

Наведено експериментальні дані про особливості будови, розвитку і функціонування рослинних і тваринних організмів, флору і фауну України, одержані науковцями ННЦ "Інститут біології та медицини" та інших наукових установ. Викладено також нові дані про патофізіологічні закономірності й біохімічні механізми регуляції процесів на клітинному та органному рівнях після впливу різноманітних фізико-хімічних чинників.

Для викладачів, наукових співробітників, аспірантів і студентів.

Приведены экспериментальные данные об особенностях строения, развития и функционирования растительных и животных организмов, полученные учеными УНЦ "Институт биологии и медицины" и других научных учреждений. Изложены также новые данные о патофизиологических закономерностях и биохимических механизмах регуляции процессов на клеточном и органном уровнях после воздействия различных физико-химических факторов.

Для преподавателей, научных сотрудников, аспирантов и студентов.

The experimental dates development and function of the plant and animal organisms of ESC "Institute of Biology and medicine". Results of newly pathophysiological aspects and biochemical mechanisms of cell and organism processes regulation under the influence of different factors are presented.

For scientists, professors, aspirants and students.

ВІДПОВІДАЛЬНИЙ РЕДАКТОР	Л. І. Остапченко, д-р біол. наук, проф.
РЕДАКЦІЙНА КОЛЕГІЯ	Є. О. Торгалло, канд. біол. наук (відп. секр.); С. Є. Вакал, канд. біол. наук (техн. секр.); О. В. Жолос, д-р біол. наук, проф.; Брайон Каленгхем, д-р мед. наук, проф. (м. Кембридж, Велика Британія); Т. В. Берегова, д-р біол. наук, проф.; С. В. Пилипенко, д-р біол. наук, проф. (м. Полтава, Україна); М. Є. Дзержинський, д-р біол. наук, проф.; О. Я. Склярів, д-р мед. наук, проф. (м. Львів, Україна); Абенаволі Людовіко, д-р мед. наук (м. Катандзаро, Італія)
Адреса редколегії	ННЦ "Інститут біології та медицини"; просп. акад. Глушкова, 2а, Київ, Україна, 03127 ☎ (38044) 521-35-98; www.biovestnik.com; bulletin.vestnik@gmail.com
Затверджено	Вченою радою ННЦ "Інститут біології та медицини" 12.11.18 (протокол № 5)
Атестовано	Вищою атестаційною комісією України. Постанова Президії ВАК України № 1-05/3 від 14.04.10
Зареєстровано	Міністерством юстиції України. Свідоцтво про державну реєстрацію КВ № 16052-4524 Р від 09.11.09
Засновник та видавець	Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет". Свідоцтво внесено до Державного реєстру ДК № 1103 від 31.10.02
Адреса видавця	ВПЦ "Київський університет" (кімн. 43), 6-р Т. Шевченка, 14, Київ, Україна, 01601 ☎ (38044) 239 31 72, 239 32 22; факс 239 31 28
Журнал входить до наукометричних баз:	Index Copernicus (із 2012 р. ICV-2017 = 56,09), Cite Factor (із 2014 р.), Research Bible (із 2013 р.), Academic Keys (із 2013 р.), DOAJ (із 2013 р.), EBSCO.EJS (із 2012 р.), Free medical journals list of Geneva Foundation for Medical Education and Research (із 2014 р.); HINARI (із 2013 р.); Medical Journals Links (із 2013 р.); OAJI (із 2012 р.); The Knowledge Network (із 2014 р.); Ulrich's Periodicals Directory (із 2012 р.); WorldCat (із 2013 р.); E-Library.ru (із 2014 р.).

The experimental dates development and function of the plant and animal organisms of ESC "Institute of Biology and medicine". Results of newly pathophysiological aspects and biochemical mechanisms of cell and organism processes regulation under the influence of different factors are presented.

For scientists, professors, aspirants and students.

Наведено експериментальні дані про особливості будови, розвитку й функціонування рослинних і тваринних організмів, флору і фауну України, одержані науковцями ННЦ "Інститут біології та медицини" та інших наукових установ. Викладено також нові дані про патофізіологічні закономірності й біохімічні механізми регуляції процесів на клітинному та органному рівнях після впливу різноманітних фізико-хімічних чинників.

Для викладачів, наукових співробітників, аспірантів і студентів.

Приведены экспериментальные данные об особенностях строения, развития и функционирования растительных и животных организмов, полученные учеными УНЦ "Институт биологии и медицины" и других научных учреждений. Изложены также новые данные о патофизиологических закономерностях и биохимических механизмах регуляции процессов на клеточном и органном уровнях после воздействия различных физико-химических факторов.

Для преподавателей, научных сотрудников, аспирантов и студентов.

EDITOR-IN-CHIEF	Ostapchenko Lyudmila, D. Sci., Prof.
EDITORIAL BOARD	Torgalo Elizabeth, PhD; Sergii Vakal, PhD (Tech. Editor); Alexander Zholos, D. Sci., Prof.; Brian Callingham, D. Sci., M. D., Prof. (Cambridge, United Kingdom); Tetiana Berehova, D. Sci., Prof.; Sergey Pilipenko, D. Sci., Prof. (Poltava, Ukraine); Mykola Dzerzhynskiy, D. Sci., Prof.; Olexandr Sklyarov, D. Sci., M. D., Prof. (Lviv, Ukraine); Ludovico Abenavoli, PhD, M. D., Assoc. Prof. (Catanzaro, Italy)
Editorial address	ESC "Institute of Biology and Medicine", 2a, acad. Glushkov av., Kyiv, 03127, Ukrainian ☎ (38044) 521 35 98; www.biovestnik.com; bulletin.vestnik@gmail.com
Approved by	The Academic Council of the ESC "Institute of Biology and Medicine" 12.11.18 (Protokol № 5)
Attested by	Higher Attestation Commission of Ukraine HAC Presidio decree № 1-05/3 (April 14th, 2010)
Registered by	Ministry of Justice of Ukraine. Registration certificate KV № 16053-4524 ПП (November 9th, 2009)
Founded and Published	Kyiv National Taras Shevchenko University, Kiev, Ukraine, Publishing and Printing Center "Kiev University". The certificate is entered in the State Register DK № 1103 (October 31th 2002)
Publisher's Address	Publishing and Printing Centre "Kiev University" (off. 43), 14 Taras Shevchenko av., Kiyv, 01601, Ukraine ☎ (38044) 239 31 72, 239 32 22; Fax: 239 31 28
Abstracted and Indexed:	Index Copernicus (of 2012. ICV-2017 = 56,09), Cite Factor (of 2014), Research Bible (of 2013). Academic Keys (of 2013), DOAJ (of 2013), EBSCO.EJS (of 2012), Free medical journals list of Geneva Foundation for Medical Education and Research (of 2014); HINARI (of 2013 of); Medical Journals Links (of 2013); OAJI (of 2012); The Knowledge Network (of 2014); Ulrich's Periodicals Directory (of 2012); WorldCat (of 2013); E-Library.ru (of 2014).

Раєцька Я.

Морфологічно-функціональні характеристики стравоходу за умов лужного опіку стравоходу 2 ступеня та при введенні екстаку стручків *PHASEOLUS VULGARIS*

Дорофєєва Г.

Морфологічні особливості слизової оболонки товстої кишки хворих із раннім та пізнім дебютом неспецифічного виразкового коліту

Блохіна О., Кот Л., Торгалю Є., Дворченко К.

Концентрація с-реактивного білка та молекул низької та середньої молекулярної маси у сироватці крові щурів за умов каррагінан-індукованого запалення та тривалого профілактичного введення хондроїтина сульфату

Войцехівський В., Андрусик А., Васківський Б., Войцехівська О., Васківська С., Токар А.

Біологічна цінність плодів малини

Куценко Т., Насєдкін Д., Латишенко Л., Гавриленко М.

Зв'язок успішності вивчення іноземної мови зі швидкістю міжпівкульного перенесення інформації

Цуварєв О., Коломієць Л., Засць В., Блащак І., Корнєлюк О.

Виділення та характеристика мутантного N-кінцевого каталітичного модуля тирозин-тРНК синтетази В. TAURUS із заміною Trp 87 та Trp 283 на аланін

Калмикова О., Кушмирук Т., Держинський М.

Вплив введення мелатоніну в певний час доби на нирки щурів із ожирінням, індукованим висококалорійною дієтою

Кондратюк Т., Берегова Т., Акуленко Т., Торгалю Є., Верещака В.

Синтез меланіну чорними дріжджами *PSEDONADSONIELLA BRUNNEA*: залежність від кількості L-тирозину в культуральному середовищі

Дмитрик В., Савчук О., Андрійченко І.

Вміст металоматричних протеїназ у пухлині раку сечового міхура

Вовк А., Кот Л., Короткий О., Дворченко К.

Окисна модифікація білків у сироватці крові щурів за умов експериментального остеоартрозу та тривалого введення мультипробіотика

Видавничо-опублікаційний Центр
"Київський університет"
Версія не для друку

СОДЕРЖАНИЕ

Раецкая Я.

Морфофункциональные характеристики пищевода в условиях щелочного ожога пищевода 2 степени и при введении экстракта стручков *PHASEOLUS VULGARIS*.....

Дорофеева А.

Морфологические особенности слизистой оболочки толстой кишки больных с ранним и поздним дебютом неспецифического язвенного колита.....

Блохина О., Кот Л., Торгалю Е., Дворченко Е.

Концентрация С-реактивного белка и молекул низкой и средней молекулярной массы в сыворотке крови крыс в условиях каррагинан-индуцированного воспаления и длительного профилактического введения хондроитина сульфата.....

Войцеховский В., Андрусик А., Васьковский Б., Войцеховская О., Васьковская С., Токаръ А.

Биологическая ценность плодов малины.....

Куценко Т., Наседкин Д., Латишенко Л., Гавриленко М.

Связь успеваемости в изучении иностранного языка со скоростью межполушарного переноса информации.....

Цуварев А., Коломиец Л., Заец В., Блащак И., Корнелюк А.

Выделение и характеристика мутантного N-концевого каталитического модуля тирозил-тРНК синтетазы *B. TAURUS* с заменой Trp 87 и Trp 283 на аланин.....

Калмыкова О., Кушмирук Т., Дзержинский Н.

Влияние введения мелатонина в определенное время суток на почки крыс с ожирением, индуцированным высококалорийной диетой.....

Кондратюк Т., Береговая Т., Акуленко Т., Торгалю Е., Верещак В.

Синтез меланина черными дрожжами *PSEDONADSONIELLA BRUNNEA*: зависимость от количества L-тирозина в культуральной среде.....

Дмитрик В., Савчук А., Андрийченко И.

Содержание металоматричных протеиназ в опухолях при раке мочевого пузыря.....

Вовк А., Кот Л., Короткий А., Дворченко Е.

Окислительная модификация в сыворотке крови крыс в условиях экспериментального остеоартроза и длительного введения мультипробиотика.....

Видавничо-дистрибуційний Центр
"Київський університет"
Версія не для друку

CONTENTS

Raetska Ya.

Effect of an aqueous extract of *PHASEOLUS VULGARIS* pods
on morphological properties of post burn esophagus.....

Dorofeeva A.

Morphological features of the mucous membrane of the colon patients
with early and late ulcerative colitis debut

Blokhina O., Kot L., Torgalo Ie., Dvorshchenko K.

C-reactive protein and medium weight molecules concentration in serum
of rats under conditions of carrageenan-induced inflammation
and prolonged prophylactic administration of chondroitin sulfate

Voitsekhivskiy V., Andrusyk A., Vaskivskiy B., Voitsekhivska O., Vaskivska S., Tokar A.

Biological value fruits of raspberry.....

Kutsenko T., Nasiedkin D., Latyshenko L., Gavrylenko M.

Relation of success in study of foreign language
with speed of interhemispheric transfer of information

Tsvarev O., Kolomiets L., Zayets V., Blaszcak I., Kornelyuk A.

Isolation and characterization of the mutant N-terminal catalytical module
of the *B. TAURUS* tyrosyl-tRNA synthetase with the replacement of Trp 87 and Trp 283 by alanine

Kalmukova O., Kushmyruk T., Dzerzhynsky M.

The effects of melatonin administration in determined times of day on the kidney
in rats with high-calorie diet-induced obesity

Kondratiuk T., Beregova T., Akulenko T., Torgalo Ie., Vereschaka V.

Melanin synthesis by black yeast-like fungi *PSEDONADSONIELLA BRUNNEA*:
dependence of L-tyrosine quantity in the cultural medium.....

Dmytryk V., Savchuk O., Andriychenko I.

The content of matrix metalloproteinases in bladder cancer tumors

Vovk A., Kot L., Korotkyi O., Dvorshchenko K.

