0.05) of constriction evoked by 60 mM KCl (Fig. 1).



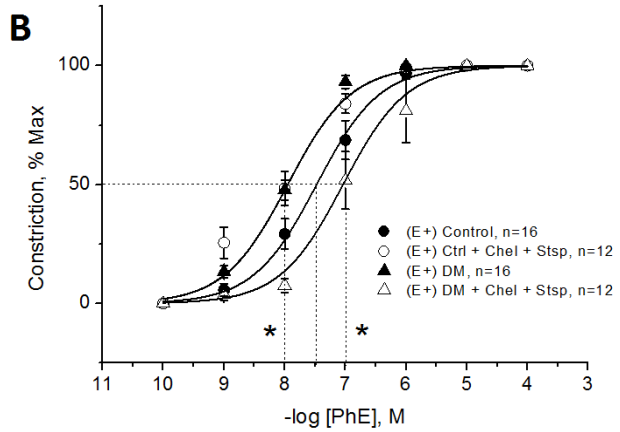


Fig. 2. The changes in sensitivity to phenylephrine (PhE) in intact (E^+) pulmonary artery from control and diabetic rats: *A* – original traces illustrating agonist concentration-response in intact control (top) and diabetic (bottom) rat pulmonary artery preparations; *B* – mean data of normalized amplitude of the contractile responses plotted versus PhE concentration (0.1 nM – 1 mM) in intact (E^+) pulmonary artery from control (Ctrl) and diabetic (DM) rats before and after PKC inhibition with chelerythrine (Chel, 1 μM) and staurosporine (Stsp, 1 μM); vertical dotted lines represent pD_2 value of PhE-induced constriction dose-response curves fitted by equation 1 (see Methods section); it should be noted that dose-response curves "DM" and "Ctrl + Chel + Stsp" are superposed; * – P < 0.05

Effect of PKC inhibition on deendothelised pulmonary artery contractility in norm and DM. PKC inhibition with chelerythrine and staurosporine had no effect on E_{max} of deendothelised control pulmonary artery contraction evoked by 100 μM PhE with value 64.2 ± 14.9% (n = 9; P > 0.05) (Fig. 3). The sensitivity of deendothelised vessels from control animals to PhE also was not changed, and pD_2 value of PhE-induced constriction in these vessels was 7.77 ± 0.31 (n = 9; P > 0.05) (Fig. 4).

In diabetic endothelium-free vascular tissues PKC inhibition also had no effect on maximal amplitude of PhE-induced vasoconstriction. It was 103.0 ± 27.3% (n = 8; P > 0.05) (Fig. 3). PKC inhibition also did not affect concentration-response curve for PhE in deendothelised vessels from diabetic animals. pD_2 value of PhE-induced constriction in these vessels was 6.99 ± 0.32 (n = 8; P > 0.05) as compared to control (Fig. 4). Table 1 represents comparison of pD_2 values which characterize PhE-induced constriction dose-response curve in both intact and deendothelised pulmonary arteries from control and diabetic rats.

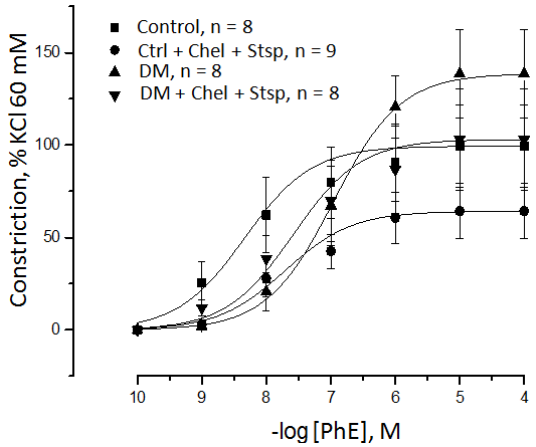


Fig. 3. Mean data of relevant amplitude of the contractile responses to phenylephrine (PhE, 0.1 nM – 1 mM) in deendothelised (E^-) pulmonary artery from control (Ctrl) and diabetic (DM) rats before and after PKC inhibition with chelerythrine (Chel, 1 μM) and staurosporine (Stsp, 1 μM); * – P < 0.05

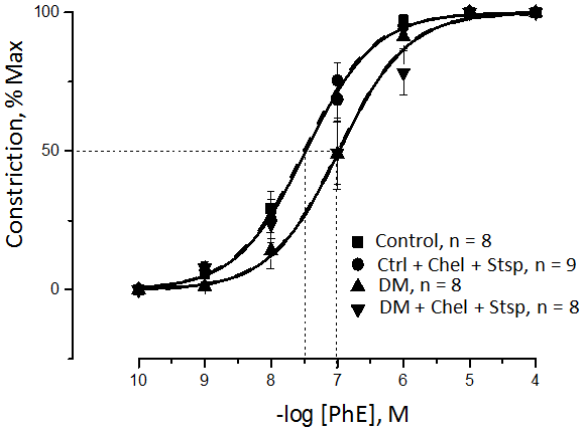


Fig. 4. Mean data of normalized amplitude of the contractile responses plotted versus phenylephrine (PhE) concentration (0.1 nM – 1 mM) reflecting the changes in sensitivity to PhE in deendothelised (E^-) pulmonary artery from control (Ctrl) and diabetic (DM) rats before and after PKC inhibition with chelerythrine (Chel, 1 μM) and staurosporine (Stsp, 1 μM); vertical dotted lines represent pD_2 value of PhE-induced constriction dose-response curves fitted by equation 1 (see Methods section); it should be noted that dose-response curves for control and DM are superposed;* – P < 0.05

Table 1
Mean pD_2 for PhE-induced constriction dose-response curve in intact (E^+) and deendothelised (E^-) pulmonary artery from control and diabetic (DM) rats in the absence or presence of combined action of chelerythrine (1 μM) and staurosporine (1 μM)

		Control	Control + chelerythrine and staurosporine	DM	DM + chelerythrine and staurosporine
pD_2	E+	7.49 ± 0.19 (n = 16)	8.55 ± 0.49 (n = 8)*	8.02 ± 0.09 (n = 16)*	6.67 ± 0.29 (n = 12)*
	E-	7.55 ± 0.16 (n = 8)	7.77 ± 0.31 (n = 9)#	7.09 ± 0.22 (n = 8)*#	6.99 ± 0.32 (n = 8)

Note: * – P < 0.05 in comparison with pulmonary artery rings from control animals; # – P < 0.05 in comparison between E^+ and E^- pulmonary artery rings.

Discussion

The data obtained clearly indicate that type 1 DM development leads to increase in sensitivity to PhE in rats' pulmonary arteries reflecting enhancement in vascular α_1-adrenoceptor-mediated contractility. However, PKC inhibition in deendothelised vessels from

diabetic animals had no effect on the sensitivity to PhE. It may suggest that mechanisms of pulmonary artery contractility enhancement in DM are associated with activity of PKC in the endothelial cells rather than in vascular SMC. There is a variety of evidence to indicate that sensitivity to α_1-adrenoceptors-mediated stimulation is markedly elevated in STZ-diabetic rats' systemic arteries: tail artery (Kizub et al., 2010), mesenteric artery (White and Carrier, 1990; Mueed et al., 2005; Kizub et al., 2010), and aorta (Xavier et al., 2003) whereas other studies have shown an increase in amplitude of α_1-adrenoceptors-mediated vasoconstriction in these arteries (Abebe and McLeod, 1991; Chow et al., 2001; Lee et al., 2011). Similar results showing enhanced noradrenaline-induced vasoconstriction have been obtained in high glucose concentration in the aorta of OLETF (Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty) rat, an experimental model of insulin-independent DM (Nobe et al., 2003). On the other hand, a few studies have shown that the aortas of STZ-diabetic rats exhibited no changes in sensitivity to PhE (Chang and Stevens, 1992; Kizub et al., 2010).

In contrast to our data, Gurney and coauthors have shown that STZ-induced diabetes significantly blunted the maximum response of rats' conduits, but not resistance pulmonary arteries to PhE, without changes in the sensitivity to PhE. Endothelium-dependent vasodilatation of these vessels was also unaffected in DM (Gurney and Howarth, 2009). Other researchers have demonstrated that in the intrapulmonary arteries of STZ-diabetic rats the concentration-response curve PhE was characterized by an increased maximal response in the diabetic group compared with the control one without changes in pD_2 value. Endothelium-dependent relaxant response was dramatically reduced in pulmonary arteries from diabetic rats (Lopez–Lopez et al., 2008).

Our data indicate that PKC activity is involved in elevated α_1-adrenoceptors-mediated vasoconstriction in the pulmonary arteries of STZ-diabetic rats. It has been shown by us previously that PKC inhibition suppressed elevated sensitivity to PhE in the smooth muscle of the tail artery of STZ-diabetic rats (Kizub et al., 2010). In our present study two potent inhibitors of PKC, chelerythrine and staurosporine were both used to achieve complete inhibition of PKC. Chelerythrine is a specific inhibitor of PKC substrate-binding site (Herbert et al., 1990), whereas staurosporine (or antibiotic AM-2282) is a selective inhibitor of ATP-binding site of PKC (Ishii et al., 1996). We have previously shown that changes in sensitivity of systemic vessels (aorta and tail artery) to α_1-adrenoceptors agonists in PKC inhibition in healthy rats differ. It has been demonstrated that PKC inhibition had no significant effect on the contractile responses to PhE of the tail artery of healthy rats but evoked decrease in sensitivity to PhE in aorta (Kizub et al., 2010). On the other hand, there is evidence that PKC inhibition with other potent PKC inhibitors Ro-318220 and calfostin C in mesenteric arteries of healthy rats had no effect on maximum amplitude of norepinephrine (NE)-evoked contraction but significantly elevated its sensitivity to NE (Mueed et al., 2005).

The role of PKC in enhancement in contractility of the pulmonary artery has not been demonstrated before and is clearly shown in the present study for the first time. It has only been demonstrated previously by Yamada and Yokota (Yamada and Yokota, 1997) that in human pulmonary arteries endothelial cell culture PKC activators stimulated endothelin-1 (ET-1) release, whereas PKC inhibition with staurosporine led to decrease in both basal and stimulated levels of ET-1. These authors have also demonstrated that PKC activators stimulated prostacyclin (or prostaglandin I_2, PGI_2) release (Yamada and Yokota, 1997).

Although it has been shown in systemic vessels (aorta, mesenteric and tail artery) from STZ-diabetic rats that PKC inhibition with chelerythrine had no effect on sensitivity of these arteries to PhE (Kizub et al., 2010), studies on the deendothelised mesenteric artery of diabetic rats have demonstrated that PKC inhibition suppressed elevation in NE-induced contractile response (Mueed et al., 2005). In contrast to this, other authors have shown that PKC inhibition did not affect hyperreactivity to prostaglandin E_2 (PGE_2) in the mesenteric artery of Goto-Kakizaki rats with 2-type DM (Ishida et al., 2012).

Our results showed that PKC inhibition in the deendothelised pulmonary artery from diabetic animals had no effect on sensitivity to PhE. It may allow us to suggest that mechanisms of pulmonary artery contractility enhancement in DM can be associated with activity of PKC in the endothelium. PKC involvement in vascular contractile abnormalities in DM can be mediated by a few mechanisms described. PKC activation in vascular endothelium in DM can result in endothelium-dependent vasodilator dysfunction via inhibition of the pathways associated with nitric oxide (NO) (Ishii et al., 1996; Beckman et al., 2002; Pitocco et al., 2010; Kizub et al., 2014), endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) (Gao et al., 2011), and PGI_2 (Cosentino et al., 2003). Secondly, PKC activation in the endothelium in DM can enhance endothelium-dependent vasoconstriction mediated by ET-1 (Matsumoto et al., 2009), PGE_2 and thromboxane A_2 (TXA_2) (Cosentino et al., 2003). Activation of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidases (NADPH oxidase or Nox) have also been shown to be involved in PKC-mediated endothelial dysfunction in DM via reactive oxygen species (ROS) formation (Gao et al., 2011; Kolluru et al., 2012; Kizub et al., 2014).

NO-associated mechanisms underlying diabetes-associated vascular dysfunction may include decreased endothelial nitric oxide synthase (eNOS) activity and expression (Hirata et al., 1995), uncoupling of eNOS and degradation of NO secondary to enhanced superoxide production (Cosentino et al., 2003; Pitocco et al., 2010), attenuation of NO signaling and decreased NO bioavailability (Matsumoto et al., 2009). In diabetes PKC may affect NO bioavailability not only via intracellular accumulation of ROS (Pitocco et al., 2010) but also by decreasing eNOS activity (Hirata et al., 1995). It is established that dysfunction of eNOS in DM can be associated with its suppression by some PKC isoforms (Hirata et al., 1995; Ishii et al., 1996; Bohlen and Nase, 2001; Mehta et al., 2009). As has been shown in DM, PKC can phosphorylate eNOS (Hirata et al., 1995) on its inhibitory site Thr495 (Fleming et al., 2001) and reduces eNOS phosphorylation on the activating Ser1177 site (Michell et al., 2001) blunting eNOS activity. On the other hand, PKC-mediated inhibition in eNOS activity is linked to the ability of PKC to phosphorylate another inhibitory phosphorylation site Thr497 of eNOS reducing its affinity for calmodulin and, hence, the generation of NO (Matsubara et al., 2003). Alternatively, PKC-dependent reduction in eNOS expression has been shown in retinal (Suzuma et al., 2002) and aortic (Hink et al., 2001) endothelial cells in diabetes. Decreased eNOS expression in diabetes can occur through PKC-mediated activation of vascular Nox by inducing ROS-dependent scavenging and reducing NO level (Inoguchi et al., 2000).

EDHF also can be involved in endothelial dysfunction development in DM. It has been established that EDHF-type vasorelaxation is impaired in DM (Matsumoto et al., 2006; Gao et al., 2011; Leo et al., 2011). The relaxant pathway associated with SMCs hyperpolarization is thought to be independent of NO and prostacyclin production by the endothelial cells and has been attributed to the release of EDHF (Feletou and Vanhoutte, 2010). The identity of EDHF remains controversial, but rather than a true chemical mediator of endothelium-dependent hyperpolarization, there is considerable support for the view that EDHF reflects a hyperpolarization signal that is mediated from endothelial cells to vascular SMCs via myoendothelial gap junctions (MEGJs) (Matsumoto et al., 2006; Figueroa and Duling, 2009; Feletou and Vanhoutte, 2010). Direct communication within and between endothelial cells and SMCs through gap junctions (GJs) is an important modulator of vascular tone and essential in the control and coordination of vascular function (Figueroa and Duling, 2009; Feletou and Vanhoutte, 2010). The vascular GJs are composed of intercellular channels clusters allowing the direct passage of electrical current and small signaling molecules between adjacent cells (Figueroa and Duling, 2009). In vascular tissues GJs consist of connexin proteins (Cx37, Cx40, Cx43 and Cx45) (Brisset et al., 2009).

Connexin phosphorylation is highly sensitive to glucose concentration through the regulation via PKC dependent signaling pathway (Lin and Takemoto, 2005). It has been demonstrated that diabetes affects MEGJs function in resistance arteries (Lin and Takemoto, 2005; Georgescu et al., 2006). Endothelial Cx37 and Cx40 protein expression levels and endothelial GJs consisting of these connexins have been reported to be reduced in different vascular regions of STZ-induced type 1 diabetic mice (Hou et al., 2008; Makino et al., 2008). A few studies have reported that exposure to high glucose results in a down-regulation of Cx43 in vascular endothelial cells (Sato et al., 2002; Chen et al., 2008; Li and Roy, 2009).

Inoguchi and coauthors have reported in bovine aortic endothelial cells, that hyperglycemia inhibited gap junctional intercellular communication via PKC (Inoguchi et al., 1995; Inoguchi et al., 2001). Similar results have been demonstrated in retinal microvessels of rats with STZ-induced diabetes (Oku et al., 2001). It has been also demonstrated that high glucose levels, via PKC-mediated phosphorylation of Cx43, can reduce gap junctional intercellular communication activity in bovine aortic SMCs (Kuroki et al., 1998).

Diabetes and hyperglycemia may induce an increase in expression end secretion of ET-1 in vascular tissues as well (Kalani, 2008). Investigation of ET-1 in the development of abnormal retinal hemodynamics in DM showed that overexpression of ET-1 is associated with PKC activation, presumably PKC-β_2 and PKC-δ isoforms (Park et al., 2000). It has been also reported that increase in contraction in response to ET-1 in the aorta and coronary arteries of rats is associated with augmented PKC activation in type 1 DM (Hattori et al., 1999; Tickerhoof et al., 2003).

Cyclooxygenases (COX)-derived prostanoids, which are arachidonic acid metabolites, also can play a significant role in diabetic vascular complications and have been implicated in hyperglycemia-induced endothelial dysfunction (Cosentino et al., 2003; Aljofan and Ding, 2010; Ishida et al., 2012). As has been shown in human aortic endothelial cells, hyperglycemia causes PKC-dependent increase in expression of inducible COX-2 isoform associated with an increase in TXA_2 and a reduction of PGI_2 release (Cosentino et al., 2003). In this mechanism glucose-induced activation of PKC may result in eNOS-dependent formation of peroxynitrite and tyrosine nitration and inactivation of PGI_2 synthase (PGIS) (Cosentino et al., 2003). Production of vasoactive eicosanoid PGE_2 can be also increased in diabetic vessels (Xia et al., 1996).

Conclusions

The present study shows that type 1 DM leads to increase in sensitivity to PhE in the pulmonary artery of rats reflecting enhancement in vascular α_1-adrenoceptor-mediated contractility and that mechanisms of such enhancement in DM are associated with activity of PKC in the endothelium rather than in vascular SMCs. These mechanisms and the role of endothelium-mediated signaling in this process remain to be investigated in future studies.

References

Abebe, W., & McLeod, K. M. (1991). Enhanced arterial contractility to noradrenaline in diabetic rats is associated with increased phosphoinositide metabolism. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, 49, 355–361.

Aljofan, M., & Ding, H. (2010). High glucose increases expression of cyclooxygenase-2, increases oxidative stress and decreases the generation of nitric oxide in mouse microvessel endothelial cells. Journal of Cellular Physiology, 222, 669–675.

Beckman, J. A., Goldfine, A. B., Gordon, M. B., Garrett, L. A., & Creager, M. A. (2002). Inhibition of protein kinase C beta prevents impaired endothelium-dependent vasodilation caused by hyperglycemia in humans. Circulation Research, 90, 107–111.

Bohlen, H. G., & Nase, G. P. (2001). Arteriolar nitric oxide concentration is decreased during hyperglycemia-induced betaII PKC activation. American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology, 280, H621–627.

Boussageon, R., Bejan-Angoulvant, T., Saadatian-Elahi, M., Lafont, S., Bergeonneau, C., Kassai, B., Erpeldinger, S., Wright, J. M., Gueyffier, F., & Cornu, C. (2011). Effect of intensive glucose lowering treatment on all cause mortality, cardiovascular death, and microvascular events in type 2 diabetes: Meta-analysis of randomised controlled trials. British Medical Journal, 343, d4169.