Oxidative modification of proteins in rat serum under experimental osteoarthritis and long-term administration of
multiprobiotic

Видавничо-опублікаційний центр
"Київський університет"
Версія не для друку

МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ СТРАВОХОДУ ЗА УМОВ ЛУЖНОГО ОПІКУ СТРАВОХОДУ 2 СТУПЕНЯ ТА ПРИ ВВЕДЕННІ ЕКСТРАКТУ СТРУЧКІВ *PHASEOLUS VULGARIS*

*Найрозповсюдженіше хімічне пошкодження у дітей – опік стравоходу, виникає при випадковому ковтанні речовин, які мають у своєму складі луги, кислоти або інші їдкі хімічні речовини. Глибина опіку залежить від концентрації та часу контакту слизової оболонки з уражуючим агентом. У результаті проникнення лугів і контакту зі стінкою стравоходу разом із некрозом відбувається пошкодження слизової, підслизової та м'язової оболонки стравоходу. Незважаючи на велику кількість ліків, які були випробувані при лікуванні ускладнень, викликаних опіками стравоходу, небагато інформації, яка б указувала про високу ефективність застосованих раніше препаратів. Аналіз даних літератури свідчить про позитивний вплив поліфенолів натурального походження на нормалізацію фізіологічних та біохімічних параметрів за різних патологій. Екстракт стручкові квасолі звичайної (*Phaseolus vulgaris* pods extract (PVPE)) є прикладом багатого на біоактивні компоненти джерела з корисними характеристиками для людини. Тому метою нашої роботи було дослідити вплив екстракту стручкові квасолі звичайної на загоєння постопікових ран. При морфологічній характеристиці змін стравоходу за умов лужного опіку стравоходу 2 ступеня було показано, що на першу добу експерименту спостерігається порушення слизової оболонки, що виявляється у руйнуванні багатошарового епітелію, а саме в підслизовій оболонці відбувається помітне накопичення лейкоцитів, лейкоцитарна інфільтрація фіксується в частково зруйнованому м'язовому шарі. На 31 добу при дослідженні у групі тварин із опіком стравоходу відбувається певне відновлення цілісності слизової стравоходу, переважно із гіперплазією; спостерігається також зменшення присутності лейкоцитів; проте помітне розростання сполучної тканини в підслизовій оболонці, що може вказувати на формування рубця. Дані морфологічного опису підтверджуються морфометричними параметрами брахунку індексу стенозу. При використанні екстракту квасолі за умов лужного опіку було помічено покращення морфофункціонального стану стравоходу щурів: сформований сполучнотканинний рубець значно не впливає на індекс стеноза (його значення займає проміжне положення); високий рівень лейкоцитарної інфільтрації знижується до контрольних показників, що може вказувати на виражений терапевтичний ефект екстракту стручкові квасолі при лужних опіках стравоходу.*

Ключові слова: лужний опік стравоходу, гістологія, квасоля.

Вступ. Найрозповсюдженіше хімічне пошкодження у дітей – опік стравоходу, виникає при випадковому ковтанні речовин, які мають у своєму складі луги, кислоти або інші їдкі хімічні речовини. Глибина опіку залежить від концентрації та часу контакту слизової оболонки з уражуючим агентом. ЛОС у зв'язку з утворенням коагуляційного некрозу є більш небезпечним порівняно з утворенням сухого струпа, що має місце за умов кислотного опіку [13]. У дітей при хімічному опіку стравоходу частіше трапляється опіковий шок та летальні випадки [17]. Опікова хвороба та синдром поліорганної недостатності, до якого вона призводить, є актуальною проблемою сучасної медицини. Ушкодження нирок та легень, які найчастіше зустрічаються у структурі синдрому поліорганної недостатності, виникають унаслідок розвитку шоківих змін та дії ендогенних токсинів [13].

Процес загоєння зазвичай починається через три тижні після прийому ушкоджувального агенту. Саме в цей час (перші три тижні) найвищий рівень перфорації стравоходу. Із цієї причини рекомендовано уникати ендоскопії між 5-тою і 15-тою добою після прийому каустичної речовини [8]. До третього тижня відбувається утворення нової тканини і цей процес може тривати ще кілька місяців, поки не відбудеться утворення структури. У процесі загоєння також знижується тиск нижнього сфінктера стравоходу, що викликає підвищену частоту та тяжкість кислотного рефлюксу, це ще більше посилює наявні ураження слизової оболонки та прискорює утворення стриктури [9].

У сучасному світі частота отруєнь унаслідок прийому корозивних агентів продовжує зростати. Хімічні опіки є найбільш частою патологією стравоходу у дітей [6–7; 10]. У результаті проникнення лугів і контакту зі стінкою стравоходу разом із некрозом відбувається пошкодження слизової, підслизової та м'язової оболонки стравоходу [20; 22–23]. Незважаючи на велику кількість ліків, які були випробувані при лікуванні ускладнень, викликаних опіками стравоходу, небагато інформації, котра б указувала про високу ефективність застосованих раніше препаратів [2–3; 10; 14].

Аналіз даних літератури свідчить про позитивний вплив поліфенолів натурального походження на нормалізацію фізіологічних та біохімічних параметрів за різних патологій [15]. Екстракт стручкові квасолі звичайної (*Phaseolus vulgaris* pods extract (PVPE)) є прикладом багатого на біоактивні компоненти джерела з корисними характеристиками для людини.

Тому метою нашої роботи було дослідити вплив екстракту стручкові квасолі звичайної на загоєння постопікових ран.

Матеріали і методи. Моделювання опіку. У досліджах використовували білих нелінійних статевонезрілих щурів (одномісячних) масою 90–110 г (відповідають 1-4-річному віку дітей) із дотриманням загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (вересень, 2001), інших міжнародних угод і національного законодавства в цій галузі. Тварин утримували на стандартному раціоні віварію. Опік стравоходу моделювали введенням 0,2 мл 20-відсоткового розчину NaOH, що відповідає 2 ступеню опіку. Для цього вводили зонд у стравохід запаяним торцем і отвором на відстані 2 мм від нього. Зонд вводили на глибину 4 см від верхніх різців щура та повільно вводили 0,2 мл 20-відсоткового NaOH, таким чином відтворюючи 2 ступінь опіку. Контрольним щурам одноразово перорально вводили відповідний об'єм води для ін'єкцій [19]. Тварин утримували на стандартному раціоні віварію.

Формування груп. Тварини були розділені на 4 групи: група 1 (G1) – інтактні контрольні тварини (пероральне введення фізіологічного розчину у відповідній дозі та терміни), група 2 (G2) – контрольні тварини, котрим вводили екстракт, починаючи із 2 доби досліді в об'ємі 1 мг/кг протягом 31 доби. Група 3 (G3) – лужний опік стравоходу 2 ступеня, які споживали воду. Група 4 (G4) – група з лужним опіком стравоходу 2 ступеня, яким вводили екстракт починаючи із 2 доби досліді в об'ємі 1 мг/кг протягом 31 доби.

Отримання екстракту стручків квасолі звичайної. Для приготування екстракту 132 г подрібненого сухого лущиння квасолі звичайної заливали 1 л окропу [15]. Посудину щільно закривали і настоювали на киплячій водянній бані протягом 15 хв. Потім екстракт охолоджували при кімнатній температурі 25° С. Отриманий екстракт фільтрували через кілька шарів марлі та центрифугували при 1000 г протягом 10 хв для позбавлення грубих залишків рослинної сировини. Надосад заморозували, після чого висушували шляхом ліофілізації. У результаті описаних вище маніпуляцій отримали 8 г сухого екстракту, який зберігали при -20° С. У дослідженнях використовували свіжеприготовані водні розчини сухого екстракту.

Отримання біологічного матеріалу. Методом виведення тварин із досліді була цервікальна дислокація. Сироватку крові та тканини стравоходу для дослідження отримували на 7, 15, 21 та 31 добу, які відповідають стадіям опікової хвороби [12].

Гістологічне дослідження. Стравоходи виділяли цілими, розділяли на 3 частини (початок, середина, кінець) та фіксували в 4-відсотковому розчині параформальдегіду на 0,1 м фосфатному буфері протягом 72 год, після чого зневоднювали та заливали в парафін у вертикальній орієнтації за загальноприйнятою методикою. Із парафінових блоків на мікротомі виготовляли зрізи товщиною 5 мкм, які потім фарбували гематоксиліном Бемера та еозином. Подальше дослідження препаратів проводили за допомогою світлового мікроскопа BX41 ("Olympus", Японія). Мікрофотографії отримували з використанням цифрової камери "DP20" ("Olympus", Японія) та програмного забезпечення "Quick PHOTO MICRO" ("Promicra", Чехія).

Як критерії морфофункціональних змін стравоходу використовували індекс стеноза (ІС), який рахували за стандартною формулою $ІС = (\text{товщина стінки стравоходу} / \text{діаметр просвіту})$ [4]. Результати включали вимірювання товщини стінки та діаметра просвіту стра-

воходу в чотирьох окремих місцях. Усі параметри отримували з використанням програми ImageJ (National Institutes of Health, США).

Гістологічна оцінка рівня запалення у стравоході проводилась за загальноприйнятою [11] напівкількісною бальною шкалою наявності лейкоцитарної інфільтрації: відсутність – 0, незначна – 1, середня – 2, помітна – 3. Для оцінки досліджували принаймні п'ять аналогічних областей на кожному зрізі.

Статистична обробка результатів досліджень. Отримані дані тестували на нормальне розподілення за допомогою тесту Шапіро-Вілка з використанням програмного пакету GraphPad Prism 5.04 (GraphPad Software Inc., США). Подальший обрахунок результатів відбувався за допомогою двофакторного дисперсійного аналізу (two-way ANOVA) із посттестом Бонферонні. Отримані результати наведено у вигляді середнього арифметичного \pm середньоквадратичне відхилення (дисперсія) – SD. Результати вважали значущими, коли $p \leq 0,05$.

Результати і обговорення. На першу добу після моделювання лужного опіку стравоходу (ЛОС) для встановлення ступеня ураження стравоходу було проведено гістологічне дослідження (рис. 1). У контрольній групі багат шаровий плоский не зроговілий епітелій утворює слизову оболонку (рис. 1, А); під нею розташовується підслизова основа зі сполучної тканини, що також містить у собі власні залози стравоходу; третя оболонка – м'язова, що складається із внутрішнього циркулярного та зовнішнього повздожнього шарів; під м'язовою оболонкою розміщується адвентиційна. Після ЛОС на першу добу спостерігається порушення слизової оболонки (рис. 1, Б, стрілки), що виявляється у руйнуванні багат шарового епітелію. Крім цього, у підслизовій оболонці відбувається помітне накопичення лейкоцитів (рис. 1, Б, зірочки). Також лейкоцитарна інфільтрація фіксується в частково зруйнованому м'язовому шарі. Описані зміни відповідають другому ступеню ураження стравоходу.

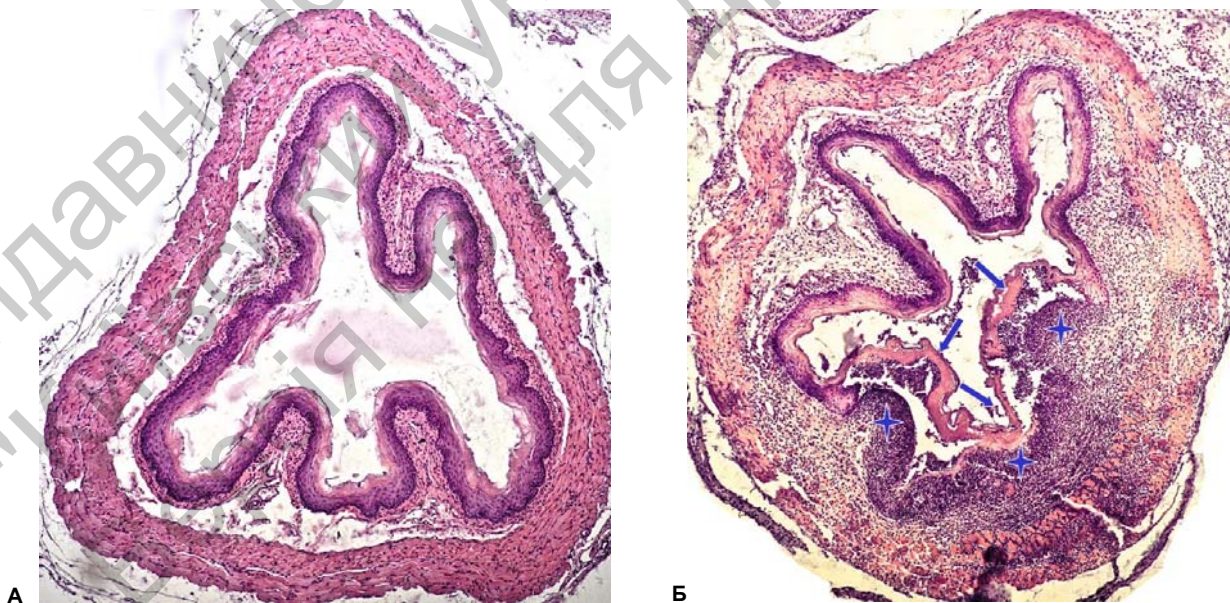


Рис. 1. Мікрофотографії зрізів стравоходу контрольної (А) та групи ЛОС 1 доба (Б).

Гематоксилін-еозин, ок. 10 х об. 10, панорамне зображення. Позначення: зірочки – інфільтрація лейкоцитами, стрілки – руйнування епітелію слизової оболонки

На сьому добу (рис. 2) після моделювання ЛОСГЗ (рис. 2, Б) спостерігається незначне часткове відновлення цілісності епітелію слизової оболонки – патологі-

чна регенерація з утворенням грануляційної тканини [1] із помітним збереженням лейкоцитарної інфільтрації в усіх трьох оболонках, що свідчить про продовження

активної фази запалення. У групі G4 щури з ЛОС, які отримували екстракт квасолі (рис. 2, Г) також помічали ураження слизової з аналогічним утворенням грануля-

ційної тканини, що є показником запуску механізмів загоєння та присутністю значної кількості лейкоцитів.