Brisset, A. C., Isakson, B. E., & Kwak, B. R. (2009). Connexins in vascular physiology and pathology. Antioxidants and Redox Signaling, 11, 267–282.

Chang, K. S. K., & Stevens, W. C. (1992). Endothelium-dependent increase in vascular sensitivity to phenylephrine in long-term streptozotocin diabetic rat aorta. British Journal of Pharmacology, 107, 983–990.

Chen, W. G., Zhu, X. F., Hou, J. Q., Pu, J. X., & Yan, C. Y. (2008). Expressions of eNOS and connexin 43 in the penile tissue of rats with diabetic erectile dysfunction. Zhonghua Nan Ke Xue, 14, 427–430.

Chow, W. L., Zhang, L., & MacLeod, K. M. (2001). Noradrenaline-induced changes in intracellular Ca^{2+} and tension in mesenteric arteries from diabetic rats. British Journal of Pharmacology, 134, 179–187.

Clarke, M., & Dodson, P. M. (2007). PKC inhibition and diabetic microvascular complications. Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism, 21, 573–586.

Cosentino, F., Eto, M., De Paolis, P., van der Loo, B., Bachschmid, M., Ullrich, V., Kouroedov, A., Delli Gatti, C., Joch, H., Volpe, M., & Lüscher, T. F. (2003). High glucose causes upregulation of cyclooxygenase-2 and alters prostanoid profile in human endothelial cells: role of protein kinase C and reactive oxygen species. Circulation, 107, 1017–1023.

Cosentino-Gomes, D., Rocco-Machado, N., & Meyer-Fernandes, J. R. (2012). Cell signaling through protein kinase C oxidation and activation. International Journal of Molecular Sciences, 13, 10697–10721.

Cosson, E., Pham, I., Valensi, P., Pariès, J., Attali, J. R., & Nitenberg, A. (2006). Impaired coronary endothelium-dependent vasodilation is associated with microalbuminuria in patients with type 2 diabetes and angiographically normal coronary arteries. Diabetes Care, 29, 107–112.

Feletou, M., & Vanhoutte, P. (2010). Endothelium-derived hyperpolarising factors and associated pathways: a synopsis. Pflügers Archiv – European Journal of Physiology, 459, 863–879.

Figueroa, X. F., & Duling, B. R. (2009). Gap junctions in the control of vascular function. Antioxidants and Redox Signaling, 11, 251–266.

Fleming, I., Fisslthaler, B., Dimmeler, S., Kemp, B. E., & Busse, R. (2001). Phosphorylation of Thr495 regulates Ca^{2+}/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity. Circulation Research, 88, E68–75.

Funk, S. D., Yurdagul, Jr. A., & Orr, A. W. (2012). Hyperglycemia and endothelial dysfunction in atherosclerosis: Lessons from type 1 diabetes. International Journal of Vascular Medicine, 2012, 1–19.

Gao, X., Martinez-Lemus, L. A., & Zhang, C. (2011). Endothelium-derived hyperpolarizing factor and diabetes. World Journal of Cardiology, 3, 25–31.

Georgescu, A., Alexandru, N., Constantinescu, E., & Popov, D. (2006). Effect of gap junction uncoupler heptanol on resistance arteries reactivity in experimental models of diabetes, hyperlipemia and hyperlipemia-diabetes. Vascular Pharmacology, 44, 513–518.

Geraldes, P., & King, G. L. (2010). Activation of protein kinase C isoforms and its impact on diabetic complications. Circulation Research, 106, 1319–1331.

Gurney, A. M., & Howarth, F. C. (2009). Effects of streptozotocin-induced diabetes on the pharmacology of rat conduit and resistance intrapulmonary arteries. Cardiovascular Diabetology, 8, 1–10.

Hattori, Y., Kawasaki, H., & Kanno, M. (1999). Increased contractile responses to endothelin-1 and U46619 via a protein kinase C-mediated nifedipine-sensitive pathway in diabetic rat aorta. Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology, 104, 73–80.

Herbert, M., Augereau, J. M., Gleye, J., & Maffrand, J. P. (1990). Chelerythrine is a potent and specific inhibitor of protein kinase C. Biochemical and Biophysical Research Communications, 172, 993–999.

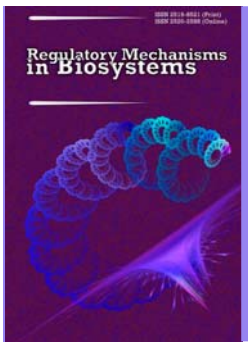
Hink, U., Li, H., Mollnau, H., Oelze, M., Matheis, E., Hartmann, M., Skatchkov, M., Thaiss, F., Stahl, R. A., Warnholtz, A., Meinertz, T., Griendling, K., Harrison, D. G., Forstermann, U., & Munzel, T. (2001). Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. Circulation Research, 88, E14–22.

Hirata, K., Kuroda, R., Sakoda, T., Katayama, M., Inoue, N., Suematsu, M., Kawashima, S., & Yokoyama, M. (1995). Inhibition of endothelial nitric oxide synthase activity by protein kinase C. Hypertension, 25, 180–185.

Hou, C. J., Tsai, C. H., Su, C. H., Wu, Y. J., Chen, S. J., Chiu, J. J., Shiao, M. S., & Yeh, H. I. (2008). Diabetes reduces aortic endothelial gap junctions in ApoE-deficient mice: simvastatin exacerbates the reduction. Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 56, 745–752.

Inoguchi, T., Li, P., Umeda, F., Yu, H. Y., Kakimoto, M., Imamura, M., Aoki, T., Etoh, T., Hashimoto, T., Naruse, M., Sano, H., Utsumi, H., & Nawata, H. (2000). High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen

species production through protein kinase C-dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. Diabetes, 49, 1939–1945.
Inoguchi, T., Ueda, F., Umeda, F., Yamashita, T., & Nawata, H. (1995). Inhibition of intercellular communication via gap junction in cultured aortic endothelial cells by elevated glucose and phorbol ester. Biochemical and Biophysical Research Communications, 208, 492–497.
Inoguchi, T., Yu, H. Y., Imamura, M., Kakimoto, M., Kuroki, T., Maruyama, T., & Nawata, H. (2001). Altered gap junction activity in cardiovascular tissues of diabetes. Medical Electron Microscopy, 34, 86–91.
Ishida, K., Matsumoto, T., Taguchi, K., Kamata, K., & Kobayashi, T. (2012). Protein kinase C delta contributes to increase in EP_3 agonist-induced contraction in mesenteric arteries from type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. European Journal of Physiology, 463, 593–602.
Ishii, H., Jirousek, M. R., Koya, D., Takagi, C., Xia, P., Clermont, A., Bursell, S. E., Kern, T. S., Ballas, L. M., Heath, W. F., Stramm, L. E., Feener, E. P., & King, G. L. (1996). Amelioration of vascular dysfunctions in diabetic rats by an oral PKC β inhibitor. Science, 272, 728–731.
Kalani, M. (2008). The importance of endothelin-1 for microvascular dysfunction in diabetes. Vascular Health and Risk Management, 4, 1061–1068.
Kizub, I. V., Klymenko, K. I., & Soloviev, A. I. (2014). Protein kinase C in enhanced vascular tone in diabetes mellitus. International Journal of Cardiology, 174, 230–242.
Kizub, I. V., Pavlova, O. O., Johnson, C. D., Soloviev, A. I., & Zholos, A. V. (2010). Rho kinase and protein kinase C involvement in vascular smooth muscle myofilament calcium sensitization in arteries from diabetic rats. British Journal of Pharmacology, 159, 1724–1731.
Klymenko, K. I., Novokhatska, T. V., Kizub, I. V., Parshikov, A. V., Dosenko, V. E., & Soloviev, A. I. (2014). PKC-δ isozyme gene silencing restores vascular function in diabetic rat. Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology, 27, 1–9.
Kolluru, G. K., Bir, S. C., & Kevil, C. G. (2012). Endothelial dysfunction and diabetes: Effects on angiogenesis, vascular remodeling, and wound healing. International Journal of Vascular Medicine., 2012, 1–30.
Kuroki, T., Inoguchi, T., Umeda, F., Ueda, F., & Nawata, H. (1998). High glucose induces alteration of gap junction permeability and phosphorylation of connexin-43 in cultured aortic smooth muscle cells. Diabetes, 47, 931–963.
Lee, J.-H., Bahk, J.-H., Park, S.-H., & Huh, J. (2011). The diabetes-induced functional and distributional changes of the alpha 1-adrenoceptor of the abdominal aorta and distal mesenteric artery from streptozotocin-induced diabetic rats. Korean Journal of Anesthesiology, 60, 272–281.
Leo, C. H., Hart, J. L., & Woodman, O. L. (2011). Impairment of both nitric oxide mediated and EDHF-type relaxation in small mesenteric arteries from rats with streptozotocininduced diabetes. British Journal of Pharmacology, 162, 365–377.
Li, A. F., & Roy, S. (2009). High glucose-induced downregulation of connexin 43 expression promotes apoptosis in microvascular endothelial cells. Investigative Ophthalmology and Visual Science, 50, 1400–1407.
Lin, D., & Takemoto, D. J. (2005). Oxidative activation of protein kinase Cgamma through the C_1 domain: Effects on gap junctions. Journal of Biological Chemistry, 280, 13682–13693.
Lopez–Lopez, J. G., Moral-Sanz, J., Frazziano, G., Gomez-Villalobos, M. J., Flores-Hernandez, J., Monjaraz, E., Cogolludo, A., & Perez-Vizcaino, F. (2008). Diabetes induces pulmonary artery endothelial dysfunction by NADPH oxidase induction. American journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular, 295, L727–L732.
Madonna, R., & De Caterina, R. (2011). Cellular and molecular mechanisms of vascular injury in diabetes – part I: Pathways of vascular disease in diabetes. Vascular Pharmacology, 54, 68–74.
Makino, A., Platoshyn, O., Suarez, J., Yuan, J. X., & Dillmann, W. H. (2008). Downregulation of connexin40 is associated with coronary endothelial cell dysfunction in streptozotocin-induced diabetic mice. American Journal of Physiology. Cell Physiology, 295, C221–C230.
Matsubara, M., Hayashi, N., Jing, T., & Titani, K. (2003). Regulation of endothelial nitric oxide synthase by protein kinase C. Journal of Biochemistry, 133, 773–781.
Matsumoto, T., Ishida, K., Nakayama, N., Kobayashi, T., & Kamata, K. (2009). Involvement of NO and MEK/ERK pathway in enhancement of endothelin-1-induced mesenteric artery contraction in later-stage type 2 diabetic Goto-Kakizaki rat. American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology, 296, H1388–1397.
Matsumoto, T., Kobayashi, T., & Kamata, K. (2006). Mechanisms underlying the impaired EDHF type relaxation response in mesenteric arteries from Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats. European Journal of Pharmacology, 538, 132–140.
Mehta, N. N., Sheetz, M., Price, K., Comiskey, L., Amrutia, S., Iqbal, N., Mohler, E. R., & Reilly, M. P. (2009). Selective PKC beta inhibition with ruboxistaurin and endothelial function in type-2 diabetes mellitus. Cardiovascular Drugs and Therapy, 23, 17–24.
Michell, B. J., Chen, Z. P., Tiganis, T., Stapleton, D., Katsis, F., Power, D. A., Sim, A. T., & Kemp, B. E. (2001). Coordinated control of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation by protein kinase C and the cAMP-dependent protein pinase. Journal of Biological Chemistry, 276, 17625–17658.
Mueed, I., Zhang, L., & MacLeod, K. M. (2005). Role of the PKC/CPI-17 pathway in enhanced contractile responses of mesenteric arteries from diabetic rats to a-adrenoceptor stimulation. British Journal of Pharmacology, 146, 972–982.
Nobe, K., Sakai, Y., Nobe, H., & Momose, K. (2003). Dysfunction of aorta involves different patterns of intracellular signalingpathways in diabetic rats. European Journal of Pharmacology, 471, 195–204.
Oku, H., Kodama, T., Sakagami, K., & Puro, D. G. (2001). Diabetes-induced disruption of gap junction pathways within the retinal microvasculature. Investigative Ophthalmology and Visual Science, 42, 1915–1920.
Park, J. Y., Takahara, N., Gabriele, A., Chou, E., Naruse, K., Suzuma, K., Yamauchi, T., Ha, S. W., Meier, M., Rhodes, C. J., & King, G. L. (2000). Induction of endothelin-1 expression by glucose: An effect of protein kinase C activation. Diabetes, 49, 1239–1248.
Pitocco, D., Zaccardi, F., Di Stasio, E., Romitelli, F., Santini, S. A., Zuppi, C., & Ghirlanda, G. (2010). Oxidative stress, nitric oxide, and diabetes. Review of Diabetic Studies, 7, 15–25.
Ramana, K. V., Friedrich, B., Tammali, R., West, M. B., Bhatnagar, A., & Srivastava, S. K. (2005), Requirement of aldose reductase for the hyperglycemic activation of protein kinase C and formation of diacylglycerol in vascular smooth muscle cells. Diabetes, 54, 818–829.
Sato, T., Haimovici, R., Kao, R., Li, A. F., & Roy, S. (2002). Downregulation of connexin 43 expression by high glucose reduces gap junction activity in microvascular endothelial cells. Diabetes, 51, 1565–1571.
Somlyo, A. P., & Somlyo, A. V. (2003). Ca^{2+} sensitivity of smooth muscleand nonmuscle myosin II: Modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. Physiological Reviews, 83, 1325–1358.
Suzuma, K., Takahara, N., Suzuma, I., Isshiki, K., Ueki, K., Leitges, M., Aiello, L. P., & King, G. L. (2002). Characterization of protein kinase C beta isoform's action on retinoblastoma protein phosphorylation, vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell proliferation, and retinal neovascularization. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 99, 721–726.
Tickerhoof, M. M., Farrell, P. A., & Korzick, D. H. (2003). Alterations in rat coronary vasoreactivity and vascular protein kinase C isoforms in Type 1 diabetes. American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology, 285, H2694–703.
White, R. E., & Carrier, G. O. (1990). Vascular contraction induced by activation of membrane calcium ion channels is enhanced in streptozotocin-diabetes. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 253, 1057–1062.
Whiteley, L., Padmanabhan, S., Hole, D., & Isles, C. (2005). Should diabetes be considered a coronary heart disease risk equivalent? Results from 25 years of follow-up in the Renfrew and Paisley survey. Diabetes Care, 28, 1588–1593.
Xavier, F. E., Davel, A. P. C., Rossoni, L. V., & Vassallo, D. V. (2003). Time-dependent hyperreactivity to phenylephrine in aorta from untreated diabetic rats: Role of prostanoids and calcium mobilization. Vascular Pharmacology, 40, 67–76.
Xia, P., Aiello, L. P., Ishii, H., Jiang, Z. Y., Park, D. J., Robinson, G. S., Takagi, H., Newsome, W. P., Jirousek, M. R., & King, G. L. (1996). Characterization of vascular endothelial growth factor's effect on the activation of protein kinase C, its isoforms, and endothelial cell growth. Journal of Clinical Investigation, 98, 2018–2026.
Yamada, Y., & Yokota, M. (1997). Effects of protein kinase C activation and inhibition on endothelin-1 release from human aortic and pulmonary artery endothelial cells comparison with effects on bovine endothelin-1 and human prostaglandin I_2 release. American Journal of Hypertension, 10, 32–42.
Zimmet, P. Z. (2011). The growing pandemic of type 2 diabetes: A crucial need for prevention and improved detection. Medicographia, 33, 15–21.



Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(2), 293–298
doi: 10.15421/021746

The influence of a mineral-vitamin premix on the metabolism of pregnant horses with microelemetosis

A. G. Shcherbatyy*, L. G. Slivinska*, B. V. Gutyj*, V. I. Golovakha**, A. V. Piddubnyak**, V. L. Fedorovuch*

*Lviv National University of Veterinary Medicine and Biological Technologies named after S Z Gjyzky, Lviv, Ukraine
**Bila Tserkva Agricultural University, Bila Tserkva, Ukraine

Article info

Received 29.03.2017
Received in revised form 22.04.2017
Accepted 25.04.2017

Stepan Gzhytskyi National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies Lviv, Pekarska Str., 50, Lviv, 79010, Ukraine.

Bila Tserkva National Agricultural University, Soborna sq., 8/1, Bila Tserkva, 09100, Ukraine. Tel.: +38-068-136-20-54 E-mail: bvh@ukr.net

Shcherbatyy, A. G., Slivinska, L. G., Gutyj, B. V., Golovakha, V. I., Piddubnyak, A. V., & Fedorovuch, V. L. (2017). The influence of a mineral-vitamin premix on the metabolism of pregnant horses with microelemetosis. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(2), 293–398. doi:10.15421/021746

The article presents data on research into the influence of a mineral-vitamin premix on the clinical condition, erythropoiesis and the metabolism (macro- and micro-elemental, vitaminic, proteinaceous, enzymic) of Hucul breed mares in the last trimester of pregnancy. The Marmix premix contains: vitamins – A, D_3, E, B_1, B_2, B_{12}, pantothenic and ascorbic acids, niacin, biotin; nonorganic compounds of microelements – sulphate of cobalt, copper, zinc, iron, manganese; potassium iodide, sodium selenite; amino acids – lysine, threonine, methionine.The usage of the mineral-vitaminic premix Marmix on pregnant mares during 60 days causes recovery of clinical status, erythropoiesis, raises the level of the cobalt (by 45.9%) and copper (by 2.15 times), normalizes the calcium-phosphorus ratio, raises the phosphorus level in the blood (by 17.7%), raises vitamin A (by 2.5 times) and tocopherol (by 2.02 times), total protein (by 27.7%), decreases the level of urea (by 42.2%), activity of AspAT [aspartate transaminase or aspartate aminotransferase] (by 42.9%) and AlAT [alanine transaminase] (by 44.9%) and alkaline phosphatase (by 43.7%). The research conducted contributes to improvements in the study of the pathogenesis of microelementosis of mares and develops an efficient way of treating and preventing the development of microelementosis among these animals.

Keywords: mares; blood; premix; erythropoiesis; cobalt; copper; retinol; tocopherol; calcium; phosphorus

Introduction

Hucul horses should no doubt be considered as one of the national treasures of Ukraine (Stefurak, 2004; Golovach et al., 2005). The Hucul horse is a true mountain breed. These animals are often used for work in forests, and also for riding and carrying loads via mountain paths, for this relatively small horse is strong, resistant to diseases and can live outdoors all year long. It is indispensable in mountains because it is highly resilient and can maintain high speed on the slopes and dangerous mountain paths. Hucul horses are especially significant for the development of the ecological tourism industry, and are gaining high popularity (Vysochans'ka, 2010).

The unique work and biological capacities of the horse allow its efficient usage in different ways for enterprises of all forms of property. Also, because of its calm temper and behaviour, good physical capacities, this horse is used for riding, equestrian sports, tourism and hippotherapy (a form of treatment which uses horses) in many countries of Europe (Clarke et al., 1987; Barton et al., 2003; Stefurak, 2004; Fielding et al., 2009).