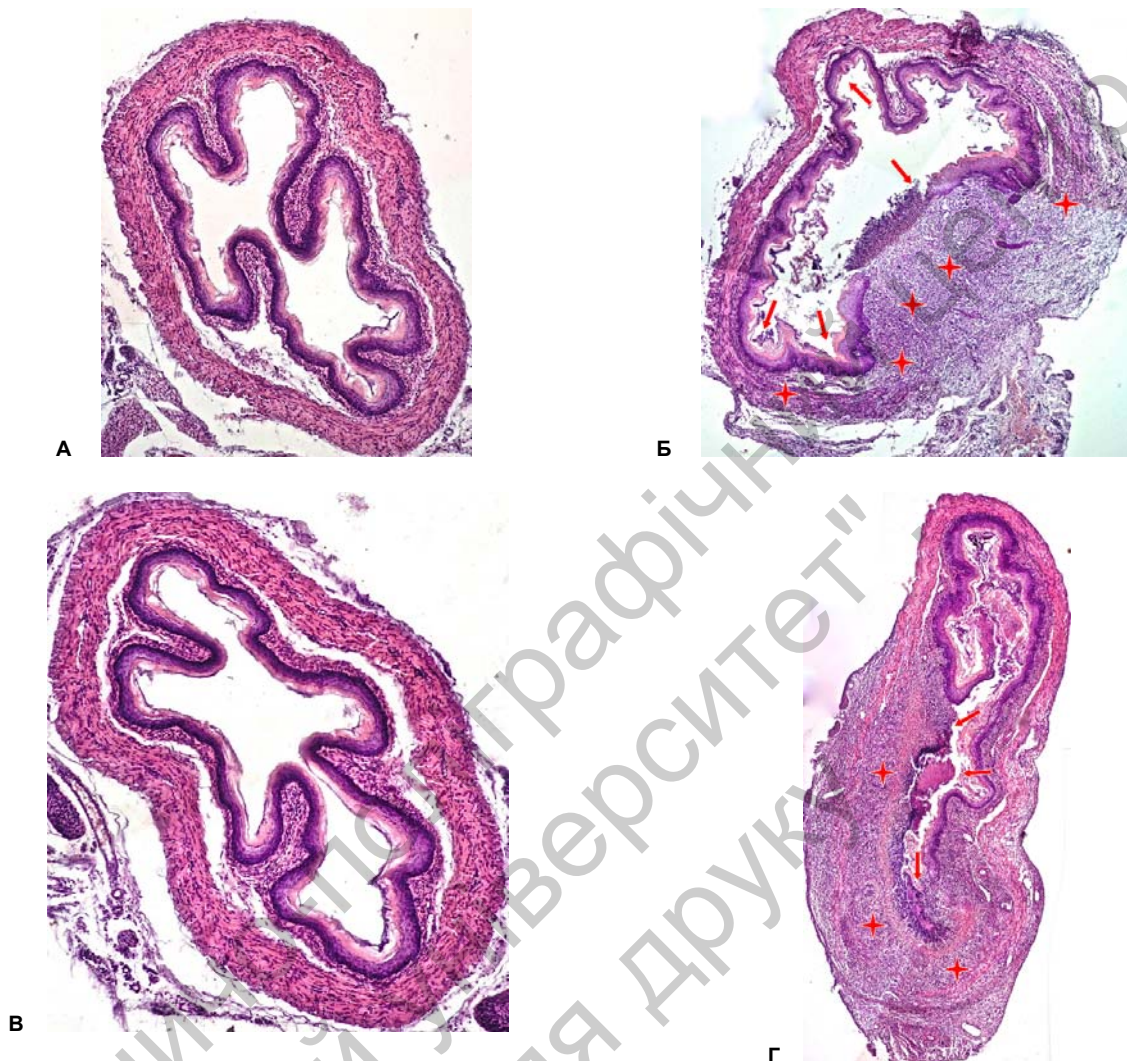


Рис. 2. Мікрофотографії зрізів стравоходу на сьому добу дослідження: G1 (А), G3 (Б), G2 (В), G4 (Г). Гематоксилін-еозин, ок. 10 х об. 10, панорамне зображення. Позначення: зірочки – інфільтрація лейкоцитами, стрілочки – руйнування епітелію слизової оболонки

На 15 добу у груп G3 та G4 помічали зниження присутності лейкоцитів (зникнення їх із м'язової оболонки) та часткову регенерацію епітелію слизової.

На 21 добу (рис. 3) при дослідженні у групі з ЛОС (рис. 3, Б) відбувається певне відновлення цілісності слизової стравоходу, навіть у деяких місцях із невеликою гіперплазією; спостерігається також зменшення наявності лейкоцитів; проте характерне розростання сполучної тканини у підслизовій оболонці.

У групі G4 після моделювання ЛОС (рис. 3, Г) відбувається повне відновлення структури слизової оболонки до нормального стану, незначне збільшення сполучної тканини у підслизовій основі та малопомітна наявність лейкоцитів.

На 31 добу експерименту в усіх групах спостерігається цілісний епітелій слизової оболонки, зникнення лейкоцитарної інфільтрації. Проте для групи з ЛОС характерне утворення рубця [18], тобто розростання в підслизовому шарі сполучної тканини. На противагу

цьому, у групі G4 розростання сполучної тканини відбувається меншою мірою.

Дані морфологічного опису підтверджуються морфометричними параметрами обрахунку індексу стенозу (ІС, рис. 4).

На сьому добу в щурів у групі G3 ІС достовірно збільшується в 3,5 рази порівняно до контрольної групи G1, а у щурів групи G4 цей показник зростав тільки в 1,7 разів. Таке швидке звуження просвіту стравоходу обумовлюється гострою фазою запалення та набряком [5].

На 14 добу експерименту в G3 ІС достовірно зменшувався на 38 %, а у групі G4 – на 61 % (порівняно з контрольною групою). Це може бути пояснено такими чинниками: зникненням набряку; відповідно розширенням просвіту стравоходу через зруйнування частини його стінки лугом (слизової, підслизової) та частково м'язової оболонки, тобто їх відсутністю; поступовим включенням механізмів регенерації великих зон уражень [16].

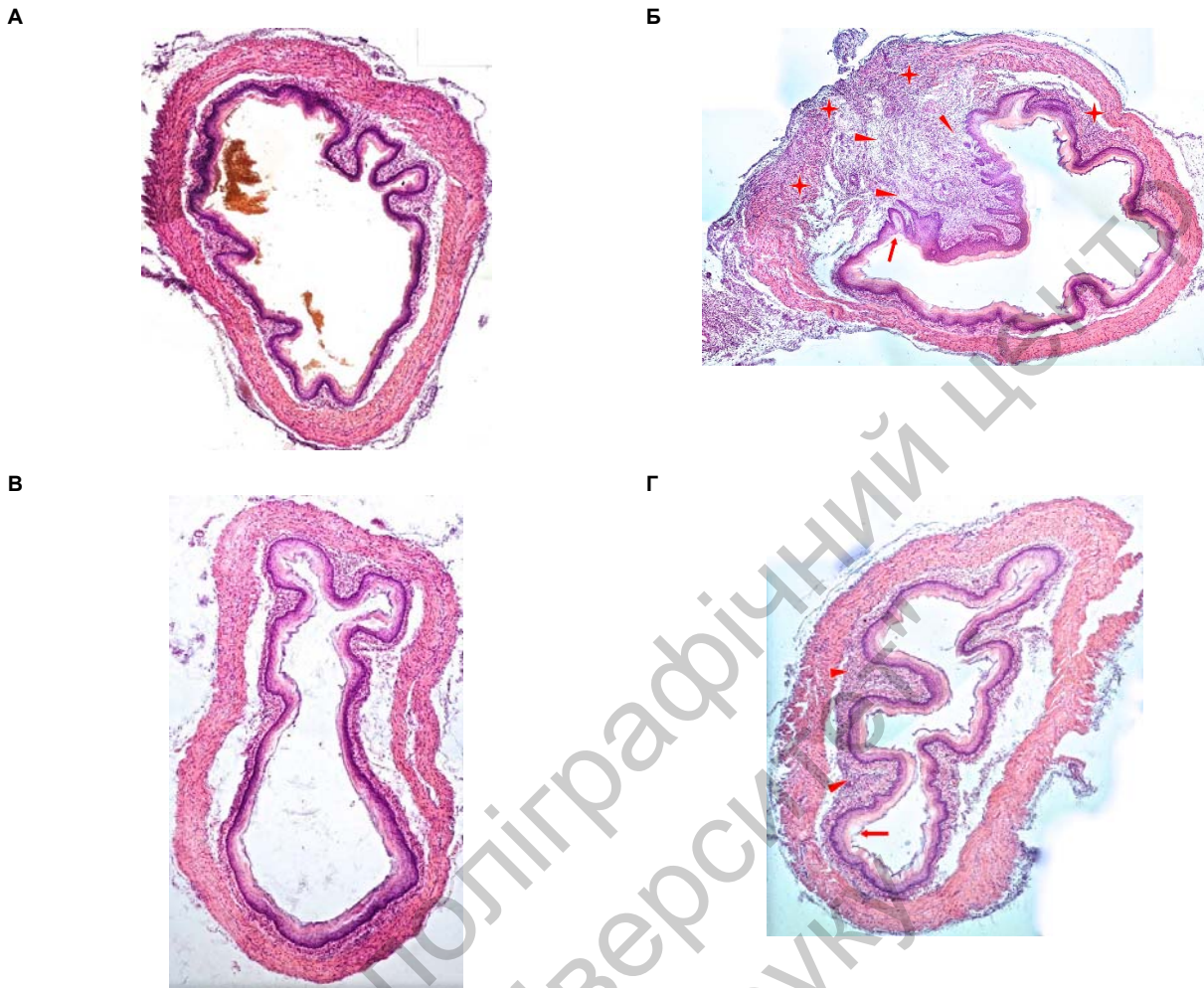


Рис. 3. Мікрофотографії зрізів стравоходу на 21 добу експерименту: G1 (А), G3 (Б), G2 (В), G4 (Г). Гематоксилін-еозин, ок. 10 х об. 10, панорамне зображення. Позначення: зірочки – інфільтрація лейкоцитами, стрілки – руйнування епітелію слизової оболонки, маркер – розростання сполучної тканини

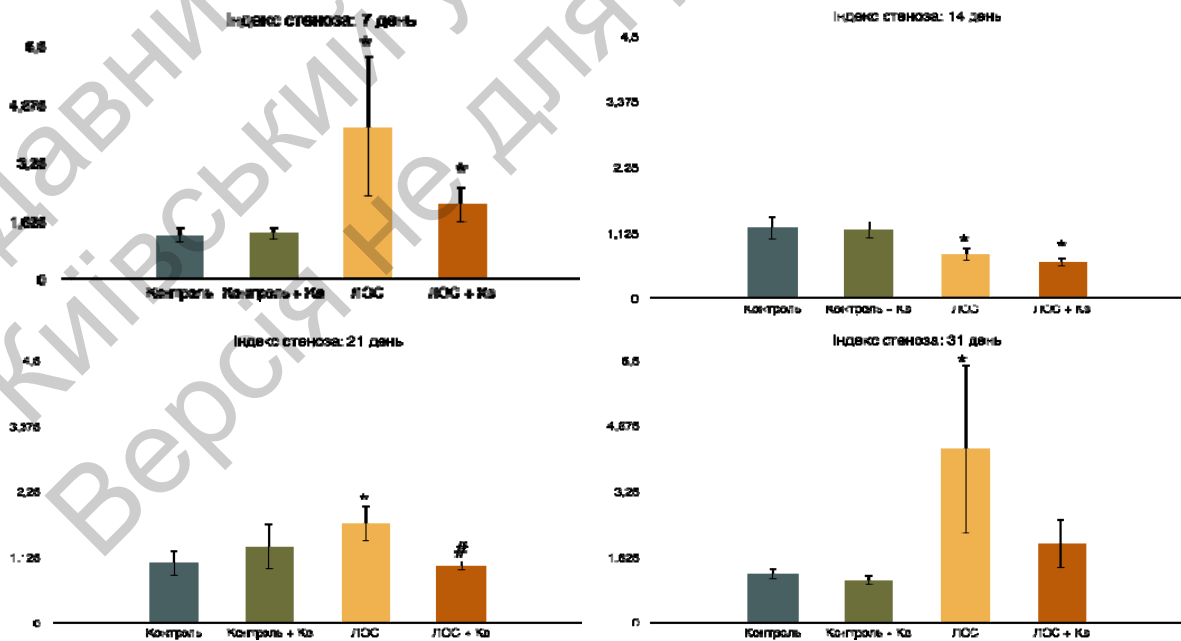


Рис. 4. Дані морфометричного аналізу індексу стенозу стравоходу на 7, 14, 21 та 31 добу експерименту

* – $p \leq 0,05$ порівняно із контрольною групою G1; # – $p \leq 0,05$ порівняно G4 з G3.

На 21 добу дослідження ІС у групі G3 зріс на 66 %, у той час як у групі G4 достовірних змін від групи контролю не було зафіксовано, на протипагу цьому зазначили зменшення ІС на 43 % порівняно із групою G3.

На 31 добу експерименту спостерігали ще більш виражене зростання ІС у G3 – у 4 рази, причому в групі G4 достовірних змін порівняно з контрольною групою виявлено не було, проте значення ІС зазначеної групи

порівняно із G3 також значних відмінностей не показало. Тобто, після моделювання опіку на 31 день спостерігається надмірний розвиток сполучної тканини (поява рубця), що зменшує просвіт стравоходу, у той самий час застосування екстракту квасолі призводить до розвитку рубця, який значним чином не впливає на ІС (показано проміжне значення ІС порівняно із G1 та G3).