Horses' diseases have been recently studied in Ukraine by a number of scholars (Golovaha, 2004; Piddubnjak and Golovaha, 2008; Bayeva and Zhegunov, 2016), but the holocoenotic pathologies of horses have been given too little consideration.

The biogeochemical province of Zakarpattia is characterized by specific peculiarities the significant microelements it contains. Certain elements are in poor supply, and the consequences this lack, which are often observed in different districts of Carpathians, require additional study (Rud'ko and Macijevs'ka, 2009). Therefore complex studies, which are based on determining the content of microelements in soil, fodder and the blood of animals, research on hematopoiesis and the condition of metabolism, and on efficient ways of correcting the disorders found are of scientific-practical significance.

Pregnancy is a physiological condition of the mare's organism, which is characterized by the connection of the organism of mother and fetus, and providing the latter with growth and development. During pregnancy, mares are highly sensitive to changes in feeding, conditions of their maintenance and their treatment, for their organisms are affected by certain changes in all metabolic chains. This is especially significant for mares in the final months of pregnancy, which are characterized by intense usage of mineral, energy metabolism and anabolism of the mother's organism for the development of body tissues of the fetus (Anderson, 1975; Wingfield, 1984; Barrelet and Ricketts, 2002; Takasu et al., 2013; Bazzano et al., 2014; Kryvda, 2016; Tkachev et al., 2016).

Soils and water resources in Zakarpattia oblast lack mobile forms of cobalt, zinc, and by lack of copper and manganese in some places (Shherbatyj et al., 2013). Lack of macro- and microelements in soil, fodder and water is a significant etiological factor of microelementosis of horses (Hinchcliff et al., 2002; Bishop, 2004; Lacerda et al., 2006; Gerber et al., 2014; Lucenko and Petrushko, 2015). For pregnant horses this is especially significant, for the last trimester involves intense development of 60–65% of body tissues of the fetus. At the same time, mares' need for nutritively and biologically active substances rises by 20%, and by 40–50% during the winter-spring period.

Biologically active substances used for prevention and treatment of a number of animal diseases are especially significant

for development of livestock (Martyshuk et al., 2016; Khariv and Gutyj, 2016; Khariv et al., 2016). So called mixed fodder and premixes are widely used for these purposes.

Usage of premixes is relevant and contributes to efficient treatment and prevention of pathologies of mineral metabolism of pregnant mares.

The aim of this research was to develop, test and justify a method of correcting microelemental weakness of pregnant Hucul horses through the experiments.

Materials and methods

The research was conducted at the scientific and production association "Plemkonezentr" (Zakarpattia oblast). As material, the research used pregnant Hucul horses aged between 4–18 years, and 400–450 kg in body mass. The research objects were blood and serum. All mares were kept in the same conditions of maintenance and feeding. While conducting research, we abided the rules necessary for zootechnical experiments on selection and maintenance of analogues-animals in groups, for technology of preparation, usage and account of food consumption. On the basis of the research conducted we developed the compound of mineral-vitamin premix MVP (mineral-vitamin premix) Marmix (Shherbatyj and Slivinska 2013), and experimentally proved its treatment and prevention efficiency.

For this purpose, we formed two groups of mares – experimental and control group, 10 animals in each group, which were in the 9th month of pregnancy. Research on the efficiency of MVP Marmix on pregnant horses was conducted in comparison with indicators of pregnant horses with manifestations of disorders of mineral metabolism, which received a basic diet (control group), which includes (kg): hay from cultivated hayfields – 2.5, high mountain hay – 2, meadow hay – 2.5, wheat middlings – 0.5, corn middlings – 1, oat seeds – 1, press cake of sunflower – 0.5, dried, granular beet pulp – 1. Each horse consumed about 30.3 ± 0.21 l of water a day, obtained from an Artesian well.

The mares of the experimental group, apart from the basic diet (BD) received MVP Marmix ("EGO" enterprise product) at the time of morning feeding, the amount calculated at 100 g a day over 60 days. One kilogram of the premix includes: vitamin A – 250,000 ME, D_3 – 25,000 ME, E – 6,000 mg, B_1 – 400, B_2 – 300, pantothenic acid – 300, niacin – 700, biotin – 175, ascorbic acid – 600; mineral substances: zinc – 750 mg, iron – 1100, copper – 180, manganese – 1200, iodine – 7,5, selenium – 2.5, cobalt – 25 mg; amino acids: lysin – 1.5%, threonine – 0.75%, methionine – 1.0%, filling agent (wheat middling – up to 1 kg). During the experiment, the animals were clinically observed. Blood samples were taken from the jugular vein before the experiment, and also 45 and 60 days after feeding with the premix.

Clinical study of the mares was conducted according to generally accepted methods (Levchenko et al., 2010).

General clinical analysis of blood included the calculation of erythrocytes and leukocytes (in the haemocytometer with grid), of hematocrit – by microcentrifuge (by Shkliar), content of hemoglobin – using the hemiglobincyanide method, ESR – according to T. P. Panchenko. Using the results, we calculated the average volume of erythrocytes (MCV) and the content of hemoglobin in a single erythrocyte (MCH) (Levchenko et al., 2010).

The content of copper and cobalt in the blood serum of the mares was defined by the method of atomic absorption spectroscopy using AAS-30.

The protein-synthesizing function of the liver was determined according to the level of total protein (biuret reaction) in the blood serum, enzymic function – according to the activity of aspartate (AST) and alanine (ALT) aminotransferase, using the method of Frankel (Reitman and Frankel, 1957), α-amylase (method of Caraway, 1986), alkaline phosphate (AP) – by the reaction of disodium phenyl phosphate hydrolysis (Levchenko et al., 2010). We determined the concentration of glucose in the blood plasma through o-toluidine, urea – through Diacetyl monoxime, creatinine – by Jaffe colorimetric reaction (Levchenko et al., 2010). The content of non-organic phosphorus in the blood serum was determined using the method of Dyce and Bessman, 1973, and total calcium was determined by calcium arsenazo-III (Levchenko et al., 2010).

The content of vitamins A and E in the blood serum was studied using liquid chromatograph Milichrom-5.

All manipulations with the animals were conducted in accordance with the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasburg, 1986). Mathematical analysis was made in Statistica 6.0 (StatSoft Inc., USA). Differences between the average values were considered statistically significant at $P < 0.05$ (ANOVA).

Results and discussion

In the experimental and control groups, on the 60th day of the experiment, we observed manifestations of positive changes in the condition of pelage (restoration of luster, absence of depigmentation, uniformity of moult), of visible mucous membranes, heart tones, digestive system, indicators of haematopoiesis, metabolism of macro- and microelements, lipid peroxidation, functional condition of the liver and kidneys.

The study of erythropoiesis indicators showed no positive changes in the control group of mares: the number of erythrocytes did not change, and the content of hemoglobin decreased ($P < 0.05$). The mares of the experimental group had opposite results (Table 1).

Table 1
The influence of Marmix premix on hematologic indicators of pregnant during the experiment (x ± SE)

Indicator	Groups					
	control (n = 10)			experimental (n = 10)		
	beginning of the experiment	45th day	60th day	beginning of the experiment	45th day	60th day
Erythrocytes, T/l	5.7 ± 0.32	5.9 ± 0.16	5.3 ± 0.17	5.8 ± 0.10	7.1 ± 0.13 $P_2 < 0.001$ $P < 0.001$	7.3 ± 0.11 $P_2 < 0.001$ $P_3 < 0.001$
Hemoglobin, g/l	91.6 ± 2.26	84.2 ± 2.02 $P_5 < 0.05$	83.4 ± 1.78 $P_4 < 0.05$	90.7 ± 0.40	115.1 ± 2.48 $P < 0.001$	122.0 ± 1.95 $P_1 < 0.05$ $P_2 < 0.001$ $P_3 < 0.001$
The content of hemoglobin in one erythrocyte (*MCH*), pg	15.8 ± 0,48	14.1 ± 0.35 $P_5 < 0.05$	15.5 ± 0.45	16.1 ± 0.31	16.0 ± 0.52	16.5 ± 0.26

Note: P – 45th day compared to the beginning of experiment; P_1 – 60th day compared to 45th day in the experimental group; P_2 – 60th day in the experimental group compared to 60th day in control group; P_3 – 60th day compared to the beginning of the experiment; P_4 – 60th day compared to the first day in the control group; P_5 – 45th day compared to the first day in the control group; in other cases, the difference was insignificant.

The number of erythrocytes at the beginning of the experiment was on average 5.8 ± 0.10 T/l, which is below norm (6.0–9.0 T/l). By the 45th day, the number of erythrocytes had significantly ($P < 0.001$) increased by 22.0% (7.1 ± 0.13 T/l), after the experiment – by 25.4% ($P < 0.001$) compared to the beginning of the experiment and by 11.7% and 37.0% ($P < 0.001$) on 45th and 60th days compared to mares of the control group.

Along with the growing number of erythrocytes, the blood of mares from the experimental group had an increasing content of hemoglobin compared to the beginning of the experiment and control group. The content of the animals' hemoglobin at the beginning of the experiment was at the lower physiological margin and was 94.8 ± 0.40 g/l on average. 10% of mares had the hemoglobin content below the norm. 45 days later, the content of hemoglobin had significantly ($P < 0.001$) increased by 21.5% compared to the beginning of the experiment. After the end of experiment (60 days) the content of hemoglobin on average was 122.0 ± 1.95 g/l, which was 28.7% higher ($P < 0,001$), than at the beginning of the experiment, higher by 5.9% ($P < 0.05$) compared to the

45th day, and 46.1% higher than in the control group ($P < 0.001$). It should be mentioned that there were no significant differences in the number of erythrocytes of mares from the control group compared to the beginning of the experiment, and the content of hemoglobin significantly decreased by 8.9% ($P < 0.05$).

On the 45th and 60th days, the MCH of the animals from the experimental group did not change. By the end of experiment, it had stabilized at the initial level (+2.5%; $P < 0.05$).

Nevertheless, the average content of hemoglobin in a single erythrocyte of mares from the experimental group was slightly higher than in the control group, where it was 10.8% ($P < 0.01$) lower at the 45th day of the experiment compared to the beginning of the experiment, and on the 60th day – lower by 1.9%. The difference of MCH between the mares from the experimental and control groups was 22.0% and 6.5% on 45th ($P < 0.01$) and 60th days of the experiment.

The hematocrit of pregnant mares from the control group remained stable during the experiment; in the experimental group, it gradually increased from 0.32 ± 0.01 to 0.36 ± 0.05 l/l on the 45th day and 0.40 ± 0.01 on the 60th day ($P < 0.001$), i.e. by 11.1 and 20.0% ($P < 0.001$). The experiment's final indicator was 21.2% higher than in the control group (Table 2).

Table 2
The influence of Marmix premix on the correction of hematologic indicators of pregnant mares during the experiment (x ± SE)

Indicator	Groups					
	control (n = 10)			experimental (n = 10)		
	beginning of the experiment	45th day	60th day	beginning of the experiment	45th day	60th day
Hematocrit, l/l	0.33 ± 0.10	0.34 ± 0.01	0.33 ± 0.01	0.32 ± 0.01	0.36 ± 0.05	0.40 ± 0.01 $P_1 < 0.001$ $P_2 < 0.001$
Average volume of erythrocytes, μm^3	56.9 ± 2.10	56.7 ± 2.90	61.1 ± 26.5 $P_3 < 0.05$	54.2 ± 2.00	55.2 ± 1.24	54.1 ± 1.50
ESR, mm/year	56.4 ± 1.02	56.6 ± 1.18	57.2 ± 0.77	46.4 ± 3.51	60.6 ± 0.64 $P < 0.001$	62.1 ± 0.53 $P_1 < 0.001$ $P_2 < 0.001$

Note: P – 45th day compared to the beginning of experiment in the experimental group; P_1 – 60th day in the experimental group compared to the control group on the 60th day; P_2 – 60th day in the experimental group compared to the beginning of experiment; P_3 – 60th day in the control group compared to the beginning of the experiment.

The increase in hematocrit of mares from the experimental group occurred as a result of increase in the number of erythrocytes, for their average volume (MCV) remained stable. On the 45th and 60th days of the experiment, we observed a significant ($P < 0.001$) increase of ESR by 1.31 and 1.34 times respectively.

The last months of mares' pregnancy is characterized by intense usage of mineral, energy metabolism and anabolism of the mother for forming the body tissues of the fetus (Hunter et al., 2001; Scantlebury et al., 2014). Therefore the study of changes in the indicators of macro- and microelements is especially significant.

45 days after the start of the experiment, the level of calcium showed a tendency to decrease ($P < 0.1$) from 3.31 ± 0.10 to 3.02 ± 0.14 mmol/l, and on 60th day, we observed a significant ($P < 0.001$) decrease in its content by 13.9% compared to the beginning of the experiment, although the difference with the previous study was not significant. The content of calcium in the blood serum of mares from the experimental group was lower than in the control on the 45th and 60th days, by 9.9% and 13.6% respectively (Table 3).

Possible changes in the content of non-organic phosphorus of pregnant mares from the control group were not observed. In contrast, we observed increase in the content of macroelement among mares from the experimental group after usage of premix by 15.9% compared to the initial level, and by 21.7% compared to 45th day.

The content of phosphorus in the blood serum of mares from experimental group on the 60th day was 17.7% higher than in the control group ($P < 0.001$). The calcium-phosphorus ratio on the 45th day on average was 2.53 ± 0.14, by the end of the experiment – 2.06 ± 0.10 and was significantly ($P < 0.05$) lower compared to the 45th day and beginning of experiment ($P < 0.01$), which indicates the metabolism of macroelements.

Table 3
The influence of Marmix premix on the content of macroelements in the blood of pregnant mares during the period of the experiment (x ± SE)

Indicator	Groups					
	control (n = 10)			experimental (n = 10)		
	beginning of the experiment	45th day	60th day	beginning of the experiment	45th day	60th day
Total Ca, mmol/l	3.31 ± 0.07	3.35 ± 0.06	3.31 ± 0.05 $P_3 < 0.001$	3.32 ± 0.10	3.02 ± 0.14	2.86 ± 0.05 $P_2 < 0.001$
Non-organic P, mmol/l	1.22 ± 0.05	1.19 ± 0.05	1.24 ± 0.05 $P_3 < 0.001$	1.26 ± 0.12	1.20 ± 0.04	1.46 ± 0.02 $P_1 < 0.001$
Ratio Ca:P	2.75 ± 0.11	2.85 ± 0.14	2.70 ± 0.09 $P_3 < 0.001$	2.78 ± 0.20	2.53 ± 0.14	2.06 ± 0.10 $P_1 < 0.05$ $P_2 < 0.01$
AP, IU/l	368.2 ± 2.9	337.6 ± 3.1	355.4 ± 2.1 $P_2 < 0.01$ $P_3 < 0.001$	380.3 ± 2.3	228.2 ± 1.7 $P < 0.001$	214.0 ± 2.3 $P_1 < 0.001$ $P_2 < 0.001$

Note: P – 45th day compared to the beginning of experiment in the experimental group; P_1 – 60th day in the experimental group in the experimental group compared with 45th day; P_2 – 60th day compared to the beginning of experiment; P_3 – 60th day of experiment compared to the control group on the 60th day.

An important indicator of the stability of calcium-phosphorus metabolism in the animals' organism is the activity of AP. By the 45th and 60th days of the experiment, the activity of AP had significantly decreased by 40.0% and 43.7% ($P < 0.001$) respectively compared to the beginning of the experiment, and by 32.4% and 39.8% ($P < 0.001$) compared to the control.

Among the microelements in the diet of the pregnant mares which stimulate hematopoesis, those provided in the smallest quantities were manganese, copper and cobalt. Therefore, we conducted analysis of dynamics of Co and Cu under the influence of MVP Marmix.

The content of cobalt had already increased up to 0.48 ± 0.02 µmol/l (by 29.7%) by the 45th day of the experiment compared to its initial value, and by 33.3% compared to the control. Further, the content of cobalt continued to increase and on the 60th day we observed a significantly ($P < 0.001$) higher content of cobalt (by 45.9%) compared to the beginning (Table 4).

Table 4
The influence of Marmix premix on the content of microelements in the blood of pregnant mares during the experiment (x ± SE)

Indicator	Groups					
	control OP (n = 10)			experimental (n = 10)		
	beginning of the experiment	45th day	60th day	beginning of the experiment	45th day	60th day
Co, µmol/l	0.35 ± 0.01	0.36 ± 0.02	0.34 ± 0.02 $P_2 < 0.001$	0.37 ± 0.01	0.48 ± 0.02 $P < 0.001$	0.54 ± 0.03 $P_1 < 0.001$
Cu, µmol/l	2.43 ± 0.34	2.50 ± 0.65	2.65 ± 0.46 $P_2 < 0.001$	2.80 ± 0.50	5.35 ± 0.32 $P < 0.001$	6.01 ± 0.18 $P_1 < 0.001$
Fe, µmol/l	19.3 ± 0.85	21.0 ± 1.29	22.1 ± 1.78	21.6 ± 0.71	24.2 ± 0.80 $P_1 < 0.05$	21.1 ± 1.42

Note: P – 45th day compared to the beginning of experiment in the experimental group; P_1 – 60th day compared to the beginning of experiment; P_2 – 60th day of experiment compared to the control group on 60th day.

Its average content in the blood of animals from the experimental group was 0.54 ± 0.03 µmol/l, which was significantly ($P < 0.001$) higher by 58.8% compared to indicators of mares from the control group. Feeding with MVP caused significant growth in the content of copper in the blood of pregnant mares. On the 45th day of experiment, the

level of copper in mares' blood was higher by 5.35 ± 0.32 μmol/l on average, which was 1.91 times higher ($P < 0.001$) compared to the beginning of experiment, and by 2.14 times compared with the control.

The content of copper continued to increase and at the end of the experiment its level in the blood of mares from the experimental group was 6.01 ± 0.18 μmol/l, which was 114.6% higher compared to its content at the beginning of the experiment, and by 126.8% higher compared to the control. Compared to the 45th day, the content of copper had a tendency to increase by 11.0%.

The increase in the level of cobalt and copper in the organism of pregnant mares caused a positive effect on the indicators of hematopoiesis. The mares' symptoms of anemia disappeared, and the amount of erythrocytes and hemoglobin increased. Cobalt and copper positively influenced the process of hematopoiesis by stabilizing the content of hemoglobin in a single erythrocyte and eliminating anemia.

During all period of the experiment, the content of iron in the blood of pregnant mares from all groups remained within the range of physiological fluctuations (13.0–25.0 μmol/l). By the end of the experiment (60th day), the content of iron stabilized at the level of 21.1 ± 1.42 μmol/l, which is significantly ($P < 0.05$) lower by 12.8% compared to the 45th day. In our opinion, the decrease in the amount of iron by the end of experiment was conditioned by its intense usage during the final term of pregnancy. The amount of iron in blood serum during the experiment was within the norm.

The content of total protein of horses from the experimental group by the 45th day of the experiment had significantly ($P < 0.001$) increased by 19.4%. This positive tendency continued: on the 60th day, protein equaled 73.6 ± 0.86 g/l – 7.0% higher than on day 45,0% and 42.1% higher compared to the control group (Table 5).

Table 5
The influence of MVP Marmix on the indicators of metabolism among pregnant mares (x ± SE)

Indicator	Groups					
	control (n = 10)			experimental (n = 10)		
	beginning of the experiment	45th day	60th day	beginning of the experiment	45th day	60th day
Total protein, g/l	55.2 ± 1.04	51.8 ± 1.20	52.4 ± 1.12 $P_3 < 0.001$	57.6 ± 0.84	68.8 ± 1.55 $P_2 < 0.001$	73.6 ± 0.86 $P < 0.001$ $P_1 < 0.05$
Urea mmol/l	7.6 ± 0.24	7.5 ± 0.20	7.4 ± 0.17 $P_3 < 0.01$	8.1 ± 0.36	6.6 ± 0.31 $P_2 < 0.01$	4.7 ± 0.85 $P < 0.01$ $P_1 < 0.05$
Creatinine, μmol/l	127.2 ± 3.5	133.9 ± 2.7	129.1 ± 1.9 $P_3 < 0.001$	134.1 ± 3.5	128.8 ± 3.9	112.6 ± 2.5 $P < 0.001$ $P_1 < 0.01$
AspAT, IU/l	270.9 ± 2.5	281.3 ± 1.1	273.3 ± 4.6 $P_3 < 0.001$	245.2 ± 3.6	207.6 ± 3.8 $P_2 < 0.001$	140.3 ± 1.8 $P < 0.001$ $P_1 < 0.001$
AlAT, IU/l	17.3 ± 0.74	17.1 ± 0.63	16.8 ± 0.71 $P_3 < 0.001$	18.7 ± 0.88	13.4 ± 0.70 $P_2 < 0.001$	10.3 ± 0.76 $P < 0.001$ $P_1 < 0.01$

Note: P – compared to the beginning of experiment in the experimental group; P_1 – 60th day compared to 45th day in the experimental group; P_2 – 45th day of the experiment compared to the beginning of the experiment; P_3 – the end of the experiment compared to the control group.

The data obtained indicate a great activation of protein metabolism in the organism of mares during pregnancy under the influence of the premix. The usage of MVP Marmix allows the protein metabolism in the organism of pregnant mares to remain at a quite high level, which is necessary for process of broodmares' vital functions, for growth and development of the fetus (Shherbatyj et al., 2013).

The urea content of 100% of mares from the control and experimental groups at the beginning was excessive, and average indicators did not significantly differ. Later in the experiment, it remained stable for mares in the control group, and gradually decreased in the experimental group to 6.6 ± 0.31 mmol/l on the 45th day (–18.5%; $P < 0.01$) and 4.7 ± 0.85 mmol/l – on the 60th day (–42%; $P < 0.01$). The difference with the previous indicator is considered significant at ($P < 0.05$). After the end of the experiment of feeding pregnant mares with the premix, there were no mares with azotemia in the experimental group, whereas in the control group 90% of mares had azotemia. The difference in the content of urea was 36.5% ($P < 0.01$).

In the blood serum of mares from both groups the concentration of creatinine remained within the range of physiological fluctuations (100–160 μmol/l) throughout experiment. However, in the experimental group, we observed a gradual significant decrease in its level and on 60th day, the concentration of creatinine was 112.6 ± 2.5 μmol/l ($P < 0.001$) – lower by 16.0% and 12.8% ($P < 0.001$) than at the beginning of experiment and lower than the indicator in the control group on the 60th day. Therefore, the content of urea and creatinine in the blood serum indicate optimum filtrating function of the kidneys.

An important stage in studying the preparation is the study of changes in the liver. An objective criterion of the condition of hepatocytes, their membranes, is the activity of indicative enzymes, particularly AspAT and AlAT (Lindner and Hatzipanagiotou, 1998; Wood, 2004; Lindner et al., 2009; Adamu et al., 2010; Muñoz et al., 2012). By the 45th day, the activity of AspAT in the experimental group had significantly ($P < 0.001$) decreased by 15.3% and on average was 207.6 ± 3.85 IU/l, and after the end of experiment, it was significantly ($P < 0.001$) lower by 42.9% and 32.4% compared to the beginning and the 45th day, two times ($P < 0.001$) lower compared to the control group. Therefore, the preparation does not cause structural changes in hepatocytes. On the contrary, the activity of AspAT decreases, which indicates the normalizing of structure and function of liver cells. By the 45th and 60th days of the experiment, the activity of another hepato-indicative enzyme AlAT had also significantly ($P < 0.001$) decreased by 28.3% and 44.9% compared to the beginning of the experiment, and by 38.7% ($P < 0.001$) compared to the control group.

A significant element of the antioxidative system is vitamins A and E rather than the enzymic component (Lavryshyn et al., 2016; Gutyj et al., 2016; Padalino et al., 2017). Our research showed that the content of vitamin A in the blood serum of pregnant mares at the beginning of the experiment was 1.64 times lower than the minimum norm, and by the 45th day had significantly ($P < 0.01$) increased by 43.9% compared to the beginning of the experiment, and was on average 0.57 ± 0.07 mmol/l (Table 6). The content of vitamin A recovered among 70% of mares. By the 60th day, the level of retinol had continued to increase and significantly increased by 2.5 ($P < 0.001$) and 2.35 ($P < 0.01$) times compared to the beginning of the experiment and control respectively.

Table 6
The influence of Marmix premix on the content of vitamins A and E in the blood of pregnant mares during the experiment (x ± SE)

Indicator	Groups					
	control (n = 10)			experimental (n = 10)		
	beginning of the experiment	45th day	60th day	beginning of the experiment	45th day	60th day
Vitamin A, μmol/l	0.33 ± 0.18	0.36 ± 0.12	0.34 ± 0.14 $P_3 < 0.01$	0.32 ± 0.02	0.57 ± 0.07 $P < 0.01$	0.80 ± 0.05 $P_1 < 0.05$ $P_2 < 0.001$
Vitamin E, μmol/l	4.48 ± 0.20	4.94 ± 0.45	4.21 ± 0.36 $P_3 < 0.001$	4.70 ± 1.16	9.01 ± 1.02 $P < 0.05$	9.5 ± 1.13 $P_2 < 0.01$

Note: P – 45th day compared to the beginning of the experiment; P_1 – 60th day compared to 45th day in experimental group; P_2 – 60th day compared to the beginning of the experiment; P_3 – 60th day of experiment compared to the control group on 60th day.

Vitamin A was within the norm among all mares. In the control group, the content of retinol in the end of experiment was 0.34 ± 0.14 μmol/l, which is lower than the lower margin of physiological range (0.52 μmol/l) by 34.6%. Along with the level of vitamin A, under the influence of MVP Marmix, the blood serum of experimental mares had an increasing level of tocopherol. Increase ($P < 0.05$) in the content

of vitamin E in the blood of pregnant mares from the experimental group was observed already on the 45th day, and by the 60th day, it had increased by 101.3 ($P < 0.01$) and 124.7% ($P < 0.001$) compared to the beginning of the experiment and the indicator of control group.

The level of tocopherol of all mares on the 60th day of the experiment was within the norm. The average content of tocopherol of mares from the control group throughout the experiment was lower than the norm almost by 1.7 times and on average on the 60th day equaled 4.21 ± 0.36 μmol/l. Thus, usage of MVP Marmix on pregnant mares during 60 days increased the level of vitamins A and E.

The data obtained indicate the positive effect of Marmix preparation on recovery of the A and E vitamin metabolism.

The research conducted indicates that feeding preganant mares on a diet which lacks a balance in the main nutrient substances, decreases digestion of energetic and anabolic material, causes disorders of digestion processes, metabolic processes and causes decrease in blood indicators. The lack microelements in the animals' diet, espessially during the reproduction period, significantly affects pregnancy, birth and the quality of offspring. Negative external factors have a cumulative effect on the biological peculiarities of pregnant animals and, in combination, cause excessive tension in their organism, which leads to a decrease in its anabolic, energetic and immune substances. In these conditions, the organism of the fetus receives less oxygen and nutritive substances per unit of time. This leads to decrease in the qualitative indicators of young animals and weakening of their resistance to diseases.

Screening is a progressive form of veterinary service for horses, allows pathologies of animals at to be diagnosed at subclinical stages of development and efficient treatment and prevention measures to be taken. According to the results of screening, the development and introduction of a complex of organizational and treatment-preventive measures, feeding with Marmix mineral-vitamin premix of Ukrainian production prevents microelemetosis and hypovitaminosis, restores the structure and function of liver and kidneys, vitamin A and E and phosphorus-calcium metabolism of mares from the Plemkonezentr. Marmix premix is a mix of chemical components which are characterized with a certain mechanism of influencing the metabolism. The ratio of components in the preparations is based on their prophylactic doses and osmotic properties. According to their physical and chemical properties, the components of the premix are compatible as synergists.

The research conducted contributes to the study of the pathogenesis of microelementosis among mares in greater detail and to the development of an efficient system of treatment of animals for microelementosis.

Conclusions

For the treatment of pregnant mares under hypocobaltosis and hypocuprosis and for prevention of microelementosis in the biogeochemical province of Zakarpattia, we suggest using Marmix mineral-vitamin premix, which includes vitamins A, D_3, E, B_1, B_2, B_{12}, pantothenic and ascorbic acids, niacin, biotin; non-organic compounds of microelements – sulfates of cobalt, copper, zinc, iron, manganese, potassium iodide, sodium selenite; amino acids – lysine, threonine, methionine.

Using Marmix mineral-vitamin premix on pregnant horses during 60 days causes recovery of clinical status, erythropoiesis, level of cobalt (0.54 ± 0.03 μmol/l) and copper (6,01 ± 0,18 μmol/l), normalizing of the calcium-phosphorus ratio, increase in the phosphorus content in the blood ($P < 0.001$), vitamin A ($P < 0.001$) and tocopherol ($P < 0.001$), total protein ($P < 0.001$), decrease in the content of urea, activity of AspAT, AlAT and alkaline phosphate.

Marmix mineral-vitamin complex should be used as a homogenous mixture with fodder once a day during 60 days in morning feeding with the dose calculated at 100 g per mare, beginning in the 9th month of pregnancy.

References

Adamu, L., Noraniza, M. A., Rasedee, A., & Bashir, A. (2010). Effects of race distance on physical, hematological and biochemical parameters of endurance horses. American Journal of Animal and Veterinary Sciences, 5(4), 244–248.

Anderson, M. G. (1975). The influence of exercise on serum enzyme levels in the horse. Equine Veterinary Journal, 7, 160–165.

Barrelet, A., & Ricketts, S. (2002). Hematology and blood biochemistry in the horse: A guide to interpretation. In Practice, 6, 318–327.

Barton, M., Williamson, L., & Jacks, S. (2003). Body weight, hematologic findings, and serum and plasma biochemical findings of horses competing in a 48-, 83-, or 159-km endurance ride under similar terrain and weather conditions. American Journal of Veterinary Research, 64, 746–753.

Bayeva, T. I., & Zhegunov, G. F. (2016). Vplyv fizychnoho ta emotsiinoho navantazhennia na metabolichnyi profil syrovatky krovi sportyvnykh konei [Influence of physical and emotional activity on the metabolic profile of blood serum of race horses]. Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology, Ecology. 24(2), 484–488 (in Ukrainian).

Bazzano, M., Giannetto, C., Fazio, F., & Bazzano, M. (2014). Metabolic profile of broodmares during late pregnancy and early post-partum. Reproduction in Domestic Animals, 49, 947–953.

Clarke, A. F., Madelin, T. M., & Allpress, R. G. (1987). The relationship of air hygiene in stables to lower airway disease and pharyngeal lymphoid hyperplasia in two groups of Thoroughbred horses. Equine Veterinary Journal, 19(6), 524–530.

Fielding, C. L., Magdesian, K. G., Rhodes, D. M., Meier, C. A., & Higgins, J. C. (2009). Clinical and biochemical abnormalities in endurance horses eliminated from competition for medical complications and requiring emergency medical treatment: 30 cases (2005–2006). Journal of Veterinary Emergency and Critical Care, 19(5), 473–478.

Gerber, V., Tessier, C., & Marti, E. (2014). Genetics of upper and lower airway diseases in the horse. Equine Veterinary Journal, 47(4), 390–397.

Golovach, M. J., Ganynec', P. P., & Golovach, M. M. (2005). Vykorystannja konej gucul's'koi' porody ta i'h pomisej dlja riznyh form gipoterapii' [Use of Hucul purebred and hybrid horses for various forms of hippotherapy]. Sil's'kyj Gospodar, 7–8, 16–18 (in Ukrainian).

Gutyj, B. V., Murs'ka, S. D., Gufrij, D. F., Hariv, I. I., Levkivs'ka, N. D., Nazaruk, N. V., Gajdjuk, M. B., Pryjma, O. B., Bilyk, O. J., & Guta, Z. A. (2016). Vplyv kadmiievoho navantazhennia na systemu antyoksydantnoho zakhystu orhanizmu buhaitsiv [Influence of cadmium loading on the state of the antioxidant system in the organism of bulls]. Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology, Ecology, 24(1), 96–102.

Gutyj, B., Lavryshyn, Y., Binkevych, V., Binkevych, O., Paladischuk, O., Strons'kyj, J., & Hariv, I. (2016). Influence of Metisevit on the activity of enzyme and nonenzyme link of antioxidant protection under the bull's body cadmium loading. Scientific Messenger LNUVMBT named after S. Z. Gzhytskyj, 18(2), 52–58.

Hinchcliff, K. W., Lauderdale, M. A., Dutson, J., Geor, R. J., Lacombe, V. A., & Taylor, L. E. (2002). High intensity exercise conditioning increases accumulated oxygen deficit of horses. Equine Veterinary Journal, 34(1), 9–16.

Hunter, D., De Lange, M., & Snjeder, H. (2001). Genetic contribution to bone metabolism, calcium excretion and vitamin D and parathyroid hormone regulation. Journal of Bone and Mineral Research, 16, 371–378.

Khariv, M. I., & Gutyj, B. V. (2016). Vplyv liposomalnoho preparatu Butaintervit na proteinsyntezuvalnu funktsiiu pechinky shchuriv za otruiennia tetrakhlorметanom [Influence of the liposomal preparation Butaintervite on protein synthesis function in the livers of rats under the influence of carbon tetrachloride poisoning]. Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology, Medicine, 7(2), 123–126 (in Ukrainian).

Khariv, M., Gutyj, B., Butsyak, V., & Khariv, I. (2016). Hematolohichni pokaznyky orhanizmu shchuriv za umov oksydatsiinoho stresu ta za dii liposomalnoho preparatu [Hematological indices of rat organisms under conditions of oxidative stress and liposomal preparation action]. Biological Bulletin of Bogdan Chmelnitskiy Melitopol State Pedagogical University, 6(1), 276–289 (in Ukrainian).

Kryvda, M. (2016). Analiz porushen reproduktsiinoi funktsii kobyl za latentnoho perebihu rynopnevmonii [Analysis of the disorders in reproductive function of mares with latent form of the herpesvirus type-1]. Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies, 18(3), 167–170 (in Ukrainian).

Lacerda, L., Campos, R., & Sperb, M. (2006). Hematologic and biochemical parameters in three high performance horse breeds from southern Brazil. Archives of Veterinary Science, 11, 40–44.

Lavryshyn, Y. Y., Varkholyak, I. S., Martyschuk, T. V., Guta, Z. A., Ivankiv, L. B., Paladischuk, O. R., Murska, S. D., Gutyj, B. V., & Gufriy, D. F. (2016). Biolohichne znachennia systemy antyoksydantnoho zakhystu orhanizmu tvaryn [The biological significance of the antioxidant defense system of animals' organisms]. Scientific Messenger LNUVMBT named after S. Z. Gzhytskyj, 18(2), 100–111 (in Ukrainian).

Lindner, A., & Hatzipanagiotou, A. (1998). Effect of age and of performance parameters on CK, LDH and AST activities in plasma of standardbred horses during exercise. Pferdeheilkunde, 14, 456–460.

Lindner, A., Mosen, H., Kissenbeck, S., Fuhrmann, H., & Sallman, H. P. (2009). Effect of blood lactate-guided conditioning of horses with exercise of differing durations and intensities on heart rate and biochemical parameters. Journal of Animal Science, 87(10), 3211–3217.

Lucenko, M. V., & Petrushko, M. P. (2015). Vplyv fizychnoho navantazhennia na dynamiku pokaznykiv krovi konei riznoho viku [Influence of physical activity on dynamics of blood indices of horses of different ages]. Odesa National University Herald. Biology, 20(1), 178–185 (in Ukrainian).

Martyshuk, T. V., Gutyj, B. V., & Vishchur, O. I. (2016). Riven produktiv perekysnoho okysnennia lipidiv u krovi shchuriv za umov oksydatsiinoho stresu ta za dii liposomalnoho preparatu "Butaselmevit" [Level of lipid peroxidation products in the blood of rats under the influence of oxidative stress and under the action of liposomal preparation of "Butaselmevit"]. Biological Bulletin of Bogdan Chmelnitskiy Melitopol State Pedagogical University, 6(2), 22–27 (in Ukrainian).

Muñoz, A., Riber, C., Trigo, P., & Castejón, F. (2012). Age- and gender-related variations in hematology, clinical biochemistry, and hormones in Spanish fillies and colts. Research in Veterinary Science, 93, 943–949.

Padalino, B., Raidal, S., & Carter, N. (2017). Immunological, clinical, haematological and oxidative responses to long distance transportation in horses. Research in Veterinary Science, 115, 78–87.

Piddubnjak, O. V., & Golovaha, V. I. (2008). Porivnjal'na harakterystyka pokaznykiv gemopoezu u konej [Comparative characteristics of indicators of hemopoiesis in horses]. Visnyk Bilocerkivs'kogo Derzhavnogo Agrarnogo Universytetu, 56, 135–139 (in Ukrainian).

Reitman, S., & Frankel, S. (1957). A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. American Journal of Clinical Pathology, 164(1), 321–325.

Rud'ko, G. I., & Macijevs'ka, O. O. (2009). Doslidzhennja gidrogeohimichnyh pokaznykiv pidzemnoi' gidrosfery zahidnyh regioniv Ukrai'ny na vmist mikroelementiv [Research into hydrogeochemical indicators of the underground hydrosphere in western regions of Ukraine for content of microelements]. Visnyk Nacional'nogo Universytetu "L'vivs'ka politehnika", 655, 250–256 (in Ukrainian).

Scantlebury, C. E., Archer, D. C., Proudman, C. J., & Pinchbeck, G. L. (2014). Management and horse-level risk factors for recurrent colic in the UK general equine practice population. Equine Veterinary Journal, 47(2), 202–206.

Shherbatyj, A. R., & Slivins'ka, L. G. (2013). Diagnostyka mikroelementoziv kobyl u zahidnij biogeohimichnij zoni Ukrai'ny [Diagnosis of microelementosis of mares from the western biogeochemical zone of Ukraine]. Veterynarna Medycyna Ukrai'ny, 206, 25–28 (in Ukrainian).