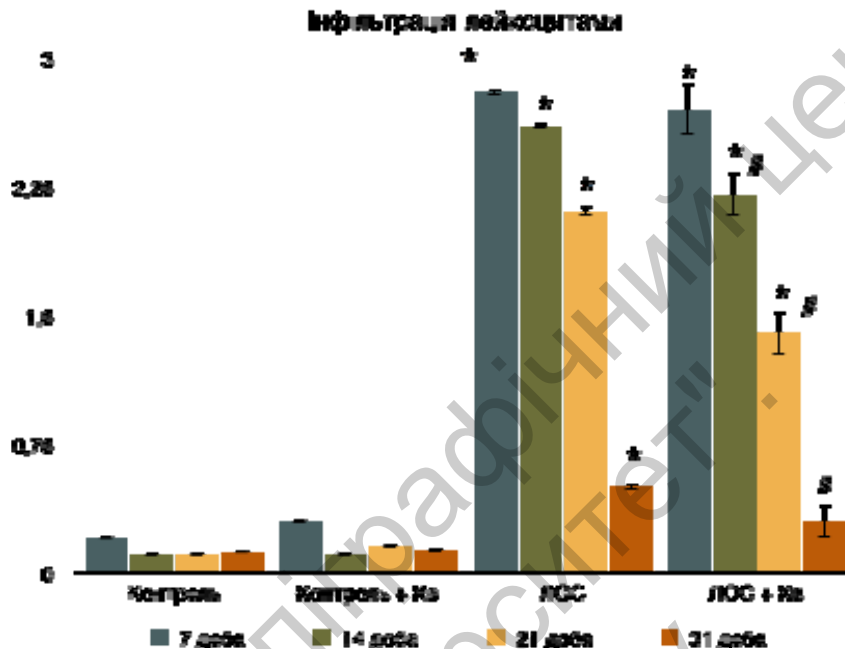


Рис. 5. Дані показника інфільтрації лейкоцитами стравоходу на 7, 14, 21 та 31 добу експерименту

* – $p \leq 0,05$ порівняно з контрольною групою; # – $p \leq 0,05$ порівняно G4 із G3.

Одним із показників перебігу запалення є присутність лейкоцитів зони ураження (рис. 5) [21]. За нормальних умов в органі є невелика присутність лейкоцитів (напр., тканинних макрофагів). Екстракт квасолі не впливає на кількість лейкоцитів у стравоході. При моделюванні ЛОС 2-го ступеня зазначається висока інфільтрація лейкоцитами в усіх трьох оболонках стравоходу протягом 31 доби експерименту (7 доба – найбільша кількість, яка поступово до 31 доби знижується, проте не досягає контрольного рівня). У групі G4 також спостерігали активну інфільтрацію лейкоцитами, проте починаючи із 14 доби дослідження цей показник був достовірно менший за рівень інфільтрації порівняно з групою G3, причому на 31 добу він зменшився до контрольного рівня.

Для перевірки на безпечність споживання екстракту квасолі інтактними тваринами було проаналізовано аналогічні параметри для групи щурів без ЛОС, що споживала екстракт квасолі (G2). На сьому добу споживання екстракту квасолі (рис. 2, В) не приводило до змін морфології стравоходу порівняно із контрольною групою (рис. 2, А). Навіть при її споживанні упродовж 21 доби (рис. 3, В) морфофункціональний стан стравоходу не відрізнявся від стану контрольної групи (рис. 3, А). Уведення екстракту квасолі звичайним щурам достовірно не приводило до змін ІС стравоходу порівняно із контрольною групою протягом усієї тривалості експерименту (рис. 4). Крім цього, показники лейкоцитарної інфільтрації також не показали достовірних змін (рис. 5).

Отримані результати показали, що за умов ЛОС 2 ступеня станом на 1 добу спостерігається порушення слизової оболонки, що виявляється у руйнуванні бага-

тошарового епітелію, на 31 добу відбувається певне відновлення цілісності слизової стравоходу, проте спостерігається надмірне розростання сполучної тканини в підслизовій оболонці. Дані морфологічного опису підтверджуються морфометричними параметрами обчислення індексу стеноза. При використанні екстракту квасолі за умов ЛОС було відмічено покращення морфофункціонального стану стравоходу щурів, що може вказувати на виражений терапевтичний ефект екстракту стручків квасолі при лужних опіках стравоходу.

Список використаних джерел:

1. Adam A. B. Local effects of epidermal growth factor on the wound healing in esophageal anastomosis: An experimental study / A. Adam, M. Özdamar, H. Esen and others // International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology. – 2017. – № 99. – С. 8–12.
2. A. Bautista. Effects of prednisolone and dexamethasone in children with alkali burns of the oesophagus / A. Bautista, R. Varela, A. Villanueva // Eur J Pediatr Surg. – 1996. – № 6. – С. 198–203.
3. Cakmak M. The effect of corticosteroids and pentoxifylline in caustic esophageal burns. A prospective trial in rats / M. Cakmak, A. Nayci, N. Renda // Int Surg. – 1997. – № 82. – С. 371–375.
4. Cerit K. The Effect of Antifibrotic Drug Halofuginone on Caustic Oesophageal Injury in Rats / K. Cerit, B. Karakoyun, E. Bahadır and others // Esophagus. – 2018. – № 15. – С. 59–68.
5. Çiftçi Ö. The diagnostic utility of scintigraphy in esophageal burn: a rat model / Ö. D. Çiftçi // Journal of surgical research. – 2016. – № 2. – С. 495–500.
6. Cruz R. Chemical burns in children: Aetiology and prevention / R. Cruz, T. Pang, J. Harvey and others // Burns. – 2015. – № 41. – С. 764–769.
7. Contini S. Oesophageal corrosive injuries in children: a forgotten social and health challenge in developing countries / S. Contini, A. Swarray-Deen, C. Scarpignato // Bull. World Health Organ. – 2009. – № 87. – С. 950–954.
8. Chibishev A. Post-corrosive injuries of upper gastrointestinal tract / A. Chibishev, N. Simonovska, A. Shikole // Prilozi. – 2010. – № 31. – С. 297–316.

9. Contini S. Caustic injury of the upper gastrointestinal tract: a comprehensive review / S. Contini, C. Scarpignato // World J Gastroenterol. – 2013. – № 19. – С. 3918–3930.
10. Demirbilek S. Effects of estradiol and progesterone on the synthesis of collagen in corrosive esophageal burns in rats / S. Demirbilek, F. Bernay, R. Rizalar // J Pediatr Surg. – 1994. – № 29. – С. 1425–1428.
11. Dunbar K.B. Association of Acute Gastroesophageal Reflux Disease With Esophageal Histologic Changes / K. B. Dunbar, A. T. Agoston, R. D. Odze and others // JAMA. – 2016. – 315: 2104–2112.
12. Fistal E. Combustiology / E. Fistal, G. Kozinets, G. Samoilenko. – Kharkov, 2004.
13. Karaman İ., Orhan Koç, Ayşe Karaman. Evaluation of 968 children with corrosive substance ingestion // Indian J Crit Care Med. 2015; 19(12): 714–718.
14. Koltuksuz U. Effects of caffeic acid phenethyl ester and epidermal growth factor on the development of caustic esophageal stricture in rats / U. Koltuksuz, H. Mutuş, R. Kutlu and others // J Pediatr Surg. – 2001. – № 36. – С. 1504–1509.
15. Kyznetsova M. Effect of aqueous extract from Phaseolus vulgaris pods on lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in the liver and kidney of diabetic rats / M. Kyznetsova, O. Makieieva, D. Lavrovska та ін. // J Appl Pharm Sci. – 2015. – № 5. – С. 1–6.
16. Kraft R. Patient With Scald Burn of the Esophagus / R. Kraft, K. Jensen, M. Jeschke та ін. // Journal of Burn Care & Research. – 2017. – № 3. – С. 468–470.
17. Öztoran C. The outcomes of becoming a pediatric burn center in Turkey / C. Öztoran, S. Demir // Ulus Travma Acil Cerrahi Derg. – 2016. – № 22. – С. 34–38.
18. Oztan M. Effects of topical application of platelet-rich plasma on esophageal stricture and oxidative stress after caustic burn in rats: Is autologous treatment possible? / M. Oztan, F. Arslan, S. Oztan and others. // 2018. – № 18. – С. 30479–2.
19. Raetska Y. Cytokine profile indicators in rat blood serum in a model of esophagus burn induced by antioxidant chemical preparation / Y. Raetska, N. Chornenka, T. Koval and others // Biomedical Research and Therapy. – 2017. – № 9. – С. 1591–1606.
20. Singer A. Apoptosis and necrosis in the ischemic zone adjacent to third degree burns / A. Singer, S. McClain, B. Taira and others // Acad Emerg Med. – 2008. – № 15. – С. 549–554.
21. Senturk, Ekrem et al. "Comparison of mitomycin-c and heparin affects in experimental corrosive esophagitis on rats // International journal of pediatric otorhinolaryngology. – 2011. – 785-9.
22. Tan J. The roles of autophagy and apoptosis in burn wound progression in rats / J. Tan, H. Zhang, Z. Lei and others // Burns. – 2013. – № 39. – С. 1551–1556.
23. Tiwari V. Burn wound: how it differs from other wounds? / V. Tiwari // Indian J Plast Surg. – 2012. – № 45. – С. 364–73.
6. Cruz R, Pang TC, Harvey JG, Holland AJ. Chemical burns in children: Aetiology and prevention. Burns 2015; 41: 764-769
7. Contini S, Swarray-Deen A, Scarpignato C. Oesophageal corrosive injuries in children: a forgotten social and health challenge in developing countries. Bull. World Health Organ. 2009; 87:950-954.
8. Chibishev A, Simonovska N, Shikole A. Post-corrosive injuries of upper gastrointestinal tract. Prilozi. 2010; 31:297–316.
9. Contini S, Scarpignato C. Caustic injury of the upper gastrointestinal tract: a comprehensive review. World J Gastroenterol. 2013; 19:3918–3930.
10. Demirbilek S, Bernay F, Rizalar R, Bariş S, Gürses N. Effects of estradiol and progesterone on the synthesis of collagen in corrosive esophageal burns in rats. J Pediatr Surg 1994; 29:1425–8.
11. Dunbar KB, Agoston AT, Odze RD, Huo X, Pham TH, Cipher DJ, Castell DO, Genta RM, Souza RF, Spechler SJ. Association of Acute Gastroesophageal Reflux Disease With Esophageal Histologic Changes. JAMA. 2016; 315:2104–2112.
12. Fistal E.Y., G.P Kozinets, G.E Samoilenko and al., Combustiology, Kharkov: 2004.
13. Karaman İ., Orhan Koç, Ayşe Karaman Evaluation of 968 children with corrosive substance ingestion. Indian J Crit Care Med. 2015; 19(12): 714–718.
14. Koltuksuz U, Mutuş HM, Kutlu R, Ozyurt H, Cetin S, Karaman A, et al. Effects of caffeic acid phenethyl ester and epidermal growth factor on the development of caustic esophageal stricture in rats. J Pediatr Surg 2001; 36:1504–9.
15. Kyznetsova M.Y, Makieieva O.M, Lavrovska D.O, Tymoshenko M.O, Sheverova D.P, Halenova T.I, Savchuk O.M, Ostapchenko L.I. 2015. Effect of aqueous extract from Phaseolus vulgaris pods on lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in the liver and kidney of diabetic rats. J Appl Pharm Sci. 5:1–6.
16. Kraft R., Jensen K.-O., Jeschke M. G., & Schinkel, C. W. (2017). Patient With Scald Burn of the Esophagus. Journal of Burn Care & Research. 2017; 3: 468-470.
17. Öztoran C.İ., Demir S. The outcomes of becoming a pediatric burn center in Turkey. Ulus Travma Acil Cerrahi Derg. 2016; 22(1):34.
18. Oztan M, Arslan F., Oztan S., Diniz G., Koyluoglu G. Effects of topical application of platelet-rich plasma on esophageal stricture and oxidative stress after caustic burn in rats: Is autologous treatment possible? Journal of pediatric surgery. – 2018. (18) 30479-2
19. Raetska Y, Chornenka N, Koval T, Savchuk O, Beregova T, Ostapchenko L. Cytokine profile indicators in rat blood serum in a model of esophagus burn induced by antioxidant chemical preparation. Biomedical Research and Therapy [Internet]. 20 Sep. 2017.
20. Singer A.J, McClain S.A, Taira B.R, Guerriero J.L, Zong W. Apoptosis and necrosis in the ischemic zone adjacent to third degree burns. Acad Emerg Med. 2008;15:549–54.
21. Senturk, Ekrem et al. "Comparison of mitomycin-c and heparin affects in experimental corrosive esophagitis on rats." International journal of pediatric otorhinolaryngology. 2011; 785-9.
22. Tan J.Q, Zhang H.H, Lei Z.J, Ren P, Deng C, Li X.Y, et al. The roles of autophagy and apoptosis in burn wound progression in rats. Burns. 2013; 39:1551–6.
23. Tiwari V.K. Burn wound: how it differs from other wounds? Indian J Plast Surg. 2012; 45:364–73. 32.

Reference (Scopus):

1. Adam A. B., Özdamar M. Y., Esen H. H., & Günel, E. Local effects of epidermal growth factor on the wound healing in esophageal anastomosis: An experimental study. International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology. 2017; 99, 8–12.
2. Bautista A, Varela R, Villanueva A, Estevez E, Tojo R, Cadranel S. Effects of prednisolone and dexamethasone in children with alkali burns of the oesophagus. Eur J Pediatr Surg 1996;6:198–203
3. Cakmak M, Nayci A, Renda N, Erekuş S, Gökçora H, Yücesan S. The effect of corticosteroids and pentoxifylline in caustic esophageal burns. A prospective trial in rats. Int Surg 1997;82:371–5.
4. Cerit K, Karakoyun B, Bahadır E, Yüksel M, Bülbül N, Ercan F, Dağlı E, Yeğen B. The Effect of Antifibrotic Drug Halofuginone on Caustic Oesophageal Injury in Rats. Esophagus. 2018; 15:59–68.
5. Çiftçi Ö. D. The diagnostic utility of scintigraphy in esophageal burn: a rat model. Journal of surgical research. – 2016. (2): P. 495-500.