Shherbatyj, A. R., Slivins'ka, L. G., & Maksymovych I. A. (2013). Funkcional'nyj stan pechinky ta nyrok u kobyl za gipokobal'tozu i gipokuprozu [Functional condition of the liver and kidneys of mares with hypocobaltosis and hypocuprosis]. Scientific Messenger LNUVMBT named after S. Z. Gzhytskyj, 55, 257–261 (in Ukrainian).

Stefurak, J. P. (2004). Stan ta perspektyvy rozvedennja gucul's'koi' porody konej na Prykarpatti [Condition and perspectives for breeding Hucul horses in the Precarpathian region]. Naukovyj Visnyk Ukrai'ns'kogo Derzhavnogo Lisotehnichnogo Universytetu, 14(3), 456–463 (in Ukrainian).

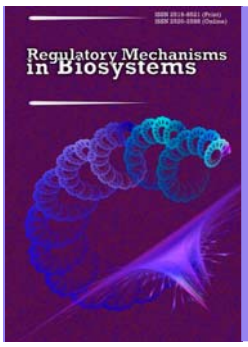
Takasu, M., Nagatani, N., & Tozaki, T. (2013). Hematological and biochemical reference values for the endangered Kiso horse. Journal of Equine Science, 24(4), 75–78.

Tkachev, A. V., Sheremeta, V. I., & Tkacheva, O. L. (2016). Vplyv chasu shtuchnoho osimeninnia vidnosno ovuliatsii na zaplidniuvanist kobyl [Influence of timing of artificial insemination relative to ovulation on conception in mares]. Scientific Messenger LNUVMBT named after S. Z. Gzhytskyj, 18(2), 241–244.

Vysochans'ka, L. J. (2010). Osoblyvosti ta ekonomichna efektyvnist' vykorystannja konej u gospodarstvah usih form vlasnosti Ivano-Frankivshhyny [Peculiarities and economic effectiveness of using horses on farms under all types of ownership in Ivano-Frankovsk region]. Innovacijna Ekonomika, 5, 48–50 (in Ukrainian).

Wingfield, N. J. (1984). Horse ailments and health care: A practical horse guide Colin Vogel. Equine Veterinary Journal, 16(1), 52.

Wood, D. R. (2004). Veterinary laboratory medicine, interpretation and diagnosis, 3rd edition. Veterinary Clinical Pathology, 33(3), 182–182.



Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(2), 299–303
doi: 10.15421/021747

The quality of colostrum and vitality of calves, born from cows with different reaction to stress experiences

O. M. Chernenko, O. I. Chernenko, R. A. Sanjara

Dnipro State Agrarian-Economic University, Dnipro, Ukraine

Article info

Received 02.04.2017
Received in revised form 25.04.2017
Accepted 29.04.2017

Dnipro State Agrarian-Economic University, Sergey Efremov Str., 25, Dnipro, 49600, Ukraine.
Tel.:+38-056-713-51-74
E-mail: chernenko_an@ukr.net

Chernenko, A. N., Chernenko, E. I., & Sanjara, R. A. (2017). The quality of colostrum and vitality of calves, born from cows with different reaction to stress experiences. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(2), 299–303. doi:10.15421/021747

The article presents the results of studying cortisol concentration and creatine phosphokinase activity in the blood serum of 40 half-sib Ukrainian black and white dairy cows an hour after planned blood extraction, which was a stress experience. We divided the cows into three groups according to the distribution of cortisol concentration in the animals: I – high, II – average and III – low stress resistance. During the research, the cows from these groups were in their fourth month of lactation after their first calving. They were kept untethered in their summer quarters, natural pastures. The aim of the research was to identify the differences in the quality of colostrum, the vitality of the calves up to the age of 6 months, the vitality of the mother-cows, and also the influence of their different adaptation potentials in cases of abortion and stillborn calves among the cows from different groups. At the dairy complex where the research was conducted, the quality of the cows' colostrum is not monitored. This is typical for most dairy plants of Ukraine. We found that the classes of A and M immunoglobulins did not depend upon which particular groups the animals belonged to, whereas the content of immunoglobulins of class G is 6.7 g/l higher, and the content of total protein is 8.9 g/l higher in the yield of colostrum of the cows from group 1. The influence of cows' different levels of resistance to stress experiences on their incidence of abortions and stillborn calves was not determined. Gastroenteritis occurred among calves of cows from group 3 three times more often than with those of group 1. Vitality of calves from cows of groups 1 and 2 was significantly higher. Therefore, technological stress experiences of mother-cows have a negative effect upon the quality of colostrum and upon the vitality of calves. This factor ought to be taken into consideration in the exploitation of animals, especially during pregnancy in order to minimise stress and help individuals with less strong nervous systems. Solving the complex problems of increasing the vitality of calves involves in part guaranteeing their provision with colostrum immunity by compulsory control of the colostrum' quality using a special aerometer (Colostrometer).

Keywords: cortisol; creatine phosphokinase; adaptation potential; immunoglobulins A and M; content of protein

Introduction

It is proven that stress decreases immunity (Roth et al., 1985; Frank et al., 1989; Moberg et al., 2000; Salak-Johnson et al., 2006; Carroll et al., 2013). Stress which leads to "disruption" of immunity, misbalances the organism with the environment (Hansen et al., 1998; Chernenko, 2015a). This leads to disorders of homeostasis (Friend et al., 1977; Friend et al., 1980). It is well understood (Lefcourt et al., 1982; Borell et al., 2007) that different animals react differently to the same stress factor. Some are able to quickly adapt, whereas others adapt much slower or are unable to overcome the stress. The reason for this may be different biological adequacies of the organism, for some animals can be obtained using inbreeding, and others using outbreeding (Hansen et al., 2002). Also the temperament and the behaviour of animals are inherited (Salak-Johnson et al., 2006). Homeostasis of some individuals recovers significantly faster, without occurrence of any negative effects on health, rapid decrease in productivity and reproductive capacity (Beilharz et al., 1982; Borell et al., 2007; Chernenko, 2015b). For others, the same stress-factors cause devastating consequences and homeostasis does not regenerate for a long time (Wolfenson et al., 2000).

Recovering the stability of an organism's internal environment requires significant additional energetic resources (Giesecke et al., 1985). The organism has to obtain them, first of all, using its own reserves. In particular, this is achieved through the process of gluconeogenesis. However, this is impossible without "building material" in the form of free amino acids and fatty acids. Therefore stress hormones, especially cortisol, block the synthesis of protein and fats (Giesecke et al., 1985). This is a part of the so-called general adaptation syndrome (GAS). The efficiency of an organism's recovery depends upon the duration of influence of a stress-factor (Frank et al., 1989), the intensity of stress-factors (Lacetera et al., 2001), and also upon the individual adaptation capacities of the organism (Salak-Johnson et al., 2006). Stress can lead to significant lactational fluctuations (Gorewit et al., 1992; Wenzel et al., 2003), can endanger the antimicrobial efficiency of natural protection mechanisms of the udder and increase the risk of non-physiological regression of mammary gland, and cause subclinical and clinical mastitogen infections of the udder (Giesecke et al., 1985). There are also reports of decrease of Luteinizing hormone secretion in cases of chronic stress (Borell et al., 2007).

There is data that heat stress can lead to decrease in the content of total protein, casein, lactalbumin, fat and lactose in the colostrum, and increase pH (Frank et al., 1989; Nardone et al., 1997). The process of calving is the most severe form of stress for a cow's organism. Taking calves away practically after they are born is stress both for them and

for mothers. However, there is data (Hickey et al., 2002) that the cows overcome this process with a minmum of stress. But do all of them? Colostrum is not only the first food for newborn calves, but also a source of immunoglobulins. Ig provides the collostrum immunity. The colostrum contain also antimicrobial components: lactoferrin, lysozyme and lactoperoxidase (Pakkanen et al., 1997). Also colostrum contain hormones, growth factors, cytokine, enzymes, polyamins and nucleotides, which have a significant biological effect upon newborn calves (Blum et al., 2000). Despite that, there is data that newborn calves' intestines have no activity of selecting immunoglobulins (Besser et al., 1985), and that the amount of Ig in a calf's blood does not depend on the amount of colostrum obtained by a calf, although the colostrum does contain a certain minimum or norm of Ig (Bush et al., 1980). Colostrum with Ig content below this norm are considered inadmissible for milk feeding (Morin et al., 2001). Therefore the quality of colostrum is controlled using an areometer (Colostrometer). However, in Ukraine this is a rare case – only on best particular plants. Most plants do not take such control seriously. The quality of milk is also conditioned by the breed (Muller et al., 1981), the month of calving (Morin et al., 2001), mastitis (Maunsell et al., 1998) and other factors.

In this context, we should highlight that vitality of calves in modern conditions of intense production technology is still maintained at an insufficient level. Prenatal and postnatal losses negatively affect the speed and quality of a herd's recovery as well as the economic indicators of livestock rearing. Therefore the problem requires a complex solution, for the vitality of calvesy is affected by different factors. It is known that (Monty et al., 1987; Hansen et al., 2002) prenatal losses occur due to internal defects of the embryo, inadequate maternal environment, asynchronous interaction of embryo and the mother, or due to mother's inability to adequately react to embryonic signals. The pre-implantational embryo is most sensitive to certain types of stress at very early stage of development (embryo stress). There is data (Tao et al., 2012), that stress leads to disorders of immunity among cows and newborn calves, and there is also a presumption that it can endanger their vitality from birth to weaning. Stress decreases libido and embryonic vitality of cattle. In particular, heat stress in the final months of pregnancy decreases the growth of the fetus, changes the endocrine status of mother-cows and leads to decrease in general metabolism (Collier et al., 1982; Wolfenson et al., 2000). One limiting factor is the inability of cows with high milk performance to maintain normothermia (Wolfenson et al., 2000). This occurs because higher milk performance is connected with a great exit of heat form the organism of cows (Igono et al., 2008). The amount of immunoglobulin in the blood of newborn calves depends on the quality of the colostrum. Robison et al. (1988) found that the mortality was 6.8% among calves with less than 12 mg/ml of serum Ig 24–48 hours after birth, compared to other calves of the same age with Ig concentration in the blood higher than 12 mg/ml (3.3% mortality). Merlot et al. (2013) defined that stress weakens the immune system of mother-cows and damages their health; this can influence the transfer of pathogens to the fetus. Calves born from cows with dystonia died five times more often during the neonatal period than calves born without any assistance. Among all the calves that died, 43.6% were born with difficulties. Among these calves, the vitality was the lowest among those who had the smallest body mass (Azzam et al., 2017). Similar results have been obtained by other researchers (Tenhagen et al., 2007).

The following hypotheses are proposed in relation to this. The varying stability of different organisms to different stress experiences is possibly affected by the compound of cows' colostrum. High and low stability to technogenic stresses among mother-cows possibly influences the occurrence of abortions and cases of stillbirth of calves, and also the vitality of calves after birth and the vitality of mother-cows.

The aim of this research is to assess the influence of the adaptive potential of cows on their colostrum and the vitality of calves in conditions of industrial farming, where stress experiences occur frequently due to regrouping of animals, changes in technological regimes of maintenance during summer and winter periods, taking the calves from their mothers at early stage, veterinary services, etc.

Materials and methods

The research was conducted using half-sib cows of the Ukrainian black and white dairy breed, which belong to the agricultural firm "Olimpex-Agro" (Dnipropetrovsk oblast). The level of stress in the cows' organism was defined according to concentration of cortisol and activity of creatine phosphokinase in the blood after experiencing stress before feeding in the morning. The stress factor was fixation of the animals, veterinary procedures and the process of taking blood for general planned analysis, and also occasions when the animals remained fixed for an hour without any opportunity to approach the feeder or drinking trough. Then they had their blood taken for measuring the concentration of cortisol and activity of creatine phosphokinase.

The method of defining the concentration of cortisol in the blood serum of the tested animals is based on the competition between untagged antigens and enzyme-tagged antigens for a particular number of bonds with antibodies. The number of enzyme-tagged antigens, bonded with antibodies is inversely proportional to the concentration of untagged antigens of the sample. We used reagents of Diagnostic system laboratory (USA), and also a micromonoclonal immunoenzymometric analyzer Stat Fax-2100, which was set for 450 and 600 or 620 nm wave length; incubator-shaker Stat Fax-2200, which was set for 500–700 movements a minute; automatic washer Stat Fax-2600; semi-automatic weighers for 5–50, 50–200 and 200–1000 μl. Optical density in cells was defined at the wave length of 450 and 620 nm (during 30 minutes after addition of stop-solution). Before collecting data on absorption, the device was set at "0" in correspondence to the zero standard (Blank). The values obtained for cortisol were used for plotting the standard curve for defining the concentration of cortisol in the studied blood samples. The samples with values higher than the highest standard were additionally dissolved by a standard 0 μg/dl and studied again. Because all results are given in mcg/dl, their conversion into nmol/l was made by multiplying μg/dl by 27.6.

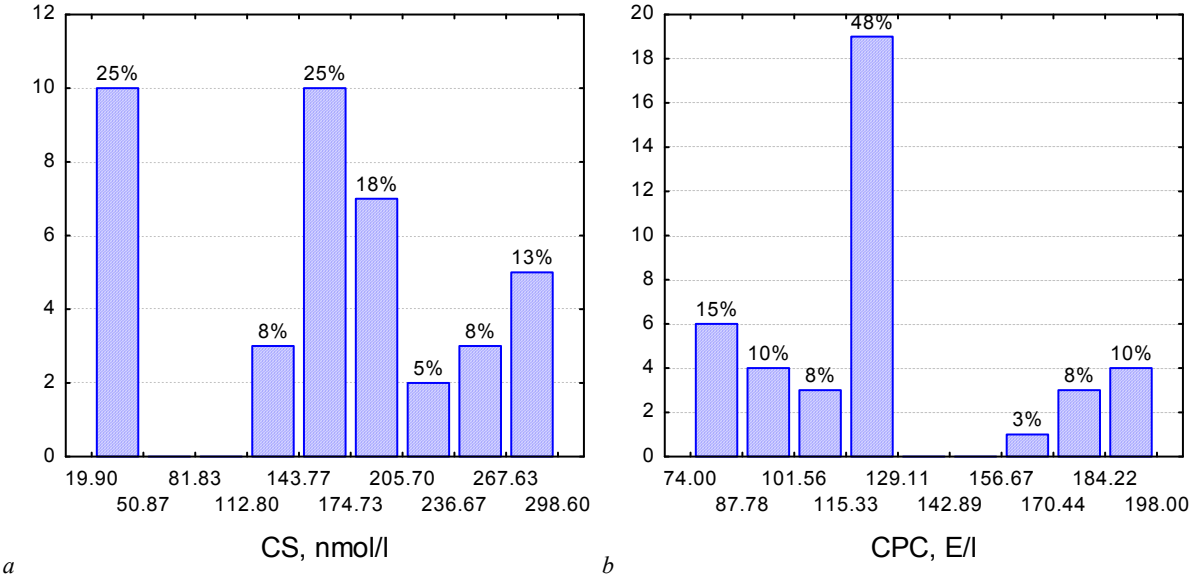
The method of identifying creatine phosphokinase was based on the fact that its activity is proportional to the amount of creatine which forms after fermentation. Creatine was identified by the staining reaction of α-naphtol. We used the following equipment: spectrophotometer, volumetric flasks, thermostat, stopwatch. We used fresh blood with heparin without any hemolysis. The blood samples were transported to the laboratory as fast as possible. The serum was maintained in closed test tubes in the dark for two days at the temperature not higher than +20…+25 ºC. The identification of creatine phosphokinase activity in the blood serum was made using a unified method with creatine as a substrate.

For studying the quality of colostrum, two separate groups were formed of animals with extreme values for reaction to stress. We used the method of pair-analogues by age in calving and body mass. All animals were daughters of the same male cow. The content of immunoglobulins in the first portions of colostrum was determined using the immunoenzymometric method with "Granum" set on the "Labline 32" device (Austria).

Results and discussion

The distribution of animals according to the concentration of cortisol in blood (Fig. 1*a*) 1 hour after the stress experience did not correspond to the norm. Therefore we divided animals into three groups.

Group 1 contained differentiated cows with concentration of cortisol in the blood within 19.9–112.8 nmol/l. They were conditionally referred to as "cows with high stress-resistance". Group II contained cows with concentration of cortisol in the blood within 112.8–205.7 nmol/l (modal class – "average stress – resistance"). Group III was composed of animals with the highest concentration of cortisol – more than 205.7 nmol/l (conditionally named "low stress – resistance").



a *b*

Fig. 1. Distribution of frequencies of variate values set in relation to cortisol (*a*) and creatine phosphokinase (*b*) 1 hour after the stress experience (n = 40)

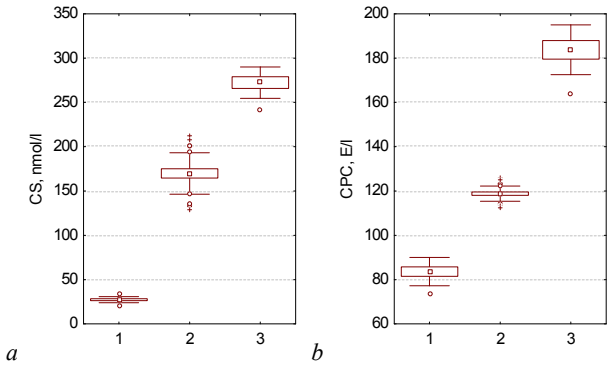
Concerning the activity of creatine phosphokinase, we observed clear asymmetry of distribution (Fig. 1*b*). Therefore this indicator was used only as an additional one. The peculiarities of animals' reaction to stress experience are presented in Fig. 2. The data presented shows that these groups of animals are quite different in their levels of reaction to stress.

While studying colostrum, we identified the classes of immunoglobulins: A, M, G and total protein (Fig. 3).

Classes of immunoglobulins A and M did not depend on ($P > 0.05$) which group the animals belonged to, whereas content of immunoglobulins of class G was higher by 6.7 g/l ($P < 0.05$), and the content of total protein higher by 8.9 g/l ($P < 0.05$) compared to portions of colostrum from the cows of the first group.

According to content of albumin and globulin fractions in the colostrum, no reliable differences between animals of the two extreme groups were found. However, we observed a clear tendency for their content to be higher in colostrum of cows from the first group.

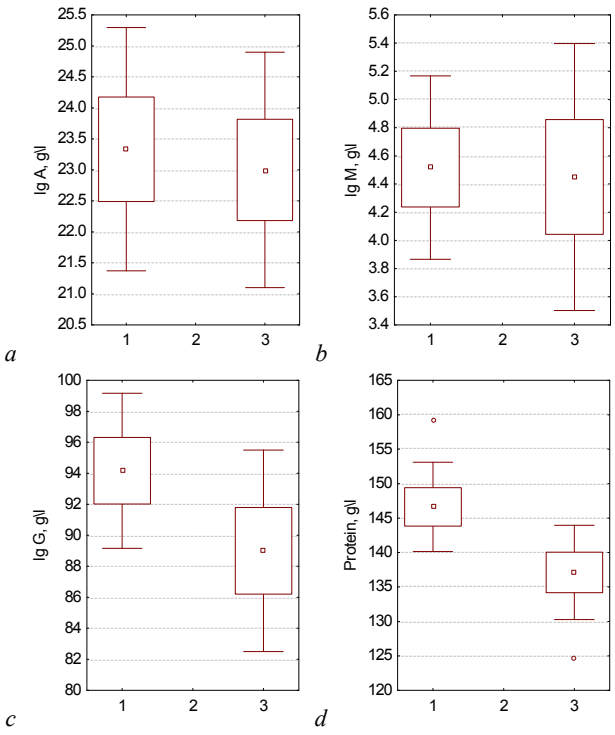
We also studied the vitality of calves from cows with different reaction to stress, and also the vitality of mother-cows (Table).



a *b*

Fig. 2. Concentration of cortisol (*a*) and activity of creatine phosphokinase (*b*) in the blood of tested animals after stress: *1* – cows with high stress resistance (n = 10); *2* – with average stress resistance (n = 20); *3* – with low stress resistance (n = 10); Friedman ANOVA method

No abortions occurred in groups I and II, whereas a single case (10%) occurred in group III. At the same time, groups I and III had cases of stillborn calves. No such cases occurred in group II. In most cases of loss of calves up to 6 months age, the cause of the death was gastroenteritis. This occurred more often among calves of cows from group III (30%), compared to the first group (10%). There were no cases of other diseases found among calves from cows of group I. At the same time, catarrhal bronchopneumonia was observed among calves from cows of groups II (10%) and III (10%). There was one case (10%) of general underdevelopment, which occurred in a calf from a cow of group III. Therefore only three calves (30%) in group III survived after the age of 6 months. Out of 40 tested mother-cows, two cows from group III departed after the second calving.



a *b* *c* *d*

Fig. 3. Classes of immunoglobulin (*a*, *b*, *c*) and total protein (*d*) in colostrum of cows from two extreme groups: *1* – highly stress-resistant (n = 6); *3* – low stress resistant (n = 6)

Conclusions

The data obtained does not contradict the hypotheses that different levels of resistance to stress among mother-cows can directly or indirectly influence the quality of colostrum, particularly the content

of immunoglubulins of class G and total protein, and also the vitality of their calves, and the vitality of mother-cows. At the same time, no significant relationship between the cows' resistance to stress and abortions and stillborn calves was found.

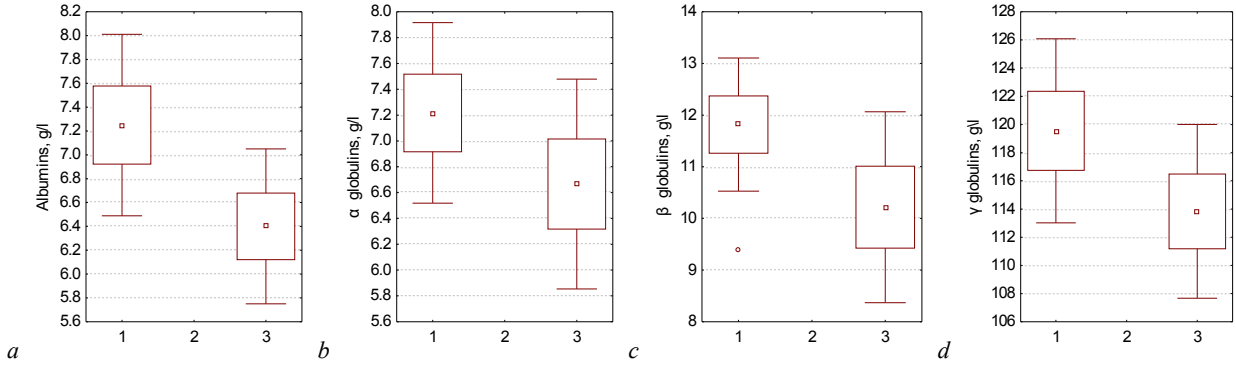


Fig. 4. Content of albumin (*a*) and globulin fractions (*b*, *c*, *d*) in colostrum of cows from two extreme groups: notation keys see Fig. 3

Table
Vitality of 6 month old calves from cows of different groups

Indicator		Number of mother-cows, n = 40		Group of mother-cows					
				I, n = 10		II, n = 20		III, n = 10	
		head	%	head	%	head	%	head	%
Abortion		1	2.5	–	–	–	–	1	10.0
Stillborn		2	5.0	1	10.0	–	–	1	10.0
Causes of cattle loss	catarrhal bronchopneumonia	3	7.5	–	–	2	10.0	1	10.0
	gastroenteritis	6	15.0	1	10.0	2	10.0	3	30.0
	general underdevelopment	1	2.5	–	–	–	–	1	10.0
Cows which departed after the second calving		2	5.0	–	–	–	–	2	20.0

Guaranteed provision of young calves with quality colostrum and adequate colostrum immunity in the conditions of constant technological stress is possible through regular control of the quality of colostrum quality using a special areometer (Colostrometer).

References

Azzam, S. M., Kinder, J. E., Nielsen, M. K., Werth, L. A., Gregory, K. E., Cundiff, L. V., & Koch, R. M. (2017). Environmental effects on neonatal mortality of beef calves. Journal of Animal Science, 71(2), 282–290.

Beilharz, R. G., & Zeeb, K. (1982). Social dominance in dairy cattle. Applied Animal Ethology, 8, 79–97.

Besser, T. E., Garmedia, A. E., McGuire, T. C., & Gay, C. C. (1985). Effect of colostral immunoglobulin G1 and immunoglobulin M concentrations on immunoglobulin absorption in calves. Journal of Dairy Science, 68, 2033–2037.

Blum, J. W., & Hammon, H. (2000). Colostrum effects on the gastrointestinal tract, and on nutritional, endocrine and metabolic parameters in neonatal calves. Livestock Production Science, 66(2), 151–159.

Borell, E., Dobson, H., & Prunier, A. (2007). Stress, behaviour and reproductive performance in female cattle and pigs. Hormones and Behavior, 52(1), 130–138.

Borell, E., Langbein, J., Després, G., & Hansen, S. (2007). Heart rate variability as a measure of autonomic regulation of cardiac activity for assessing stress and welfare in farm animals – a review. Physiology and Behavior, 92(3), 293–316.

Bush, L. J., & Staley, T. E. (1980). Absorption of colostral immunoglobulins in newborn calves. Journal of Dairy Science, 63(4), 672–680.

Carroll, J. A., & Forsberg, N. E. (2013). Influence of stress and nutrition on cattle immunity. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice, 23(1), 105–149.

Chernenko, O. M. (2015a). The efficiency of the use of breeding servicing bulls based on their adaptive capacity. Science and Technology Bulletein of Scientific Research Center for Biosafety and Environmental Control of Agro-Industrial Complex, 3(1), 153–157 (in Ukrainian).

Chernenko, O. M. (2015b). Rezul'taty pleminnoho vykorystannya buhayivplidnykiv zalezhno vid yikh adaptatsiynoyi zdatnosti [Results of tribal use of bull-inseminators based on their adaptive capacity]. Tekhnolohiya Vyrobnytstva i Pererobky Produktsiyi Tvarynnytstva, 116, 88–91 (in Ukrainian).

Collier, R. J., Beede, D. K., Thatcher, W. W., Israel, L. A., & Wilcox, C. J. (1982). Influences of environment and its modification on dairy animal health and production. Journal of Dairy Science, 65(11), 2213–2227.

Frank, J., & Griffin, T. (1989). Stress and immunity: A unifying concept. Veterinary Immunology and Immunopathology, 20(3), 263–312.

Friend, T. H. (1980). Stress: What is it and how can it be quantified? International Journal for the Study of Animal Problems, 1(6), 366–374.

Friend, T. H., & Polan, C. E., Gwazdauskas, F. C., & Heald, C. W. (1977). Adrenal glucocorticoid response to exogenous adrenocorticotropin mediated by density and social disruption in lactating cows. Journal of Dairy Science, 60(12), 1958–1963.

Giesecke, W. H., & Bigalke, R. D. (1985). The effect of stress on udder health of dairy cows. Onderstepoort Journal of Veterinary Research, 52, 175–193.

Gorewit, R. C., Svennersten, K., Butler, W. R., & Uvnas-Moberg, K. (1992). Endocrine responses in cows milked by hand and machine. Journal of Dairy Science, 75(2), 443–448.

Hansen, P. J. (2002). Embryonic mortality in cattle from the embryo's perspective. Journal of Animal Science, 80(2), 33–44.

Hansen, P. J., & Arechiga, C. F. (1998). Strategies for managing reproduction in the heat-stressed dairy cow. Journal of Animal Science, 77, 36–50.

Hickey, M. C., Drennan, M., & Earley, B. (2002). The effect of abrupt weaning of suckler calves on the plasma concentrations of cortisol, catecholamines, leukocytes, acute-phase proteins and in vitro interferon-gamma production. Journal of Animal Science, 81(11), 2847–2855.

Igono, M. O., & Johnson, H. D. (2008). Physiologic stress index of lactating dairy cows based on diurnal pattern of rectal temperature. Journal of Interdisiplinary Cycle Research, 21(4), 303–320.

Lacetera, N., Bernabucci, U., Ronchi, B., Scalia, D., & Nardone, A. (2001). Moderate summer heat stress does not modify immunological parameters of Holstein dairy cows. International Journal of Biometeorology, 46(1), 33–37.

Lefcourt, A. M., & Akers, R. M. (1982). Endocrine responses of cows subjected to controlled voltages during milking. Journal of Dairy Science, 65(11), 2125–2130.

Maunsell, F. P, Morin, D. E., Constable, P. D., Hurley, W. L., Maunsell, F. P., McGoy, G. C., Kakoma, I., & Isaacson, R. E. (1998). Effects of mastitis on the volume and composition of colostrum produced by Holstein cows. Journal of Dairy Science, 81, 1291–1299.

Merlot, E., Quesnel, H., & Prunier, A. (2013). Prenatal stress, immunity and neonatal health in farm animal species. Animal, 7(12), 2016–2025.

Moberg, G. P., & Mench, J. A. (2000). The biology of animal stress: Basic principles and implications for animal. University of California, CABI Publishing, New York, 111–118.

Monty, D. E., & Racowsky, C. (1987). In vitro evaluation of early embryo viability and development in summer heat-stressed, superovulated dairy cows. Theriogenology, 28(4), 451–465.

Morin, D. E., Constable, P. D., Maunsell, F. P., & McGoy, G. C. (2001). Factors associated with colostral specific gravity in dairy cows. Journal of Dairy Science, 84(4), 937–943.

Muller, L. D., & Ellinger, D. K. (1981). Colostral immunoglobulin concentrations among breeds of dairy cattle. Journal of Dairy Science, 64(8), 1727–1730.

Nardone, A., Lacetera, N., Bernabucci, U., & Ronch, B. (1997). Composition of colostrum from dairy heifers exposed to high air temperatures during late pregnancy and the early postpartum period1. Journal of Dairy Science, 80(3), 838–844.

Pakkanen, R., & Aalto, J. (1997). Growth factors and antimicrobial factors of bovine colostrum. International Dairy Journal, 7(5), 285–297.

Robison, J. D., Stott, G. H., & DeNise, S. K. (1988). Effects of passive immunity on growth and survival in the dairy heifer. Journal of Dairy Science, 71(5), 1283–1287.

Roth, J. A. (1985). Cortisol as mediator of stress-associated immunosuppression in cattle. In: G. P. Moberg (ed.) Animal Stress. Springer, New York, pp. 225–243.

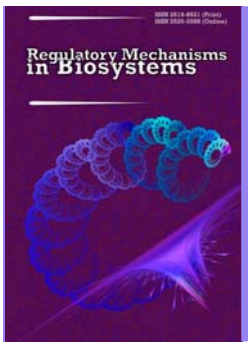
Salak-Johnson, J. L., & McGlone, J. J. (2006). Making sense of apparently conflicting data: Stress and immunity in swine and cattle. Journal of Animal Science. 85(13), 81–88.

Tao, S., Monteiro, A. P. A., Thompson, I. M., Hayen, M. J., & Dahl, G. E. (2012). Effect of late-gestation maternal heat stress on growth and immune function of dairy calves. Journal of Dairy Science, 95(12), 7128–7136.

Tenhagen, B. A., Helmbold, A., & Heuwieser, W. (2007). Effect of various degrees of dystocia in dairy cattle on calf viability, milk production, fertility and culling. Journal of Veterinary Medicine. A, Physiology Pathology, Clinical Medicine, 54(2), 98–102.

Wenzel, C., Schönreiter-Fischer, S., & Unshelm, J. (2003). Studies on step-kick behavior and stress of cows during milking in an automatic milking system. Livestock Production Science, 83, 237–246.

Wolfenson, D., Roth, Z., & Meidan, R. (2000). Impaired reproduction in heat-stressed cattle: Basic and applied aspects. Animal Reproduction Science, 60(2), 535–547.



Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(2), 304–309
doi: 10.15421/021748

Morphological and biochemical indicators of blood of rats poisoned by carbon tetrachloride and subject to action of liposomal preparation

B. Gutyj*, T. Martyshchuk**, I. Bushueva***, B. Semeniv*, V. Parchenko***, A. Kaplaushenko***, N. Magrelo*, A. Hirkovyy*, L. Musiy*, S. Murska*

**Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies named after S. Z. Gzhytskyi, Lviv, Ukraine*
***The Institute of Animal Biology of NAAS, Lviv, Ukraine*
****Zaporizhzhia State Medical University, Zaporozhye, Ukraine*

Article info

Received 05.04.2017
Received in revised form 28.04.2017
Accepted 29.04.2017

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

The Institute of Animal Biology of NAAS, V. Stus Str. 38, Lviv, 79034, Ukraine.

Zaporizhzhia State Medical University, Mayakovsky Ave., 26, Zaporozhye, 69035, Ukraine.

Gutyj, B., Martyshchuk, T., Bushueva, I., Semeniv, B., Parchenko, V., Kaplaushenko, A., Magrelo, N., Hirkovyy, A., Musiy, L., & Murska, S. (2017). Morphological and biochemical indicators of blood of rats poisoned by carbon tetrachloride and subject to action of liposomal preparation. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(2), 304–309. doi:10.15421/021748

The article gives the results of the research on the influence of a developed complex liposomal preparation on the dynamics of morphological and biochemical indicators of the blood of rats subjected to modeled oxidative stress caused by intermuscular injection of 50% carbon tetrachloride at a dose of 0.25 ml per 100 g of body mass. We found that in conditions of intoxication by carbon tetrachloride, the physiological level of hematological indicators of the researched animals' body was disrupted. This is indicated by the reduction in the amount of erythrocytes, hemoglobin content, concentration of hemoglobin per erythrocyte, increase in the amount of leucocytes, mass of hemoglobin per erythrocyte and increase of colour indicator. Also, we detected suppression of protein synthesis function of the liver. The levels of total protein and albumin fraction were below the normal physiological level. High indicators were observed in the levels of creatinine, urea and total bilirubin. In order to normalize the functional state of the liver under oxidative stress it is reasonable to use a liposomal preparation which contains butafosfan, interferon, thistle and vitamins. In order to normalize morphological and biochemical indicators of the blood of rats subject to intoxication of carbon tetrachloride it is reasonable to use a liposomal preparation that contains butafosfan, selenium, thistle, methionine and vitamins. Using the liposomal preparation Butaselmevit for rats under oxidative stress the morphological and biochemical indicators in the blood normalized. On the 14th day the indictors of the number of erythrocytes, the hemoglobin content, the white blood cell count and red blood indexes compared to control came within the physiological indicators, indicating a recovery of hematopoietic function of the bone marrow and normalized indicators of the functional state of the liver.

Keywords: carbon tetrachloride; liver; Butaselmevit; butafosfan; selenium; milk thistle; vitamins, methionine

Introduction

The intensive introduction of chemical preparations into industry and agriculture, deterioration of the environment, pollution of the environment with xenobiotics, uncontrolled usage of medicines cause an increase of toxic effects in human and animal organisms (Li et al., 2012; Gutyj et al., 2017). It is known that the central organ which conducts the detoxification processes of organisms is the liver (Calabrese et al., 1999; Cherkashina and Petrenko, 2006). Among diffuse liver diseases, great attention is paid to toxic affections of the liver (Sato et al., 1999; Yatsenko and Maloshtan, 2004). Recently, the role in pathogenesis of liver diseases played by processes of activation of free radical oxidation of lipids (FROL) plasmatic and intracellular membranes of hepatocytes against the background of the depletion of protective antiradical systems has been determined (Gutyj et al., 2016).

Poisoning experimental animals with carbon tetrachloride provides a close approximation according to the morphological picture and biochemical changes to acute affection of the liver of different etiology in humans and animals. Owing to this, we used in our work the classic model of affection of subcellular membranes of hepatocytes and induction of oxidative stress through the use of carbon tetrachloride. Through this, as a result of metabolism of CCl_4, products of a free radical nature which are inductors of lipid peroxidation (POL) are created in the organism, as a result of which the structure of liver cells and their major functions is disrupted (Calabrese et al., 1999; Chen et al., 2000; Cherkashina and Petrenko, 2006; Vyshtakaliuk et al., 2015).

In order to increase the adaptive capability and immune biological reactivity of the organism, the strengthening of protein synthesis and enzyme function in animals, new complex preparations have recently been used with success (Gutyj et al., 2016, 2017; Hariv and Gutyj, 2016; Martyshuk et al., 2016; Smolynets' et al., 2016). Some other authors have determined the stimulating influence of milk thistle, vitamins, selenium and butafosfan on the activity of antioxidant and hepatoprotective action in animals (Martyshuk et al., 2016; Khariv et al., 2016). However, complex usage of the abovementioned preparation on the function of the liver and hematological indicators currently in scientific literature has not been adequately researched.

This shows that it is reasonable to research the influence of the complex liposomal preparation Butaselmevit which include butafosfan, selenium, methionine, vitamins and milk thistle on the development of immunity and of high natural resistance in animals, their influence on the liver functions, positive influence on metabolism in their organism, increase of growth and preserving the population of animals.

Materials and methods

The research was carried out on young white laboratory male rats of the Wistar line and of body mass – 180–200 g, which were reared in standard conditions in the institutional vivarium of the State Scientific-Research Control Institute of Veterinary Preparations and Feed Additives. During the whole experiment the rats were fed with a balanced ration that included all necessary components, drinkable water was given to the animals without any restriction from glass drinkers of 0.2 liters volume.

The animals were divided into three groups with 20 animals in each: 1st group (C) intact animals; 2nd (D_1) rats that were affected with carbon tetrachloride; 3rd group (D_2) – rats affected with carbon tetrachloride and treated with the liposomal preparation Butaselmevit. The toxic affection of rats was caused by means of intramuscular injection of 50% carbon tetrachloride in dose of 0.25 ml per 100 g body mass on the first and third day of the experiment. The animals of the research group D_2, additionally were injected with a liposomal preparation in dose 2 ml per 1 kg of body mass on the first and third days of the experiment an hour after injection of carbon tetrachloride. The content of this preparation has the following elements: butafosfan, selenium, methionine, thistle and vitamins A, E and D_3.