Я. Раецкая, канд. биол. наук

Киевский национальный университет имени Тараса Шевченка, Киев, Украина

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПИЩЕВОДА В УСЛОВИЯХ ЩЕЛОЧНОГО ОЖОГА ПИЩЕВОДА 2 СТЕПЕНИ И ПРИ ВВЕДЕНИИ ЭКСТРАКТА СТРУЧКОВ PHASEOLUS VULGARIS

Самое распространенное химическое повреждение у детей – ожог пищевода, возникает при случайном заглатывании веществ, которые имеют в своем составе щелочи, кислоты или другие едкие химические вещества. Глубина ожога зависит от концентрации и времени контакта слизистой оболочки с поражающим агентом. В результате проникновения щелочей и контакта со стенкой пищевода вместе с некрозом происходит повреждение слизистой, подслизистой и мышечной оболочки пищевода. Несмотря на большое количество лекарств, которые были испытаны при лечении осложненных, вызванных ожогами пищевода, немного информации, которая бы указывала о высокой эффективности применяемых ранее препаратов. Анализ данной литературы свидетельствует о положительном влиянии полифенолов натурального происхождения на нормализацию физиологических и биохимических параметров при различных патологиях. Экстракт стручков фасоли обыкновенной (*Phaseolus vulgaris* pods extract (PVPE)) является примером богато на биоактивные компоненты источника полезных веществ для человека. Поэтому целью нашей работы было исследовать влияние экстракта стручков фасоли обыкновенной на заживление постожоговых ран. При морфофункциональной характеристике измененной пищевода в условиях щелочного ожога 2 степени было показано, что на первые сутки эксперимента наблюдается нарушение слизистой оболочки. Это проявляется в разрушении многослойного эпителия, а именно в подслизистой оболочке происходит заметное накопление лейкоцитов, лейкоцитарная инфильтрация фиксируется в частично разрушенном мышечном слое. На 31 сутки при исследовании в группе животных с ожогом пищевода происходит определенное восстановление целостности слизистой пищевода, преимущественно с гиперплазией; отмечается также уменьшение присутствия лейкоцитов, однако наблюдается разрастание соединительной ткани в подслизистой оболочке, что может указывать на формирование рубца. Данные морфологического описания

Надійшла до редакції 01.03.2019
Отримано виправлений варіант 02.04.2019
Підписано до друку 02.04.2019

Received in the editorial 01.03.2019
Received a revised version on 02.04.2019
Signed in the press on 02.04.2019

подтверждаются морфометрическими параметрами расчета индекса стеноза. При использовании экстракта фасоли в условиях щелочного ожога было отмечено улучшение морфофункционального состояния пищевода крыс: сформированный соединительнотканый рубец значительно не влияет на индекс стеноза (его значение занимает промежуточное положение), высокий уровень лейкоцитарной инфильтрации снижается до контрольных показателей, что может указывать на выраженный терапевтический эффект экстракта стручков фасоли при щелочных ожогах пищевода.

Ключевые слова: щелочной ожог пищевода, гистология, интерлейкины, фасоль.

Ya. Raetska, Ph.D.

Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

EFFECT OF AN AQUEOUS EXTRACT OF PHASEOLUS VULGARIS PODS ON MORPHOLOGICAL PROPERTIES OF POST BURN ESOPHAGUS

The most widespread chemical damage in children – burn of the esophagus. It occurs when accidentally swallowing substances that have in their composition alkali, acid or other caustic substances. The depth of burn depends on the concentration and time of contact of the mucous membrane with the affecting agent. As a result of penetration of alkalis and contact with the wall of the esophagus, along with necrosis, damage to the mucous membrane, submucosal and muscular membrane of the esophagus occurs. Despite a large number of drugs that have been tested in the treatment of complications caused by esophageal burns, there is little information that would indicate the high effectiveness of the previously used drugs. The analysis of literature data shows the positive influence of polyphenols of natural origin on the normalization of physiological and biochemical parameters in various pathologies. The extract of common beans (*Phaseolus vulgaris* pods extract (PVPE)) is an example of a rich bioactive component of the source with beneficial characteristics for humans. Therefore, the purpose of our work was to investigate the effect of the *Phaseolus vulgaris* pods extract on the healing of post-burns wounds. When morpho-functional characteristics of the esophagus changes in the conditions of alkaline burn of the esophagus of the 2nd degree, it was shown that at 1 day of the experiment there is a violation of the mucous membrane, which manifests itself in the destruction of the multilayered epithelium, namely, in the submucous membrane there is a significant accumulation of leukocytes, leukocytic infiltration is fixed in the partly destroyed muscle layer. At 31 days of study in a group of animals with burn of the esophagus there is a certain restoration of the integrity of the mucous membrane of the esophagus, mainly with hyperplasia; there is also a decrease in the presence of leukocytes; however, there is an enlargement of the connective tissue in the submucosal membrane, which may indicate the formation of a scar. The data of the morphological description are confirmed by the morphometric parameters of the calculation of the stenosis index. With the use of extracts of beans under chemical burns esophagus conditions, improvement of the morpho-functional status of the esophagus of rats was noted: the formed connective tissue scar does not significantly affect the stenosis index (its significance is the intermediate position); the high level of leukocyte infiltration is reduced to the control parameters, which may indicate the obvious therapeutic effect of the extract of beans pods at alkaline burns of the esophagus.

Keywords: alkali burn esophagus, gystology, cytokines, *Phaseolus vulgaris*.

УДК:616.348

Г. Дорофєєва, мол. наук. співроб.

Інститут геронтології ім. Д. Ф. Чеботарьова НАМН України, Київ, Україна

МОРФОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ ТОВСТОЇ КИШКИ ХВОРИХ ІЗ РАННІМ ТА ПІЗНІМ ДЕБЮТОМ НЕСПЕЦИФІЧНОГО ВИРАЗКОВОГО КОЛІТУ

Метою дослідження було визначення морфологічних особливостей слизової оболонки товстої кишки хворих на НВК залежно від віку пацієнтів. Було проведено порівняльний аналіз частоти та морфологічного типу НВК пацієнтів із раннім та пізнім дебютом захворювання. Встановлено, що для пацієнтів із раннім дебютом НВК характерною є лівобічна та тотальна форми ураження, у пацієнтів з пізнім дебютом переважала дистальна форма НВК. Визначено основні тенденції щодо активності НВК у пацієнтів із раннім та пізнім дебютом. Згідно з аналізом ступеня активності НВК встановлено, що у пацієнтів віком 50 років і старше, із пізнім дебютом захворювання, характерним є I-й – мінімальний ступінь активності хвороби, II-й – середній і III-й – високий ступінь, зустрічаються вірогідно рідше. Тоді як серед пацієнтів віком до 50 років найчастіше виявлено II-й і III-й ступені активності захворювання. Ще однією складовою основних характеристик НВК уважали гістологічні зміни слизової оболонки товстого кишечника. Проведені дослідження таким чином дозволили стверджувати, що кількість PAS-позитивних речовин слизу ймовірно вища серед пацієнтів із дистальним та лівобічним типом ураження НВК. Також встановлено, що у пацієнтів з НВК помітне виражене порушення слизового бар'єра кишечника внаслідок зміни якісного і кількісного складу слизу. Ці зміни характеризувалися зменшенням кількості MUC2 у міру зростання активності захворювання, а також рівня MUC4 і TFF3. У пацієнтів із раннім дебютом НВК виявлено більш інтенсивне зниження кількості муцинів і TFF3 уже за мінімальної активності НВК, що поєднувалося з низьким рівнем муцинів внутрішньоклітинного слизу та асоціювалося із більш агресивним його перебігом. При цьому у хворих із пізнім дебютом виявлено різке зниження кількості MUC2 і TFF3 за високої активності НВК.

Ключові слова: неспецифічний виразковий коліт, ранній та пізній дебют, форма НЯК, гістологічні зміни, слизоутворення.

Вступ. Станом на сьогодні захворюваність неспецифічним виразковим колітом (НВК) займає одне із провідних місць у структурі хвороб шлунково-кишкового тракту [1]. Це пов'язано з погіршенням умов життя, неправильним харчуванням, високим ступенем алергізації, спадковими чинниками тощо. Разом із тим, неспецифічний виразковий коліт (НВК) є поліетіологічним захворюванням, яке вражає, як правило, слизову оболонку товстої кишки і характеризується рецидивним або хронічним перебігом [1–3].

Актуальність проблеми зумовлена зростанням частоти даної патології та збільшенням кількості пацієнтів із НВК, у яких усе частіше зустрічаються важкі форми

хвороби, що призводять до інвалідизації, а іноді й до летального результату [4–6].

Етіологія і патогенез НВК неспецифічного виразкового коліту до кінця не відомі, що ускладнює ранню діагностику хвороби, і може призвести до несвоєчасного лікування, та, як наслідок, до розвитку ускладнень [7].

У зв'язку з цим виникає необхідність подальшого вивчення патологічних механізмів захворювання та вдосконалення методів діагностики НВК, які у свою чергу дозволять підвищити ефективність терапії.

Згідно з думкою більшості фахівців гастроентерологів [3; 6; 8–9], визначення спроможності протективної функції муцинів товстокишкового слизу дозволяє оцінити й проаналізувати природу запальних процесів

товстого кишечника і сприяє встановленню точного остаточного діагнозу.

Одним із об'єктивних методів оцінки запальних процесів слизової оболонки товстого кишечника, у тому числі при НБК, є аналіз протективних функцій слизового бар'єру кишечника, які багато в чому визначаються рівнем експресії епітеліальних муцинів та їх властивостями. Показниками захисної функції слизового бар'єра кишечника є визначення рівня муцинів (MUC2, MUC3, MUC4) і трейфойлового пептиду (TFF3) [9–10].

Таким чином, на сьогодні, визначення морфологічних особливостей слизової оболонки товстого кишечника залежно від віку пацієнтів є актуальним і сприятиме підвищенню якості діагностики захворювання, а в подальшому – розробці нових неінвазивних методів лікування.

Матеріали та методи. Було обстежено 126 осіб із діагнозом неспецифічного виразкового коліту різного віку з раннім і пізнім початком захворювання. Пацієнтів обстежували та спостерігали на базі Українсько-німецького гастроентерологічного центру, центральної міської клінічної лікарні № 18 м. Києва та на базі Інституту геронтології ім. Д. Ф. Чеботарьова НАМН України м. Києва.

Серед пацієнтів ранній початок НБК виявлено у 76 (60,32 %) хворих, пізній дебют – у 50 (39,68 %) пацієнтів. Серед пацієнтів із раннім та пізнім дебютом захворювання середній вік становив $36,8 \pm 7,1$ та $61,4 \pm 3,7$ років відповідно. У всіх пацієнтів клінічний діагноз, установлений під час ендоскопічного дослідження, підтверджено заключною патогістологією.

Для оцінки ступеня запалення слизової оболонки товстої кишки (СОТК) та поширеності процесу в кишечнику використовували ендоскопічне дослідження товстої кишки – фіброколоноскопію, за допомогою апарату Olympus CF Q1501. Під час ендоскопічного дослідження проводили біопсію СОТК із подальшим дослідженням біоптату з використанням стандартних та імуногістохімічних методів фарбування препарату. Біоптат, фіксований у 10-відсотковому нейтральному забуференому формаліні (pH7,2 – 7,4), заливали в парафін за загальноприйнятою методикою. Гістологічні препарати забарвлювали гематоксиліном-еозіном.

Для характеристики слизоутворення використовували PAS-реакцію та забарвлення альціановим синім pH-2,5 та pH-1,0, за допомогою яких виявляли глікопротеїди, гліколіпіди та глікоген. Імуногістохімічне дослідження муцинів (MUC2, MUC3, MUC4) і трейфойлового пептиду (TFF3) виконували на парафінових зрізах забарвлених гематоксиліном-еозіном. Гістологічні препарати інкубували з антитілами VC2 та кон'югатом із широким спектром полімерної пероксидази хрому (Poly HRP) (US Biological, США).

Статистичну обробку одержаних результатів проводили за допомогою програми Statistica 10.0 на комп'ютері OEM IBM PC/AT Pentium.

Для вивчення вірогідності показників застосовували параметричні та непараметричні t-критерій Ст'юдента та t-критерій Вілксона.

Результати та їх обговорення. Серед обстежених хворих на НБК виявлено, що дистальна форма ураження НБК виявлена у 52 (41,26 %) хворих, лівобічна – у 32 (25,39 %) пацієнтів, а тотальна у – 44 (33,35 %) хворих. Зазначимо, що переважна кількість хворих мала дистальну форму НБК (%).

Також встановлено взаємозв'язок між віком початку хвороби та формою НБК. Із віком частота дистальної форми НБК зростала та сягала свого максимуму серед пацієнтів віком понад 50 років (64,1 %). Таким чином, дистальна форма НБК найчастіше вражала пацієнтів із пізнім дебютом розвитку хвороби. У зв'язку з цим було проведено порівняння ступеня активності дистального НБК у хворих різного віку.

Відповідно до результатів аналізу ступеня активності НБК встановлено, що у пацієнтів віком від 50 років і старше, із пізнім дебютом захворювання, переважно визначається I – мінімальний ступінь активності (75,0 % обстежених), II – середній і III – високий ступінь. Останні два ступені зустрічаються рідше. Однак, серед пацієнтів із раннім розвитком НБК (до 40 років) переважав III ступінь активності НБК (57,15 % обстежених). Це може свідчити про більш агресивний перебіг хвороби серед молодих пацієнтів. Проте у молодих пацієнтів із НБК захворювання перебігає більш агресивно, що може бути обумовлено більш активним впливом несприятливих факторів, а також високою імунною агресією.

Для повної картини перебігу захворювання, визначення тактики лікування та прогнозу необхідна оцінка стану слизового бар'єра кишечника з якісною/кількісною характеристикою процесу слизоутворення, зрілості слизу і його складу.

Під час патогістологічного дослідження виявлено гістологічні ознаки порушення слизоутворення. Гістологічні зміни слизової оболонки товстої кишки у хворих на НБК призводять до порушення слизоутворення. У всіх пацієнтів спостерігалось зменшення кількості внутрішньоклітинного та позаклітинного слизу зі зміною його властивостей. При проведенні PAS-реакції, забарвленні альціановим синім pH-2,5 і pH-1,0 інтенсивність фарбування у всіх хворих на НБК була нижче за норму ($P < 0,01$), що свідчить про зміну складу товстокишкового слизу, зменшення в ньому глікозаміногліканів і глікопротеїнів.