Blood for biochemical and hematological researches was collected under ether anesthesia from the jugular vein on the second, fifth, tenth and fifteenth days of the experiment.

Housing, feeding, looking after and all other manipulations with animals were done according to the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986) and General Ethical Principles of Experiments on Animals, adopted by the First National Bioethics Congress (Kyiv, 2001). The experiments were conducted in accordance with the principles of humanity set out in the Directive of the European Community.

The amount of erythrocytes and leucocytes was counted on the Goryaev camera according to generally recognizable method. The level of blood hemoglobin was determined by the cyanide hemoglobin method with the usage of FEK-M according to the method of H. V. Derviz and A. H. Vorobiov. The amount of hematocrit was determined by blood centrifugation in micropipettes 3000 rpm. According to the number of erythrocytes, hemoglobin level and amount of hematocrit, according to the corresponding formula, using the method of mathematical calculations, the following indexes of indicators of red blood were determined: the average volume of one erythrocyte (MSV), the average weight of hemoglobin (MSN), the average hemoglobin concentration (MSNS), the colour index (KP) (Vlizlo, 2012).

The analysis of the research results were conducted using the program Statistica 6.0. The reliability of the difference was evaluated by Student's t-test. The results were considered significant at $P < 0.05$.

Results

The importance of the clinical-diagnostic research of blood lies in the fact that through tissue fluid it secures direct connection between organs and tissues and reflects the internal processes and changes in an organism and in pathological conditions it can have qualitative and quantitative changes.

The results of the hematological indicators research of the organism of rats poisoned with carbon tetrachloride and subject to the action of the liposomal preparation Butaselvemit are presented in Table 1. It was found that after the development of oxidation stress in rats, caused by the injection of carbon tetrachloride (research group 1), these indicators were different from the indicators of the control group of animals. This was caused due to the negative effect of carbon tetrachloride on the function of erythrocyte production in the bone marrow of rats.

On the second day in the blood of rats of the first research group we found a decrease in the number of erythrocytes by 32.7% ($P < 0.001$) in comparison with the control group. The level of hemoglobin in the blood decreased from 149.6 ± 1.6 to 122.3 ± 2.3 g/l, that is 18.2% lower ($P < 0.001$) than in the clinically healthy animals. It is known that the level of hemoglobin is in direct dependence on the number of erythrocytes. However, as it is shown in the table, in rats of the research group D_1 poisoned with carbon tetrachloride the amount of erythrocytes decreased by 32.7% and the level of hemoglobin in blood decreased by 18.2%. This was caused by the erythrocyte hemolysis under the action of carbon tetrachloride. The non-proportional decrease of the amount of erythrocytes and decrease of the hemoglobin level in the blood is explained by the fact that in connection with a decrease in the total number of erythrocytes inside the bloodstream young erythrocytes appeared, which had a large volume and therefore greater weight of hemoglobin, compared with the old erythrocytes with less volume. However, the concentration of hemoglobin in young erythrocytes was lower than in the old ones.

The decrease of the amount of erythrocytes and hemoglobin in blood of rats under oxidative stress indicates the suppressed function of erythrocyte production in the bone marrow of rats as a result of the action of carbon tetrachloride.

The hematocrit value indicates the relation between formed elements and blood plasma. After the injection into rats of the research group D_1 of carbon tetrachloride, the amount of hematocrit on the 2nd day of the research increased to 32.7 ± 1.37 vol %.

On the basis of the indicators of the erythrocyte count, the content of hemoglobin in the blood and amount of hematocrit, one cannot objectively evaluate the hematopoietic function of the bone marrow. In order to do this, one must determine the value of indexes of red blood: average volume of one erythrocyte (MCV), an increase of which (macrocytosis) is an indicator of moderate erythrocytosis. The average mass of hemoglobin in an erythrocyte (MCH) can be high in cases of hemolytic and myelotoxic anemia. The average concentration of hemoglobin in an erythrocyte (MCHC) increases after hyperchromic anemia and decreases with the occurrence of ferrum deficit anemia. The increase in its concentration indicates the presence in the blood of "young" erythrocytes with a high content of hemoglobin and decrease indicates presence of "old" erythrocytes with low content of hemoglobin.

We found that in case of poisoning with carbon tetrachloride the average mass of hemoglobin in one erythrocyte is 21.6% greater and its average concentration 29.7% lower than in clinically healthy animals. Such discrepancy between mass and concentration of hemoglobin in a single erythrocyte is caused by the fact that young erythrocytes are present in the blood, the average volume of which exceeds physiological indicators. The presence in rats of the control group D_1 of young blood elements with a large mass of hemoglobin caused changes in the colour indicator quantity. Clinically healthy animals had 0.69 ± 0.04 IU and under oxidative stress – 0.84 ± 0.05 IU.

When there were inflammation processes in the organism of rats which were injected with carbon tetrachloride we observed an increase in the number of leucocytes, which on the second day increased by 59% in the blood of research group D_1. The highest amount of leucocytes in the blood of sick rats was on the fifth day of research, increasing almost 1.2 times compared to the control group.

It should be noted that on the 5th and 10th day of the research, the hematological indicators of the blood of rats in the first research group which were injected with carbon tetrachloride did not change significantly compared to the samples that were taken on the 2nd day of the research.

On the 14th day of the research the number of erythrocytes in rats of the research group D_1 was lower by 33% and the level of hemoglobin higher by 8% compared with the indicators of the control group of animals ($P < 0.01$). Indicators which were quite high on the 14th day of research in the first experimental group were as follows: the number of erythrocytes was higher by 67%, hematocrit by 19%, mass of hemoglobin by 38%, volume of erythrocytes by 78%, colour indicator by 37%, however the concentration of hemoglobin was lower by 22% compared to the indicators of the control group, which indicates the suppressed erythropoietic function in the bone marrow at

that period of the research.

As has been shown in our research and the work of other authors, erythrocytes had a higher mass of hemoglobin as a result of the increase of average volume of one erythrocyte. However, the average concentration of hemoglobin in such erythrocyte was lower than normal, which led to hypochromia. This compensatory reaction of the organism developed as a result of hypoxia of the tissue, which was caused by the decrease of total number of erythrocytes. It is aimed at setting the optimal level of hemoglobin for total usage of its functional possibilities. It is generally known that with a lower concentration of hemoglobin per erythrocyte, its ability to bind oxygen is relatively higher. This is plays a positive role in securing transporting of oxygen to the tissues.

According to the data in the literature changes in the morphological indicators of the blood are closely connected with the dysfunction of erythropoietic function of the bone marrow (Wolf, 1999; Sato et al., 1999; Longo et al., 2007). The experiments conducted indicate that animals under the intoxication with carbon tetrachloride undergo suppression of haematopoiesis of the bone marrow. This was indicated by the decrease in the number of erythrocytes and decrease in the level of hemoglobin in the blood. Following decrease in the number of erythrocytes and decrease in the level of hemoglobin in the blood, tissue hypoxia occurs. This slows down the oxidative-reduction processes and leads to deteriorating metabolism in the tissues.

Recently in order to prevent the manifestations of intoxication of the liver, increasing use has been made of antioxidant preparations to correct the system of antioxidant protection and for neutralization of free radical oxidation products. The search for active substances with antioxidant properties is quite promising area of research, though it requires taking into account problems of compatibility of natural and synthetic antioxidants. The key factor of antioxidant action of a preparation is total amount of antioxidant substances in its content, the qualitative antioxidant spectrum (vitamins, vitamin-like substances, microelements-metals) and also total quantitative content of substances with antioxidant features. Under intoxication with carbon tetrachloride and using Butaselmevit liposomal preparation, we observed the normalization of hematological indicators among rats of the second experimental group (D_2) throughout the period of research. Particularly on the 5th and 10th day of research we observed reliable increase in the number of erythrocytes 5.86 ± 0.11 and 6.21 ± 0.12 T/l respectively. However in comparison with the control group of animals it was lower by 9% and 4%. In the abovementioned period of research we determined an increase in the level of hemoglobin, which indicates gradual normalization of the hematopoietic function of the bone marrow of the rats which received the liposomal preparation and which suffered intoxication with carbon tetrachloride.

The recovery of hematopoietic function of the bone marrow of rats intoxicated with carbon tetrachloride and receiving the liposomal preparation is explained by the fact that Butaselmevit contains *Silybum marianum*. The fruits of the milk thistle contain high levels of vitamins A and C and minerals – cobalt, iron, copper, which are directly involved in the process of hematopoiesis. Secondly, the fruits of the milk thistle contain Silymarin flavolignans. The hepatoprotective effect of Butaselmevit and improvement of liver detoxification function reduces or prevents irritation caused by toxins which enter the bodies of animals.

It should be noted that on the 5th and 10th days of the research after injecting liposomal preparation to rats of the second research group in conditions of oxidative stress, a decrease in the number of leucocytes occurred. However, this indicator was still high, in particular on the 5th day higher by 58%, on the 10th day higher by 35% than the level of this indicator for the control group. On the 14th day of the experiment, the number of leucocytes in the' blood of the rats of research group D_2 was within the physiological norms.

Table 1

Morphological indicators of blood of rats intoxicated with carbon tetrachloride and receiving the liposomal preparation Butaselmevit (M ± m; n = 20)

Indicator	Research group	Day of research			
		second	fifth	tenth	fourteenth
Erythrocytes, T/l	C		6.44 ± 0.151		
	D_1	4.33 ± 0.120***	4.37 ± 0.095***	4.27 ± 0.055 ***	4.30 ± 0.095***
	D_2	5.87 ± 0.111*	5.86 ± 0.110*	6.21 ± 0.124	6.21 ± 0.195
Hemoglobin, g/l	C		149.6 ± 1.58		
	D_1	122.3 ± 2.25***	139.1 ± 2.11**	140.8 ± 0.85 **	137.9 ± 1.45*
	D_2	146.9 ± 1.89	149.1 ± 1.66	148.7 ± 1.62	151.6 ± 2.62
Leucocytes, G/l	C		9.4 ± 0.85		
	D_1	14.9 ± 0.83**	20.8 ± 1.56 ***	20.0 ± 1.44 **	15.6 ± 1.92*
	D_2	15.1 ± 1.48*	14.8 ± 1.59*	12.6 ± 1.63	9.9 ± 1.52
Quantity of hematocrit, vol%	C		28.1 ± 0.75		
	D_1	32.7 ± 1.37***	32.3 ± 1.65	32.5 ± 1.41*	33.3 ± 1.56*
	D_2	31.6 ± 1.26	29.2 ± 1.05	28.7 ± 0.95	28.5 ± 1.05
Volume of erythrocyte, μm^3	C		43.6 ± 1.15		
	D_1	75.5 ± 1.22***	73.9 ± 1.31***	76.1 ± 1.20***	77.4 ± 1.23***
	D_2	53.8 ± 1.15***	49.8 ± 1.16**	46.2 ± 1.19	45.8 ± 1.15
Mass of hemoglobin in erythrocyte, pg	C		23.2 ± 1.54		
	D_1	28.3 ± 1.33*	31.8 ± 1.34**	32.9 ± 1.36**	32.1 ± 1.40**
	D_2	25.0 ± 1.35	25.4 ± 1.50	23.9 ± 1.50	24.4 ± 1.50
Concentration of hemoglobin in erythrocyte, %	C		53.2 ± 1.35		
	D_1	37.4 ± 1.41***	43.1 ± 1.37**	43.3 ± 1.35**	41.4 ± 1.40***
	D_2	46.5 ± 1.39*	51.1 ± 1.39	51.8 ± 1.36	53.9 ± 1.38
Colour indicator	C		0.69 ± 0.041		
	D_1	0.84 ± 0.051	0.95 ± 0.039**	0,98 ± 0,053**	0.95 ± 0.052**
	D_2	0.81 ± 0.043	0.79 ± 0.044	0,78 ± 0,040	0.77 ± 0.043

Note: the degree of probability: * – P < 0.05;** – P < 0.025; *** – P < 0,001.

When the liposomal preparation Butaselmevit was administered to rats of the research group D_2 on the 2nd day of research the following indicators were within the physiological values: value of hematocrit, hemoglobin mass and hemoglobin concentration. However, the large average volume of one erythrocyte 51.2 ± 1.19 against 43.7 ± 1.16 μm^3 indicates the incomplete restoration of hemopoetic function of the bone marrow.

On the tenth day of the experiment on rats under oxidative stress and receiving liposomal preparation hematopoietic function of bone marrow was not restored totally. However, within this period the following indicators were within the physiological values: value of hematocrit, hemoglobin mass and hemoglobin concentration. However, the large average volume of one erythrocyte 46.2 ± 1.19 against 43.6 ± 1.15 μm^3 indicates the incomplete restoration of hematopoietic function of bone marrow.

On the 14th day of the experiment on sick rats using the lipo-

somal preparation we noticed the normalization in the number of erythrocytes, leucocytes and the level of hemoglobin. The values of indexes of red blood were within the physiological frames. These changes in the blood indicators show that hematopoietic function of bone marrow was totally restored by the 14th day of research.

Thus, on the basis of the experiments conducted we should note the positive action of liposomal preparation Butaselmevit on the organism of rats which were intoxicated with carbon tetrachloride, which was manifested in the normalization of the rats' hematological indicators.

Protein is considered to be the major element on which the internal processes of organism construction are based. It supports the flow of blood, its viscosity and determines the necessary volume of blood to flow in the vessel. Due to proteins, forming elements are held in hanging position and also the transportation of the most important exogenous and endogenous substances takes place. Owing to proteins, the level of pH in blood is regulated. Proteins take an active part in immune reactions.

Most protein is synthesized directly in the liver. Hepatocytes synthesize albumin and fibrinogen, alpha and beta globulins, and components of blood coagulation. Most beta-globulin is synthesized directly in the cells-lymphocytes.

The level of total protein, in particularly its albumin fraction in the blood serum of animals suffering various pathological conditions, indicates the state of protein synthesizing function of the liver. Indeed, 80% of albumin is synthesized by hepatocytes in the liver.

Our research (Table 2) showed that in conditions of oxidative stress in rats of the research group D_1 the level of total protein probably decreased on the second day of the experiment when it was 58.8 ± 1.75 g/l, meanwhile in control group of animals it was 65.3 ± 1.80 g/l. On the 5th, 10th and 14th days of the experiment the level of this indicator rose slightly, but in comparison with the control group of animals it was reduced. The decrease of the level of total protein occurred owing to the decrease of albumin fraction. So, on the second day of the experiment the level of albumin in the blood of rats of the research group D_1 decreased by 41% and on the 5th day by 44% compared to the indicators of the animals of the control group.

Along with the reduction of albumins in the blood serum of the sick rats, we observed a slight rise in the globulin fraction, on the 2nd and 5th days of the experiment the level of globulins rose by 7% and 6%. Subsequently, the level of globulins remained the same as on the 5th day of the experiment.

The experimental data indicate an albumin-globulin disproportion in the blood serum of the sick rats. As a result, the value of A/G coefficient on the 2nd day of the experiment was 0.29 ± 0.02 against 0.53 ± 0.02 in the control group of rats. Such value of coefficient indicates the suppression of protein synthesizing function of the liver.

While the liposomal preparation Butaselmevit was administered to rats of the experimental group D_2 intoxicated with carbon tetrachloride, we determined a rise in the level of total protein and albumin fraction and decrease in the globulin level in blood serum of the rats on the 2nd and 5th days of the experiment. On the 10th and 14th days of the experiment we observed in rats of the second research group a normalization of indicators of protein synthesis function of the liver. The A/G coefficient also remained within the frame of physiological values.

Table 2

Indicators of functional state of liver of rats under conditions of oxidative stress and receiving liposomal preparation (M±m; n=20)

Indicator	Research group	Day of research			
		second	fifth	tenth	fourteenth
Total protein, g/l	C		65.3 ± 1.80		
	D_1	59.1 ± 1.33*	57.9 ± 2.05*	60.2 ± 1.95	62.4 ± 2.10
	D_2	58.8 ± 1.75	62.9 ± 1.08	64.6 ± 0.87	66.4 ± 1.23
Albumins g/l	C		22.6 ± 1.25		
	D_1	13.3 ± 1.60**	12.7 ± 2.22**	14.9 ± 1.90*	17.6 ± 1.85
	D_2	14.1 ± 1.92**	18.9 ± 1.35	21.1 ± 1.55	22.7 ± 0.83
Globulins, g/l	C		42.7 ± 1.41		
	D_1	45.8 ± 2.23	45.2 ± 2.63	45.3 ± 1.75	44.8 ± 2.23
	D_2	44.7 ± 1.82	44.0 ± 2.20	43.5 ± 1.60	43.7 ± 1.70
Coefficient, A/G	C		0.53 ± 0.023		
	D_1	0.29 ± 0.021***	0.28 ± 0.030***	0.33 ± 0.039**	0.39 ± 0.034*
	D_2	0.32 ± 0.026***	0.43 ± 0.038	0.49 ± 0.027	0.52 ± 0.037
Creatinine, µmol/l	C		66.3 ± 2.56		
	D_1	96.5 ± 3.22***	95.2 ± 4.35**	88.5 ± 3.37**	81.7 ± 3.50*
	D_2	94.9 ± 3.75***	84.9 ± 3.76**	72.8 ± 2.84	68.9 ± 3.87
Urine, µmol/l	C		6.6 ± 0.91		
	D_1	11.5 ± 1.71*	10.9 ± 1.23*	10.0 ± 1.14	9.2 ± 0.58
	D_2	11.1 ± 1.37*	9.0 ± 0.75	7.8 ± 0.63	6.5 ± 0.90
Total bilirubin, µmol/l	C		3.9 ± 0.57		
	D_1	5.2 ± 0.73	5.0 ± 0.66	4.6 ± 0.93	4.5 ± 0.65
	D_2	4.8 ± 0.65	4.4 ± 0.85	4.1 ± 0.51	3.9 ± 0.71

Note: the degree of probability: * – P < 0.05;** – P < 0.025; *** – P < 0.001.

The functional state of the liver of rats intoxicated with carbon tetrachloride was determined according to the level of urine, bilirubin and creatinine in the blood serum (Table 2).

The important indicator of the functional state of liver is the level of urine in blood serum, since its synthesis is taking part on periportal hepatocytes. The liver is an organ in which the main amount of ammonia is neutralized. Up to 85% of ammonia that is formed in an animal's intestine is converted to urine in the liver. Moreover, the more ammonia enters a liver, the more urine is formed which is indicated by its level in the blood serum.

We found that on the 2nd day of the experiment the level of urine in the blood serum of rats of the group D_1 level was 11.5 ± 1.71 µmol/l. On the 5th day this indicator decreased to 10.9 ± 1.23 µmol/l. On the 10th day of the experiment the level of urine in blood serum of the sick rats decreased to 10.0 ± 1.14 µmol/l, which was 52% higher than the indicators of the rats of the control group. The content of urine in the blood serum of the sick rats was on the same level on the 14th day of the experiment.