Виразність змін слизоутворення поєднувалася з поширеністю неспецифічного виразкового коліту (табл. 1).

Таблиця 1. Гістологічні зміни слизоутворення товстої кишки у хворих на НБК

Інтенсивність фарбування (у. о.)	Неспецифічний виразковий коліт					
	Всього n = 126	Дистальний n = 52	Лівобічний n = 32	p <	Тотальний n = 44	p1 <
PAS-реакція	1,75±0,21	2,55±0,23	1,21±0,09	0,05	0,92±0,05	0,05
Альціановий синій pH 2,5	2,66± 0,25	3,25±0,28	3,1± 0,28	0,05	1,75±0,17	0,05
pH1,0	2,68± 0,21	3,45± 0,27	2,33± 0,17	0,05	1,65± 0,20	0,05

Примітка: достовірність відмінностей за критерієм Фішера: p – достовірні відмінності в показниках пацієнтів із дистальною і лівобічною формою НБК, p1 – достовірні відмінності в показниках пацієнтів із дистальною і тотальною формою НБК

Інтенсивність PAS-реакції, фарбування альціановим синім pH-2,5 і pH-1,0 у хворих на НБК була вірогідно нижчою, порівняно зі здоровими (PAS: $1,75 \pm 0,21$ у.о. і $3,81 \pm 0,21$ у.о. відповідно $p < 0,05$). Відповідно до результатів аналізу гістологічних змін слизоутворення

хворих на НБК, кількість PAS-позитивних речовин у слизу вища у пацієнтів із дистальною та лівобічною формою НБК.

Аналогічні тенденції зазначені при забарвленні альціановим синім, як при pH-2,5, так і pH-1,0. Кількість

сульфамуцинів у хворих із дистальним НВК порівняно із загальною групою НВК ($p < 0,05$) була вищою. Протилежні тенденції виявлені у хворих із тотальною формою НВК. Інтенсивність забарвлення при проведенні PAS-реакції у цих пацієнтів була значно нижчою, ніж у цілому серед хворих на НВК. При проведенні забарвлення альціановим синім виявлено зниження кількості сульфо- і сіаломуцинів слизу ($p < 0,05$). Зауважимо, що ступінь зниження слизоутворення за даними забарвлення був у 1,5-2 рази нижче, ніж у цілому по групі хворих на НВК. Отже, у пацієнтів із тотальним НВК було виявлено найбільш виражені зміни слизоутворення, що істотно знижують захисні властивості слизового бар'єру кишечника і можуть сприяти прогресуванню захворювання та розвитку ускладнень.

При порівнянні гістологічних змін слизоутворення у хворих із дистальною і лівобічною формою НВК виявлено зниження інтенсивності PAS-реакції та зменшення кількості сульфомуцинів слизу (альціановий синій рН-1,0) у міру зростання поширеності запального про-

цесу в кишечнику ($p < 0,05$). Різниця була визначена лише в рівні сіаломуцинів слизу при порівнянні дистального й лівобічного НВК (альціановий синій рН-2,5). Вона була не вірогідною, що може свідчити про схожі зміни в слизовій оболонці кишечника на ранніх етапах захворювання.

Оцінка експресії муцинів (MUC2, MUC3, MUC4), тріфойлового пептиду (TFF3) та їх вплив на стан слизового бар'єра товстого кишечника у хворих із неспецифічним виразковим колітом були вивчені для більш глибокого аналізу гістологічних змін при розвитку НВК (табл. 2).

Як випливає з наведеної таблиці, ступінь активності НВК впливав на стан слизового бар'єра кишечника та на синтез муцинів і тріфойлового пептиду-3. У пацієнтів із НВК зазначалося зниження кількості MUC2 у міру зростання активності захворювання, а також рівня MUC4 і TFF3. Інтенсивність експресії цих білків була мінімальною у пацієнтів з високим ступенем активності НВК (рис. 1.).

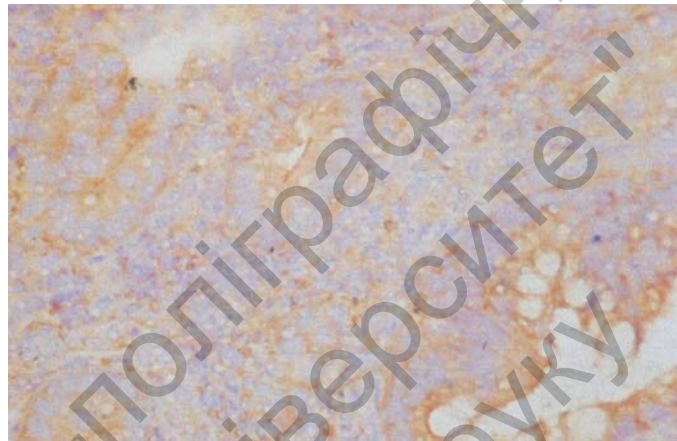


Рис. 1. Імуногістохімічна реакція забарвлення MUC4. Збільшення – х400. Зменшення інтенсивності забарвлення келихоподібних клітин, клітин епітелію і стріми у хворого II ступенем активності НВК

Таблиця 2. Інтенсивність забарвлення MUC 2-4, TFF3 у пацієнтів із раннім і пізнім дебютом НВК залежно від ступеня активності (бали)

Ступінь активності НВК	Всього				Ранній дебют				Пізній дебют			
	MUC 2	MUC 3	MUC 4	TFF3	MUC 2	MUC 3	MUC 4	TFF3	MUC 2	MUC 3	MUC 4	TFF3
I ступеня	2,02±0,1	1,1±0,2*	2,55±0,7	2,15±0,1	1,3±0,12*	1,2±0,17*	2±0,11	2,2±0,3	3,2±0,12*	1,1±0,4*	3,1±0,43*	2,1±0,22
II ступеня	1,74±0,32	1,6±0,9	2,15±0,2*	1,6±0,6	2,1±0,7	1,03±0,2*	2,2±0,27	2,0±0,02	1,1±0,23*	2,2±0,54	2,1±0,3	1,2±0,43*
III ступеня	1,32±0,07	1,8±0,5	1,9±0,8	0,9±0,2*	1,4±0,06	2,1±0,36*	2,1±0,12*	1,1±0,1	0,4±0,03*	2,0±0,17*	1,2±0,11	0,3±0,09*

Примітка: * – достовірні відмінності при $p < 0,05$.

Зазначимо, що у пацієнтів із пізнім дебютом захворювання зниження інтенсивності імуногістохімічного забарвлення MUC2 асоціювалася зі зростанням активності НВК. При цьому, якщо при I-му ступені активності у хворих із раннім дебютом НВК кількість MUC2 була нижчою, порівняно із пацієнтами групи, то при пізньому початку НВК рівень MUC2 був у 2,5 рази вище, ніж у цих пацієнтів ($p < 0,05$). Однак, у хворих із III-м ступенем активності й пізнім дебютом НВК рівень MUC2 був у 2,3 рази нижчий, ніж у пацієнтів із раннім початком НВК ($p < 0,01$).

Це свідчить про більш активний початок захворювання при ранньому дебюті НВК, що поєднується з вираженим пригніченням слизоутворення і порушенням якісного та кількісного складу слизу. У той час, як при пізньому дебюті НВК, на тлі підвищення активності спостерігається швидке виснаження компенсаторних резервів слизового бар'єра кишечника з формуванням виражених і стійких порушень продукції слизу.

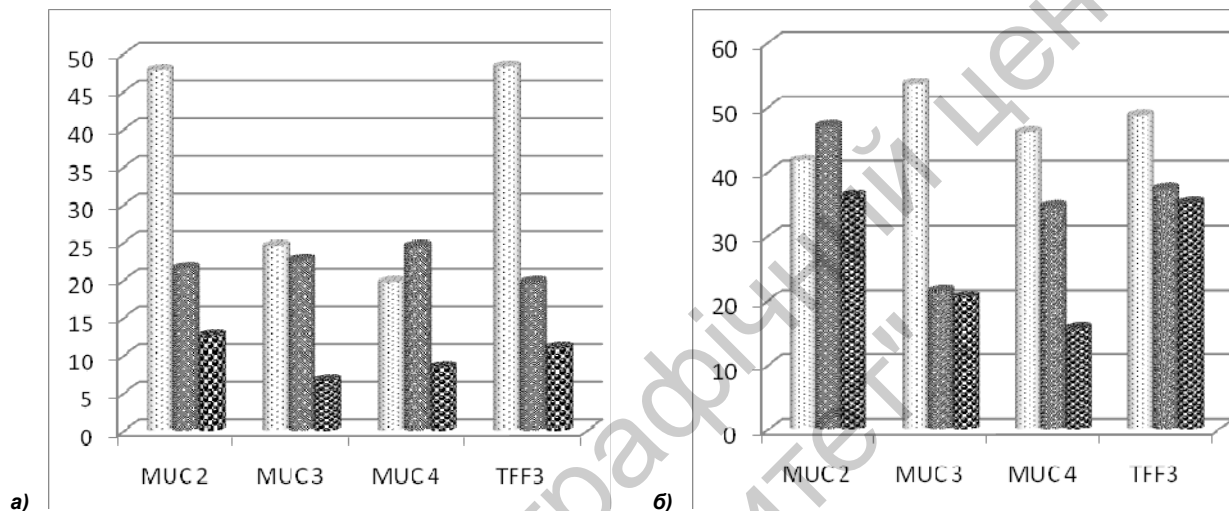





Рис. 2. Відсоткове співвідношення забарвлених келихоподібних клітин у хворих із раннім та пізнім дебютом НВК залежно від ступеня активності захворювання: а) ранній дебют НВК; б) пізній дебют НВК

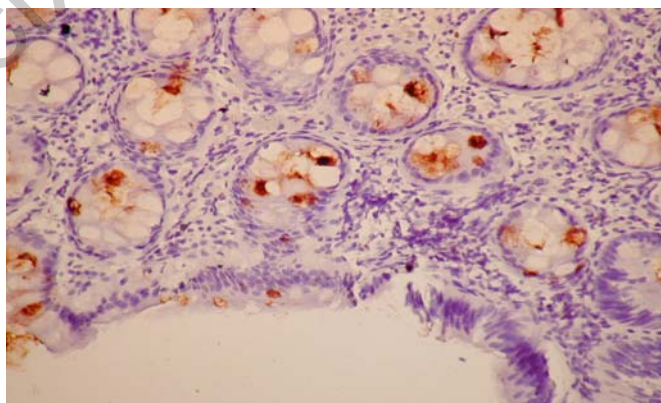
Примітка:

-  -активність I ступеня;
-  – активність II ступеня;
-  – активність III ступеня.

У пацієнтів із пізнім початком НВК на тлі підвищення активності встановлено зниження кількості не лише регуляторного MUC2, а й інших муцинів слизу. Зокрема, MUC4 і TFF3, які були мінімальними у пацієнтів з пізнім початком НВК і високим ступенем активності ($p < 0,05$).

Стан слизового бар'єра кишечника багато в чому залежить від кількості келихоподібних клітин, ступеня зрілості вакуолей і особливостей дозрівання та секреції слизу. Тому нами була вивчена інтенсивність забарв-

лення келихоподібних клітин у пацієнтів НВК із раннім та пізнім дебютом захворювання (рис. 2). Виявлено, що кількість та інтенсивність забарвлення келихоподібних клітин у хворих із раннім початком НВК значно нижча, порівняно з пацієнтами з пізнім дебютом захворювання. Ці тенденції простежуються при аналізі як мінімальної (рис. 3), так і максимальної активності НВК, що свідчить про більш агресивний перебіг запального ураження кишечника у пацієнтів із раннім початком НВК.



**Рис. 3. Імуногістохімічна реакція MUC2. Збільшення – x200.
Зменшення інтенсивності забарвлення келихоподібних клітин у хворого НВК I ступеня активності**

Зауважимо, що у хворих на НВК із раннім початком захворювання виявлено залежність від ступеня забарвлення келихоподібних клітин і активності НВК. Особливо чітко така тенденція виявлялася при аналізі кількості MUC2 і TFF3 у внутрішньоклітинній структурі слизу келихоподібних клітин таких пацієнтів. При цьому, у хворих із пізнім дебютом НВК подібні зміни виявлені при аналізі кількості MUC4 і TFF3, що, можливо, відображає особливості слиноутворення у цих пацієнтів.

Висновки

Неспецифічний виразковий коліт частіше (більше 60 % випадків) розвивався у пацієнтів у віці до 40 років, що відповідає ранньому дебюту НВК. Ранній дебют НВК частіше виявлявся серед пацієнтів чоловічої статі (61,5 %), у той час як пізній дебют НВК – характерний для жінок (58,0 %).

У обстежених хворих із НВК превалювали пацієнти з дистальною формою НВК (41,26 %), яку частіше виявляли при пізньому дебюті захворювання (64,1 %) у поєднанні з переважно мінімальним ступенем активності НВК.

Гістологічні зміни слизової оболонки товстої кишки, виявлені у всіх пацієнтів із НВК, виражалися у зменшенні кількості келихоподібних клітин, дефектах поверхневого епітелію і корелювали з розповсюдженістю захворювання. Кількість лімфоцитів, макрофагів та плазмоцитів у міру поширення неспецифічного виразкового коліту зменшувалася, що може свідчити про підвищення антигенного навантаження і перебудові імунної відповіді.

У пацієнтів із НВК спостерігається виражене порушення слизового бар'єра кишечника якісного і кількісного складу слизу. Ці зміни характеризуються зменшенням кількості MUC2 у міру зростання активності захворювання, а також рівня MUC4 і TFF3. У пацієнтів із раннім дебютом НВК відслідковується більш інтенсивне зниження кількості муцинів і TFF3 уже за мінімальної активності НВК, що поєднується з низьким рівнем муцинів внутрішньоклітинного слизу та свідчить про більш агресивний перебіг. При цьому у хворих із пізнім дебютом виявлено різке зниження кількості MUC2 і TFF3 при високій активності НВК, що може відобразити виснаження слизового бар'єра кишечника.