In the experiment on the influence of the liposomal preparation Butaselmevit on the organism of rats intoxicated with carbon tetrachloride, we found that the level of urine in the blood serum of rats of the research group D_2 on the 2nd day of the experiment was 11.1 ± 1.37 µmol/l. By the 5th and 10th days of the experiment the level of urine in the blood serum of the researched rats had gradually decreased, however compared to the control group of animals it was higher by 36% and 18%. On the 14th day of research the level of urine was within the physiological values.

An important function of the liver is its participation of pigment exchange in metabolism processes. This function of the liver is identified according to the level of total bilirubin in the blood serum. In disorders of the pigmentary function of the liver, there is a decrease in absorption, conjugation and excretion of bilirubin in the bile, leading to increase in its level in blood serum.

In our experiments we found that in rats intoxicated with carbon

tetrachloride, the level of total bilirubin in blood serum on the 2nd day of the experiment increased by 34% and on the 5th day by 29% compared to the control. Such high levels of total bilirubin were reached in the blood serum of rats of the experimental group D_1 on the 10th and 14th days of the experiment.

Creatinine is the final product of nitrogen metabolism. It is created in muscle tissue out of phosphocreatine. The level of creatinine in blood serum is the indicator of renal excretory function. In rats of the experimental group D_1, the content of creatinine blood in serum from the second to the fourteenth day of the experiment was within 96.5 – 81.7 μmol/l. While studying the action of the liposomal preparation in rats of the second research group which were injected with carbon tetrachloride, we noticed the normalization of the level of creatinine indicators and total bilirubin on the 5th and 10th days of the experiment. On the 14th day of the research these indicators were within the physiological values.

Thus, on the basis of our experiment the positive action of the liposomal preparation Butaselmevit on the organism of rats which were intoxicated with carbon tetrachloride was manifested by the normalization of hematological indicators, functional state and protein synthesis function of the liver.

Discussion

According to the data of morphological study of the liver of rats poisoned by carbon tetrachloride, a strong intensification of free radical processes was found. In their research the authors (Gutyj et al., 2016; Lavryshyn et al., 2016) found a relation between the indicators of antioxidant protection and expression of destructive changes of hepatocytes or degree of development of toxic hepatosis. Such suppression of elements of the antioxidant protection system is probably caused by their exhaustion as a result of the intensification of POL under the influence of carbon tetrachloride and also the disruption of their synthesis, caused by the destruction of membrane components of the granular and agranual endoplasmic reticulum, free ribosomes and polysomes of hepatocytes cytoplasm.

It was determined that acute toxic affection of the liver of rats poisoned with carbon tetrachloride causes the malfunction of structural and functional activity of hepatocytes. As a result of destruction of membrane and protein components of hepatocytes, caused by the extraction of hepatotoxins, substantial changes were observed in the indicators of protein metabolism – total protein, urine, protein fractions. Thus, the content of total protein in the blood serum increased and in the liver tissue it decreased 1.2 times.

Some authors (Chen et al., 2000; Martyshuk et al., 2016; Khariv et al., 2016) state that the toxic action of carbon tetrachloride on the liver is also accompanied by the violation of its functional state, which is characterized by the accumulation of aminotransferase in the blood serum of laboratory animals. According to data from the literature, the increase in the activity of these enzymes following liver affection is closely correlated with the stage of hepatocytes' destructtion (Wolf, 1999; Sato et al., 1999; Longo et al., 2007). A decrease in activity of the enzyme system of antioxidant protection in the kidneys of rats following the injection of carbon tetrachloride has also been mentioned by other authors as well (Khariv et al., 2016).

Experiments to determine the resistance capacity of erythrocytes have shown that the influence of carbon tetrachloride on the organism of animals causes the increase of permeability of erythrocyte membranes and is followed by an increase in the level of hemolysis of erythrocytes.

The results of the research and data from the literture allow us to draw the conclusion that the decrease of resistance of erythrocytes in animals with acute and chronic intoxication with carbon tetrachloride is connected with oxidative damage to hepatocytes membranes (Gutyj et al., 2016; Khariv et al., 2016). The toxic action of carbon tetrachloride damages the cell membranes, which is followed by their structural and functional changes. During the process of biological transformation, reactive intermediates are created which damage the liver tissue. In hepatocytes the molecule $CC1_4$ take part in the reaction of hemolytic disintegration in interaction in the liver with cytochrome enzyme P-450 to create the reactive free radicals $^{\bullet}CC1_3$ and $^{\bullet}C1$ (Martyshuk et al., 2016). Free radicals influence the functional group of proteins and initiate a chain reaction of peroxide oxidation of polyunsaturated fatty acids, which leads to the disintegration of polysomes, ribosomes. Thus, obtained results of the experiment indicate that in the blood of rats intoxicated with carbon tetrachloride an intensification of free radical processes was observed in the hepatocytes and in the blood, which led to the activation of the processes of lipid peroxidation and accumulation of endogenous toxic products, which caused the violation of morphological and biochemical indicators of the rats' blood.

The usage of the liposomal preparation Butaselmevit promoted the normalization of both, morphological and biochemical indicators of the blood of rats poisoned with carbon tetrachloride. The liposomal preparation Butaselmevit suppressed processes of lipid peroxidation, perhaps due to the fact that the preparation includes two powerful antioxidants such as vitamin E and selenium, which in turn reinforce each other's action. The antioxidant peculiarities of the milk thistle should also be emphasized, which according to the data from the literature possesses precisely this property. Its content include vitamins of group B, A, E, K, precursors of vitamin D, carotenoids, macroelements – potassium, calcium, magnesium, iron and microelements – copper, zinc, manganese, iodine. The total effect of these biologically important elements is manifested in a high level of hepatoprotective and antioxidant action (Khariv et al., 2016).

Conclusions

The hematopoietic function of bone marrow is violated in rats subject to intoxication with carbon tetrachloride, which can be observed in the decrease in the amount of erythrocytes by 34%, content of hemoglobin by 18%, concentration of hemoglobin per erythrocyte by 30%, increase of the mass of hemoglobin per erythrocyte by 38%, increase in volume of erythrocyte by 77%, increase in colour indicator by 42%. The development of oxidative stress in rats was caused by intramuscular injection of carbon tetrachloride, which was followed by the suppression of protein synthesis function of the liver, which is indicated by the low level of total protein and decrease in the albumin-globulin coefficient. The low level of albumins and high level of globulins in the blood of the sick rats indicates an albumin-globulin disproportion. Indicators of the functional state of liver were fairly high, namely: the level of creatinine increased by 46%, urine by 74% and total bilirubin by 34%.

When the liposomal preparation Butaselmevit was administered to rats suffering oxidative stress normalization of the activity of hematological processes in the blood took place in the course of the experiment; namely on the 14th day of the experiment the following indicators came within the frames of physiological values, number of erythrocytes, hemoglobin content, number of leucocytes and indexes of red blood in comparison with the control group, which indicates the restoration of hematopoietic function of the bone marrow. It will be worth conducting further research on leukograms of the blood of rats suffering oxidative stress and receiving a liposomal preparation.

References

Calabrese, E., Leonard, D., & Xiaoqiang, Z. (1999). Role of tissue repair in carbon tetrachloride hepatotoxicity in male and female Sprague-Dawley and Wistar rats. International Journal of Toxicology, 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. Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 141(4), 544–547.

Gutyj, B. V., Hufriy, D. F., Hunchak, V. M., Khariv, I. I., Levkivska, N. D., & Huberuk, V. O. (2016). The influence of metisevit and metifen on the intensity of lipid per oxidation in the blood of bulls on nitrate load. Scientific Messenger LNUVMBT named after S. Z. Gzhytskyj, 18(3), 67–70.

Gutyj, B. V., Murs'ka, S. D., Gufrij, D. F., Hariv, I. I., Levkivs'ka, N. D., Nazaruk, N. V., Gajdjuk, M. B., Pryjma, O. B., Bilyk, O. J., & Guta, Z. A. (2016). Vplyv kadmiievoho navantazhennia na systemu antyoksydantnoho zakhystu orhanizmu buhaitsiv [Influence of cadmium loading on the state of the antioxidant system in the organism of bulls]. Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology, Ecology, 24(1), 96–102.

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

Gutyj, B., Lavryshyn, Y., Binkevych, V., Binkevych, O., Paladischuk, O., Strons'kyj, J., & Hariv, I. (2016). Influence of "Metisevit" on the activity of enzyme and nonenzyme link of antioxidant protection under the bull's body cadmium loading. Scientific Messenger LNUVMBT named after S. Z. Gzhytskyj, 18(2), 52–58.

Gutyj, B., Paska, M., Levkivska, N., Pelenyo, R., Nazaruk, N., & Guta, Z. (2016). Study of acute and chronic toxicity of 'injectable mevesel' investigational drug. Biological Bulletin of Bogdan Chmelnitskiy Melitopol State Pedagogical University, 6(2), 174–180.

Hariv, M. I., & Gutyj, B. V. (2016). Vplyv liposomalnoho preparatu Butaintervit na proteinsyntezuvalnu funktsiiu pechinky shchuriv za otruiennia tetrakhlorметanom [Influence of the liposomal preparation Butaintervite on protein synthesis function in the livers of rats under the influence of carbon tetrachloride poisoning]. Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology, Medicine, 7(2), 123–126 (in Ukrainian).

Khariv, M., Gutyj, B., Butsyak, V., & Khariv, I. (2016). Hematolohichni pokaznyky orhanizmu shchuriv za umov oksydatsiinoho stresu ta za dii liposomalnoho preparatu [Hematological indices of rat organisms under conditions of oxidative stress and liposomal preparation action]. Biological Bulletin of Bogdan Chmelnitskiy Melitopol State Pedagogical University, 6(1), 276–289 (in Ukrainian).

Lavryshyn, Y. Y., Varkholyak, I. S., Martyschuk, T. V., Guta, Z. A., Ivankiv, L. B., Paladischuk, O. R., Murska, S. D., Gutyj, B. V., & Gufriy, D. F. (2016). The biological significance of the antioxidant defense system of animals' bodies. Scientific Messenger LNUVMBT named after S. Z. Gzhytskyj, 18(2), 100–111.

Li, D., Cai, H., Hou, M., & Fu, D. (2012). Effects of indoleamine 2,3-dioxygenases in carbon tetrachloride-induced hepatitis model of rats. Cell Biochemistry and Function, 30(4), 309–314.

Longo, V., Chirulli, V., Gervasi, P. G., Nencioni, S., & Pellegrini, M. (2007). Lisosan G, a powder of grain, does not interfer with the drug metabolizing enzymes and has a protective role on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. Biotechnology Letters, 29(8), 1155–1159.

Martyshuk, T. V., Gutyj, B. V., & Vishchur, O. I. (2016). Riven produktiv perekysnoho okysnennia lipidiv u krovi shchuriv za umov oksydatsiinoho stresu ta za dii liposomalnoho preparatu "Butaselmevit" [Level of lipid peroxidation products in the blood of rats under the influence of oxidative stress and under the action of liposomal preparation of "Butaselmevit"]. Biological Bulletin of Bogdan Chmelnitskiy Melitopol State Pedagogical University, 6(2), 22–27 (in Ukrainian).

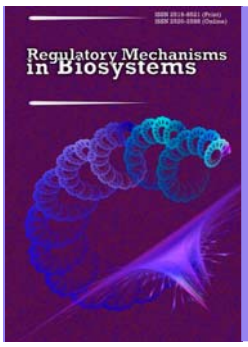
Sato, S., Dai, W., Liu, X.-L., & Asano, G. (1999). The protective effect of hepatocyte growth-promoting factor (pHGF) against carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats: An ultrastructural study. Medical Electron Microscopy, 32(3), 184–192.

Smolynets', I. B., Gutyj, B. V., Khariv, I. I., Petryshak, O. Y., & Lytvyn, R. I. (2016). Pharmaceutical marketing: Objectives and types. Scientific Messenger LNUVMBT named after S. Z. Gzhytskyj, 18(2), 151–154.

Vlizlo, V. V. (2012). Laboratorni metody doslidzhen u biolohiyi, tvarynnytstvi 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 (Hydroxyethyldimethyldihydropyrimidine) 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 Journal of Clinical Biochemistry, 14(1), 59–90.



Regulatory Mechanisms in Biosystems

ISSN 2519-8521 (Print)
ISSN 2520-2588 (Online)
Regul. Mech. Biosyst., 8(2)

Table of Contents

Shevchuk, S. V., Denyschych, L. P., & Marynych, L. I. Levels of C-terminal propeptide of type I procollagen and oxyproline in patients with systemic lupus erythematosus: The relationship between the course of the disease and the structural and functional state of bone tissue 105
Baskevich, O. V. Condition of erythrocyte membranes in people with mental and behavioural disorders caused by alcohol consumption 111
Popel', S. L. Structural changes in skeletal muscles in hypokinesia and physical loading in the posthypokinetic period of recovery of rats' organisms 118
Popel', S. L., Mytckan, B. M., Lapkovskyi, E. Y., Lisovskyi, B. P., Yatciv, Y. N., Zemskaya, N. O., Tyagur, R. S., Mytckan, T. S., Tkachivska, I. M., Kovalchuk, L. V., Leschak, O. N., Fayichak, R. I., Melnik, I. V., & Markiv, G. D. Mechanism of changing adaptation potential and morpho-biochemical parameters of erythrocytes in students with different modes of daily activity after physical loading 124
Popel', S. L., Kryzanivskaya, O. F., Zhurakivskyi, V. M., Chovhan, R. Y., Dutchak, U. N., Klipich, O. O., Klipich, Y. I., Knyazevich-Chorna, T. V., Sinitsa, A. V., Zemskaya, N. O., Melnik, I. V., Yatciv, Y. N., Lapkovskiy, E. Y., Lutckiy, Y. V., & Schovkova, N. I. Mechanism of damage to platelet and erythrocyte hemostasis in rats with prolonged hypokinesia 135
Postovitenko, K. P., Iliuk, I. A., Shevchuk, S. V., Bezsmertna, G. V., Bezsmertnyi, I. O., & Kurylenko, I. V. Hyperhomocysteinemia in patients with chronic kidney disease and its relationship with the functional status of the cardiovascular system 147
Ashcheulova, T. V., & Gerasimchuk, N. N. Peculiarities of the influence of antihypertensive therapy on endothelial function, oxidative stress and immune activation in obese patients 152
Fafula, R. V., Onufrovych, O. K., Iefremova, U. P., Melnyk, O. V., Nakonechnyi, I. A., Vorobets, D. Z., & Vorobets, Z. D. Glutathione content in sperm cells of infertile men 157
Kuryata, V. H., Rogach, V. V., Buina, O. I., Kushnir, O. V., & Buinyi, O. V. Impact of gibberelic acid and tebuconazole on formation of the leaf system and functioning of donor – acceptor plant system of solanaceae vegetable crops 162
Gavrilin, P. N., Gavrilina, O. G., & Kravtsova, M. V. The compartments of the parenchyma of the lymph nodes in the newborn bull calves of domestic cattle (*Bos taurus*) 169
Motsnyj, M. P., Botsva, N. P., Elina, O. V., Chernetchenko, D. V., Sadovskaya, L. Y., & Tykhomyrov, O. Y. Effect of external lighting on biopotential of maize leaves caused by pulsed temperature stimulation 179
Dyomshina, O. O., Ushakova, G. O., & Stepchenko, L. M. The effect of biologically active feed additives of humilid substances on the antioxidant system in liver mitochondria of gerbils 185
Gryshchenko, V. Biochemical properties of the plasma of rats with the experimentally induced hepatitis after oral administration of sodium diclofenac 191
Lysenko, Y. Myofascial syndrome as a pathogenetic mechanism for formation of scoliosis in people with multiple sclerosis 197
Shevchenko, T. M., Gazdyuk, P. V., Bondar, A. M., & Govoruha, O. Y. Immunohistochemical tests for diagnostics of infiltrative forms of breast cancer and identification of molecular subtype in women of different ages in Dnipro city 204
Shevchenko, T. N., Shcherbinina, M. B., Latsinska, S. A., & Diklenko, T. V. Recent epidemiological trends in HCV-infection in Ukraine 210
Maltseva, V. Effect of Pb exposure on the cells and matrix of the intervertebral disc of rats 217
Virych, P. A., Shelyuk, O. V., Kabanova, T. A., Khalimova, O. I., Martynyuk, V. S., Pavlovsky, V. I., & Andronati, S. A. Effect of 3-substituted 1,4-benzodiazepin-2-ones on maximal normalized rate of bradykinin-induced smooth muscle contraction in the presence of calcium channel blockers 224
Sokolenko, V. L., & Sokolenko, S. V. The interaction between lipid exchange and thyroid status in the conditions of prolonged influence of small doses of radiation 231
Skyba, O., Pshenychna, L., & Ustymenko-Kosorich, O. The features of vegetative regulation of the heart rate in athletes with different levels of perception and processing of visual information 239
Tretiak, T. O., Sokorenko, A. G., Dregval, I. V., & Severynovska, O. V. Analysis of brain bioelectric activity during verbal-logical thinking of biology students 244

Vorobey, E. S., Voronkova, O. S., & Vinnikov, A. I. Correction of vaginal dysbiosis in mice caused by a film-forming strain *Staphylococcus aureus*, using bacteriophages and probiotics 252
Lyhatskyi, P. H., Fira, L. S., Fira, D. B., & Kuzmak, I. P. Molecular mechanisms of metabolic disorders in the organs of rats of different ages affected by sodium nitrite in the context of tobacco intoxication 259
Yanko, R., Berezovskii, V., Chaka, E., Levashov, M., Plotnikova, L., & Litovka, I. Morphofunctional characteristics of hepatocytes after exposure to intermittent normobaric hypoxia in normotensive and hypertensive rats 265
Al Rawashdeh, M. S. M. Immunohistochemical and clinical changes in the respiratory tract of chickens, naturally infected with the fowlpox virus 271
Georgiyants, M. A., Pushkar, M. B., Vysotska, O. V., & Porvan, A. P. Optimization of postoperative analgesia after adenoidectomy in children 277
Nazarenko, M. M. The influence of radio-mimetic chemical mutagen on the chromosomal complex of winter wheat cells 283
Kizub, I. V., Kharchenko, O. I., Kostiuk, O. S., Ostapchenko, L. I., & Soloviev, A. I. Protein kinase C (PKC) involved in enhancement of α1-adrenoceptor-mediated responses of the main pulmonary artery in rats with diabetes mellitus 287
Shcherbatyy, A. G., Slivinska, L. G., Gutyj, B. V., Golovakha, V. I., Piddubnyak, A. V., & Fedorovuch, V. L. The influence of a mineral-vitamin premix on the metabolism of pregnant horses with microelemetosis 293
Chernenko, A. N., Chernenko, E. I., & Sanjara, R. A. The quality of colostrum and vitality of calves, born from cows with different reaction to stress experiences 299
Gutyj, B., Martyshchuk, T., Bushueva, I., Semeniv, B., Parchenko, V., Kaplaushenko, A., Magrelo, N., Hirkovyy, A., Musiy, L., & Murska, S. Morphological and biochemical indicators of blood of rats poisoned by carbon tetrachloride and subject to action of liposomal preparation 304