Список використаних джерел:

1. Сімонова О. В. Стан товстої кишки і верхніх відділів шлунково-кишкового тракту за ендоскопічними даними у хворих на неспецифічний виразковий коліт і хворобу Крона з анемічним синдромом / О. В. Сімонова, Т. І. Бойко // Гастроентерологія. – № 2(48). – С. 86–90.
2. Циммерман Я. С. Язвенный колит и болезнь Крона: современные представления. Ч. 1: Дефиниция, терминология, распространенность, этиология и патогенез, клиника, осложнения, классификация / Я. С. Циммерман, И. Я. Циммерман, Ю. И. Третьякова // Клиническая медицина. – 2013. – № 11. – С. 31.
3. Степанов Ю. М. Динаміка захворюваності та поширеності основних хвороб органів травлення в Україні за 5 останніх років

/ Ю. М. Степанов // Гастроентерологія: міжвід. зб. – Д.: Журфонд, 2012. – С. 3–12.

4. Морфологічні аспекти діагностики неспецифічного виразкового коліту: сучасний погляд на проблему / Г. А. Дорофеева, І. В. Василенко, А. Е. Дорофеев та ін. // Сучасна гастроентерологія. – 2017. – № 4 (96).

5. Степанов Ю. М. Содержание фекального кальпротектина у больных хроническими воспалительными заболеваниями кишечника / Ю. М. Степанов, Н. С. Федорова // Сучасна гастроентерологія. – 2010. № 2. – С. 44–48.

6. Степанов Ю. М. Реалии и перспективы в диагностике заболевания кишечника / Ю. М. Степанов, Н. С. Федорова // Сучасна гастроентерологія. – 2010. – № 1. – С. 109–114.

7. Zou L., Wang L., Gong X. Et al. The association between three promoter polymorphism of IL-10 and inflammatory bowel diseases (IBD): a meta-analysis // Autoimmunity. – 2014. – Vol. 47(1). – P. 27–39.

8. Sartor R. B. Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol. 2006; 3(7): 390–407.

9. Močko P., Kawalec P., Pilc A. Safety profile of biologic drugs in the treatment of inflammatory bowel diseases: A systematic review and network meta-analysis of randomized controlled trials // Clin Drug Investig. – 2017. – Vol. 37(1). – P. 25–37.

10. Perez-Vilar J. Mucin granule intraluminal organization // Am J Respir Cell Mol Biol. – 2008. – № 36 (2). – P. 183–190.

Referens (Scopus):

1. Simonova O.V. Stan tovstokishki i verhnih viddiliv shlunkovo-kishkovogo traktu za endoskopichnimi danimi u hvorih na nespecifichnij virazkovij kolit i hvorobu krona z anemichnim sindromom / Simonova O.V., Bojko T. J. // Gastroenterologiya. – № 2(48). – S. 86–90.

2. Cimmerman YA. S. Yazvennyj koliti bolezn' Krona: sovremennye predstavleniya chasti' 1. definiciya, terminologiya, rasprostranennost', ehtologiya i patogenez, klinika, oslozhneniya, klassifikaciya / YA. S. Cimmerman, I. YA. Cimmerman, YU. I. Tret'yakova // ZHurnal Klinicheskaya medicina. – 2013. – № 11. – S. 31.

3. Stepanov YU. M. Dinamika zahvoryuvanosti ta poshirenosti osnovnih hvorob organiv travlennya v Ukraini za 5 ostannih rokiv / YU. M. Stepanov // Gastroenterologiya: mizhvid. zb. – D.: ZHurfond, 2012. – S. 3–12.

4. Dorofeeva G. A., Vasilenko I. V., Dorofeev A. E., Dyadik O. O., Derkach I. A. Morfologichni aspekti diagnostiki nespecifichnogo virazkovogo kolitu: suchasnij poglyad na problemu // Suchasna gastroenterologiya № 4 (96) 2017, Kiiu.

5. Stepanov YU. M. Soderzhanie fekal'nogo kal'protektina u bol'nyh hronicheskimi vospalitel'nymi zabolevaniyami kishchnika / YU. M. Stepanov, N. S. Fedorova // Suchasna gastroenterologiya. – № 2. – 2010. – S. 44–48.

6. Stepanov YU. M. Realii i perspektivy v diagnostike zabolevanij kishchnika / YU. M. Stepanov, N. S. Fedorova // Suchasna gastroenterologiya. – 2010. – № 1. – S. 109–114.

7. Zou L., Wang L., Gong X. et al. The association between three promoter polymorphisms of IL-10 and inflammatory bowel diseases (IBD): a meta-analysis // Autoimmunity. – 2014. – Vol. 47(1). – P. 27–39.

8. Sartor RB. Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. Nat ClinPractGastroenterolHepatol. 2006; 3(7): 390–407.

9. Močko P., Kawalec P., Pilc A. Safety profile of biologic drugs in the treatment of inflammatory bowel diseases: A systematic review and network meta-analysis of randomized controlled trials // Clin Drug Investig. – 2017. – Vol. 37(1). – P. 25–37.

10. Perez-Vilar J. Mucin granule intraluminal organization // Am J Respir Cell Mol Biol. – 2008. – № 36 (2). – R. 183–190.

Надійшла до редколегії 01.03.2019

Отримано виправлений варіант 02.04.2019

Підписано до друку 02.04.2019

Received in the editorial 01.03.2019

Received a revised version on 02.04.2019

Signed in the press on 02.04.2019

А. Дорофеева, млад. научн. сотруд.

Институт геронтологии им. Д. Ф. Чеботарева НАМН Украины, Киев, Украина

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ТОЛСТОЙ КИШКИ БОЛЬНЫХ С РАННИМ И ПОЗДНИМ ДЕБЮТОМ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО ЯЗВЕННОГО КОЛИТА

Целью исследования было определение морфологических особенностей слизистой оболочки толстой кишки больных НЯК в зависимости от возраста пациентов. Был проведен сравнительный анализ частоты встречаемости и формы НЯК пациентов с ранним и поздним дебютом заболевания. Констатировано, что для пациентов с ранним дебютом НЯК характерна левосторонняя и тотальная формы, у пациентов с поздним дебютом превалировала дистальная форма НЯК. Определены основные тенденции активности НЯК у пациентов с ранним и поздним дебютом. При анализе степени активности НЯК выявлено, что у пациентов от 50 лет и старше, с поздним дебютом заболевания, преимущественно встречается первый – минимальной степени активности, второй – средней и третий – высокая степень, встречаются достоверно реже. В свою очередь у пациентов до 50 лет чаще констатирован второй и третий степени активности заболевания. Еще одной составляющей основных характеристик НЯК считали гистологические изменения слизистой оболочки толстого кишечника. Так, проведенные исследования позволили констатировать, что количество PAS-положительных веществ в слизи достоверно выше у пациентов с дистальной и левосторонней формами НЯК. У пациентов с НЯК

отмечается выраженное нарушение слизистого барьера кишечника качественного и количественного состава слизи. Эти изменения характеризовались уменьшением количества MUC2 по мере роста активности заболевания, а также уровня MUC4 и TFF3. У пациентов с ранним дебютом НЯК отмечается более интенсивное снижение количества муцинов и TFF3 уже при минимальной активности НЯК, что сочеталось с низким уровнем муцинов с внутриклеточной слизью и свидетельствует о более агрессивном его течении. При этом у больных с поздним дебютом обнаружено резкое снижение количества MUC2 и TFF3 при высокой активности НЯК.

Ключевые слова: неспецифический язвенный колит, ранний и поздний дебют, форма НЯК, гистологические изменения, слизиобразования.

A. Dorofeeva, junior researcher
Institute of Gerontology them D. F. Chebotarev NAMS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

MORPHOLOGICAL FEATURES OF THE MUCOUS MEMBRANE OF THE COLON OF PATIENTS WITH EARLY AND LATE ULCERATIVE COLITIS DEBUT

The purpose of the research was to determine the morphological features of the mucous membrane of the large intestine of patients with UC depending on the age of patients. A comparative analysis of the incidence and type of UC of patients with early onset and late debut of the disease was performed. It has been stated that for patients with a debilitating post-traumatic disorder, the left ventricular and total forms are characteristic; in patients with late debut, the distal form of UC predominates. The main trends in the activity of UC in patients with early onset and late debut have been determined. In the analysis of the degree of activity of UC revealed that in patients from 50 years of age and older, with the late debut of the disease, the first one is mostly found to be the least degree of activity, the second – the middle and the third – the high degree, they are found to be less likely. In turn, in patients under 50, the second and third stages of the disease are most often noted. Another component of the main characteristics of the UC was the histological changes of the mucous membrane of the large intestine. Thus, the conducted studies allowed to state that the number of PAS-positive substances in mucus is significantly higher in patients with distal and left-sided UC. In patients with UC there is a marked mucosal intestinal mucosa of qualitative and quantitative composition of mucus. These changes were characterized by a decrease in MUC2 as the disease progressed, as well as levels of MUC4 and TFF3. In patients with early onset of NSC, there is a more intense reduction in the number of mucins and TFF3 already with a minimal activity of UC associated with low levels of mucin from the intracellular mucus and indicates a more aggressive course of it. At the same time, patients with a late debut revealed a sharp decrease in the number of MUC2 and TFF3 with high activity of UC.

Key words: non-specific ulcerative colitis, early and late debut, NSC form, histological changes, mucus formation.

УДК 616.72-002: 577.122.8

О. Блохина, асп., Л. Кот, канд. біол. наук, С. Торгалю, канд. біол. наук,
К. Дворченко, д-р біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

КОНЦЕНТРАЦІЯ С-РЕАКТИВНОГО БІЛКА ТА МОЛЕКУЛ НИЗЬКОЇ ТА СЕРЕДНЬОЇ МОЛЕКУЛЯРНОЇ МАСИ У СИРОВАТЦІ КРОВІ ЩУРІВ ЗА УМОВ КАРРАГІНАН-ІНДУКОВАНОГО ЗАПАЛЕННЯ ТА ТРИВАЛОГО ПРОФІЛАКТИЧНОГО ВВЕДЕННЯ ХОНДРОЇТИНА СУЛЬФАТУ

Метою роботи було дослідити профілактичну дію хондроїтина сульфату на концентрацію С-реактивного білка й молекул низької та середньої молекулярної маси у сироватці крові щурів при локальному запаленні задньої кінцівки. Дослідження проведені на білих нелінійних статевозрілих щурах-самцях масою 180-240 г із дотриманням загальних етичних принципів експериментів на тваринах. Усіх тварин розділяли на чотири експериментальні групи. Перша група – контроль: тваринам субплантарно вводили 0,1 мл 0,9-відсоткового розчину NaCl у задню праву кінцівку. Друга група – тваринам щоденно протягом 28 днів внутрішньом'язево вводили терапевтичну дозу 3 мг × кг⁻¹ хондроїтина сульфату. Третя група – тваринам щоденно протягом 28 днів внутрішньом'язево вводили 0,1 мл 0,9-відсоткового розчину NaCl у задню праву кінцівку та на 29-й день моделювали запальний набряк кінцівки (тваринам субплантарно вводили 0,1 мл одновідсоткового розчину каррагінану в задню праву кінцівку). Четверта група – щурам щоденно, протягом 28 днів внутрішньом'язево вводили терапевтичну дозу 3 мг × кг⁻¹ хондроїтина сульфату, після чого на 29-й день моделювали запальний набряк кінцівки. Тварин умертвляли через 3 год після ін'єкції розчину каррагінану згідно з протоколом етичного комітету, після чого швидко робили забір крові для подальших досліджень. Загальна кількість тварин, залучених до експериментальних досліджень, становила 40 особин. Концентрацію С-реактивного білка визначали турбідиметричним методом. Уміст молекул низької та середньої молекулярної маси визначали скринінговим методом. Установлено, що при каррагінан-індукованому запаленні задньої кінцівки у сироватці крові зростає концентрація С-реактивного білка й молекул низької та середньої молекулярної маси. Показано, що при профілактичному введенні препарату на основі хондроїтина сульфату тваринам із каррагінан-індукованим запаленням вищезазначені показники відновлювались.

Ключові слова: гостре запалення кінцівки, хондроїтин сульфат, С-реактивний білок, молекули низької та середньої молекулярної маси.

Вступ. У структурі захворювань одне із провідних місць займають порушення опорно-рухової системи, які можуть призвести до розвитку інвалідності та, відповідно, зниження працездатності населення. Ці патологічні зміни провокують хвороби інших систем і окремих органів, а також зниження рухливості й погіршення загального стану організму. У зв'язку з цим актуальним питанням медицини є профілактика та лікування захворювань опорно-рухового апарату.

Важливе місце серед хвороб опорно-рухової системи займають захворювання суглобів. Вони супроводжуються розвитком запальних процесів, як на рівні компонентів суглобу, включаючи синовіальну оболонку, хрящ, суглобову капсулу, зв'язки, сухожилки, так і на рівні цілого організму [2, 22].

Захворювання суглобів має прогресуючий характер, тому необхідно своєчасно вживати заходів для гальмування або зупинки розвитку патологічних змін. Крім того, важливим є проведення профілактичних дій даних захворювань, особливо, якщо є певні фактори ризику: генетична схильність до розвитку хвороб суглобів, метаболічні захворювання, імовірність перевантаження опорно-рухового апарату, похилий вік тощо [13, 16].

У зв'язку з цим важливим питанням є пошук засобів для відновлення суглобів. На сьогодні встановлено, що дистрофічні зміни хрящової тканини пов'язані зі зниженням умісту хондроїтина сульфату, який є природним компонентом міжклітинної речовини хряща. Хондроїтин сульфат являє собою сульфатований протеоглікан, в якому сульфат ковалентно приєднаний до молекули хо-

хондроїтину. Він підтримує пружність і щільність хряща [10]. Тому дослідження препаратів, основу яких становить хондроїтина сульфат, є перспективним у профілактиці та лікуванні захворювань суглобів. У наших експериментах було досліджено препарат "Драстоп", основною складовою частиною якого є хондроїтина сульфат.

Метою роботи було дослідити профілактичну дію хондроїтина сульфату на концентрацію С-реактивного білка (СРБ) і молекул низької та середньої молекулярної маси у сироватці крові щурів при гострому локальному запаленні задньої кінцівки.

Матеріали та методи. Дослідження проведені на білих нелінійних статевозрілих щурах-самцях масою 180-240 г із дотриманням загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (вересень, 2001), інших міжнародних угод та національного законодавства у цій галузі. За добу до проведення експерименту тварин піддавали харчовій депривації з вільним доступом до води.

Усіх тварин розділяли на чотири експериментальні групи. Перша група – контроль: тваринам субплантарно вводили 0,1 мл 0,9-відсоткового розчину NaCl у задню праву кінцівку. Друга група – тваринам щоденно протягом 28 днів внутрішньом'язево вводили терапевтичну дозу $3 \text{ мг} \times \text{кг}^{-1}$ хондроїтина сульфату. Третя група – тваринам щоденно протягом 28 днів внутрішньом'язево вводили 0,1 мл 0,9-відсоткового розчину NaCl у задню праву кінцівку та на 29-й день моделювали запальний набряк кінцівки: тваринам субплантарно вводили 0,1 мл одновідсоткового розчину каррагінану в задню праву кінцівку [17]. Четверта група – тваринам щоденно протягом 28 днів внутрішньом'язево вводили терапевтичну дозу $3 \text{ мг} \times \text{кг}^{-1}$ хондроїтина сульфату, після чого щурам субплантарно вводили 0,1 мл одновідсоткового розчину каррагінану у задню праву кінцівку. Тварин умертвляли через 3 год після ін'єкції розчину каррагінану відповідно до протоколу етичного комітету, після чого швидко робили забір крові для подальших досліджень. Загальна кількість тварин, залучених до експериментальних досліджень, становила 40 особин.

Концентрацію С-реактивного білка визначали методом кінетичного аналізу [7]. Кількісно концентрацію С-реактивного білка в сироватці крові оцінювали імунотурбідиметрично за допомогою латексного реагенту

СРБ. Концентрацію молекул низької та середньої молекулярної маси визначали за Габриелян [1] із модифікаціями. Метод базується на осадженні високомолекулярних пептидів і білків біологічних рідин із використанням трихлороцтової кислоти та кількісним визначенням в отриманому центрифугуванні супернатанті середньомолекулярних пептидів за поглинанням у монохромному потоці світла при довжині хвилі 254 нм. Визначення концентрації білка проводили за методом Лоурі. Метод базується на утворенні забарвлених продуктів ароматичних амінокислот із реактивом Фоліну в поєднанні з біуретовою реакцією на пептидні зв'язки [18]. Статистичну обробку результатів дослідження проводили загальноприйнятими методами варіаційної статистики.

Результати та їх обговорення. Важливими показниками розвитку запалення в організмі є рівень гострофазних білків у крові, продукція яких в організмі ініціюється антигенами, імунними комплексами, бактеріями та грибами. Інформативним параметром серед даної групи білків є концентрація С-реактивного білка у сироватці крові [15, 19].

С-реактивний білок є негліколізованим білком із пентамерною структурою, який належить до β -глобулінів. За рахунок його спорідненості до фосфорилхоліну, який є складовою клітинних стінок деяких бактерій та одноклітинних грибів, с-реактивний білок здатний зв'язувати відповідні мікробні клітини та опсонізувати їх для фагоцитозу або лізувати за допомогою комплемента. СРБ виконує роль прозапального "тригера", який стимулює моноцитарний синтез таких цитокинів, як фактор некрозу пухлин- α , інтерлейкін-1 та інтерлейкін-6. Таким чином, СРБ виконує імунорегуляторну функцію: стимулює захисні реакції та активізує імунітет [23].

Установлено, що у щурів при запаленні задньої кінцівки, індукованому каррагінаном, у сироватці крові концентрація С-реактивного білка зростає в 1,9 раза порівняно з контролем (табл. 1). При введенні препарату на основі хондроїтина сульфату щурам із експериментальною моделлю локального запалення в сироватці крові спостерігається зниження концентрації С-реактивного білка в 1,4 раза щодо групи тварин, яким вводили лише каррагінан. Виявлено, що хондроїтина сульфат не впливає на концентрацію С-реактивного білка у сироватці крові контрольної групи тварин (табл. 1).

Таблиця 1. Концентрація С-реактивного білка у сироватці крові щурів за умов каррагінан-індукованого запалення та тривалого профілактичного введення хондроїтина сульфату, $\text{мг} \times \text{л}^{-1}$ ($M \pm m$, $n = 10$)

Групи тварин	Показник
Контроль	$3,86 \pm 0,37$
Хондроїтина сульфат	$3,71 \pm 0,34$
Каррагінан	$7,23 \pm 0,69^*$
Каррагінан + хондроїтина сульфат	$5,28 \pm 0,48^\#$

* – $p < 0,05$ щодо контролю; # – $p < 0,05$ стосовно групи тварин, яким вводили каррагінан

Отримані результати є підтвердженням розвитку запальних процесів в організмі при гострому запаленні, який спричинений дією каррагінану [14]. Оскільки відомо, що рівень С-реактивного білка має прогностичне значення як маркер інтенсивності перебігу запалення. Так, підвищення вмісту СРБ при артритах різного ґенезу свідчить про ступінь важкості захворювання [8, 15]. Крім того, вміст СРБ є інформативним показником при моніторингу ефективності лікування інфекційних процесів та ускладнень, пов'язаних з інфікуванням [21]. Це підтверджується нашими результатами стосовно зниження його рівня при тривалому профілактичному введенні хондроїтина сульфату щурам з моделлю гострого запалення.

Біохімічним проявом прогресії запалення є розвиток ендогенної інтоксикації внаслідок порушення метаболічних процесів в організмі. Критерієм ступеню цих розладів є рівень накопичення в тканинах та біологічних рідинах організму проміжних та кінцевих продуктів обміну речовин – неідентифікованих токсичних субстанцій, які належать до молекул низької та середньої молекулярної маси від 500 до 5000 дальтон.

Хімічний склад молекул низької та середньої молекулярної маси дуже неоднорідний і об'єднує гетерогенну групу речовин. Він включає пептиди, глікопептиди, нуклеопептиди, ендорфіни, аміноцукри, поліаміни, багатоатомні спирти, деякі гуморальні регулятори – інсу-

лін, глюкагон, адренкортикотропний гормон, вазопресин, окситоцин, ангіотензин, кальцитонін, ліпофусцин (внутрішньоклітинні комплекси ліпідів і білків), атерогенні окислені ліпопротеїни, деякі вітаміни, нуклеотиди, олігосахариди, похідні глюкуронових кислот та інші. Біля 80% середніх молекул є продуктами порушеного білкового обміну та деструкції тканин [4].

Дотепер досить детально вивчено біологічну дію молекул низької та середньої молекулярної маси. Багато з них володіють нейротоксичною активністю, пригнічують процеси біосинтезу білка, здатні пригнічувати активність ряду ферментів, роз'єднують процеси окислення і фосфорилування, порушують механізми регуляції синтезу аденолових нуклеотидів, змінюють транспорт іонів через мембрани, еритропоез, фагоцитоз, мікроциркуляцію, лімфодинаміку, викликають стан вторинної імундепресії. Відомо, що молекул низької та середньої молекулярної маси здатні з'єднуватися і блокувати рецептори будь-якої клітини, негативно впливаючи на її метаболізм і функції. Показана можливість впливу молекул низької та середньої молекулярної маси на тонус гладком'язевих клітин, на трансваскулярний транспорт. Ці речовини можуть взаємодіяти з компонентами систем гемостазу [3, 5]. Таким чином, утворені ендотоксини володіють високою біологічною активністю, вони здатні спричиняти порушення функціонування всіх систем організму та погіршувати перебіг основного

захворювання, зокрема запальних захворювань суглобів [6, 9]. Так, у пацієнтів хворих на ідіопатичний остеоартроз колінного суглоба до і після його тотального ендопротезування спостерігалися підвищені рівні молекул низької та середньої молекулярної маси, які після періоду реабілітації знижувалися. За результатами досліджень рекомендовано використовувати рівень молекул низької та середньої молекулярної маси у сироватці крові як інтегративний показник ендогенної інтоксикації для контролю за біохімічним станом пацієнтів, що може бути корисним при виборі тактики ведення цих хворих, а також в оцінці доцільності і ефективності лікування препаратами відповідного профілю.

В результаті проведених експериментальних досліджень нами встановлено, що у щурів при запаленні задньої кінцівки, індукованому каррагінаном, у сироватці крові зростає вміст молекул низької та середньої молекулярної маси – в 1,5 раза відносно контролю (табл. 2).

При тривалому профілактичному введенні хондроїтина сульфату тваринам з каррагінан-індукованим запаленням у сироватці крові знижується рівень молекул низької та середньої молекулярної маси – в 1,3 раза порівняно з групою тварин з експериментальною моделлю гострого локального запалення. Показано, що хондропротектор не впливає на рівень досліджуваного показника у сироватці крові контрольної групи тварин (табл. 2).

Таблиця 2. Вміст молекул низької та середньої молекулярної маси у сироватці крові щурів за умов каррагінан-індукованого запалення та тривалого профілактичного введення хондроїтина сульфату, ум. од. × мг білка⁻¹ (M ± m, n = 10)

Групи тварин	Показник
Контроль	6,09 ± 0,55
Хондроїтина сульфат	6,31 ± 0,62
Каррагінан	9,03 ± 0,88*
Каррагінан + хондроїтина сульфат	7,12 ± 0,69#

* – p < 0,05 відносно контролю; # – p < 0,05 відносно групи тварин, яким вводили каррагінан

Отримані дані свідчать про розвиток синдрому ендогенної інтоксикації в організмі щурів при каррагінан-індукованому запаленні. Підвищений рівень молекул низької та середньої молекулярної маси спричинює токсичну дію на організм та може призвести до роз'єднання процесів дихання й окисного фосфорилування, інгібування синтезу білка, пригнічення трансформації лімфоцитів і фагоцитарної активності лейкоцитів, сприяти гемолізу еритроцитів, гальмувати еритропоез, порушувати проникність мембран капілярів та уповільнювати в них швидкість кровотоку [3, 4].

Виявлене зниження вмісту молекул низької та середньої молекулярної маси у сироватці крові щурів із запаленням при введенні хондроїтина сульфату пов'язане із протизапальною дією досліджуваного препарату.

Аналізуючи отримані нами результати, при гострому запаленні задньої кінцівки в організмі щурів розвивається запалення, про що свідчить збільшення у сироватці крові концентрації С-реактивного білка й молекул низької та середньої молекулярної маси, які належать до маркерів запальних процесів та ендогенної інтоксикації. Виявлене зниження концентрації С-реактивного білка й молекул низької та середньої молекулярної маси у сироватці крові при профілактичному тривалому введенні хондроїтина сульфату щурам при запаленні пов'язано з антизапальними, антирадикальними та регенераційними властивостями даної сполуки. Хондроїтин сульфат є одним із основних компонентів екстрацелюлярного матрикса хряща та складовою протеогліканових комплексів основної речовини хрящової тканини. Він володіє вираженою гідрофільністю за рахунок

наявності карбоксильної та сульфатної груп, що сприяє нормальному функціонуванню хряща і збереженню його еластичності. Хондроїтин сульфат активує анаболічні процеси за рахунок стимуляції синтезу протеогліканів і колагену, а також пригнічує синтез ферментів деструкції хряща (металопротеїнази 3, 9, 13, 14; катепсину-бета, лейкоцитарної еластази) [20]. Крім того, хондроїтина сульфат володіє власною антиоксидантною активністю. Так, у ряді досліджень [11, 12] показано здатність хондроїтина сульфату хелатувати іони перехідних металів (залізо, мідь), які беруть безпосередню участь в ініціюванні реакцій Фентона та Хабер-Вейса. Це призводить до зменшення утворення вільних радикалів. Хелатування відбувається за рахунок зв'язування металів із карбоксильною групою залишку глюкуронової кислоти та сульфатованою групою в положенні 4 або 6 амінокислотного залишку в протилежній боці карбонової групи молекули хондроїтина сульфату.

Висновки. Установлено, що за умов локального запалення задньої кінцівки, індукованого введенням каррагінану, у сироватці крові зростає концентрація С-реактивного білка й молекул низької та середньої молекулярної маси, що свідчить про розвиток запальних процесів. Тривале профілактичне введення хондроїтина сульфату щурам із експериментальною моделлю локального запалення призводить до часткового зниження продукції досліджуваних сполук у сироватці крові.

Список використаних джерел:

1. Габриэлян Н. И. Скрининговый метод определения средних молекул в биологических жидкостях: метод. реком. – М.: Мир, 1985. – С. 11.
2. Головач И. Ю. Остеоартрит: фундаментальные и прикладные аспекты этиопатогенеза заболевания. Ничего не стоит на месте // Укр. ревматолог. журн. – 2014. – № 2 (56). – С. 4–11.
3. Добротина Н. А., Копытова Т. В. Эндотоксикация организма человека: методологические и методические аспекты: учеб. пособ. Нижний Новгород: Нижегородск. гос. ун-т им. Н. И. Лобачевского, 2004. – С. 72.
4. Карякина Е. В. Молекулы средней массы как интегральный показатель метаболических нарушений (обзор литературы) / Е. В. Карякина, С. В. Белова // Клинич. лаб. диагн. – 2004. – № 3. – С. 3–8.
5. Келина Н. Ю. Биохимические проявления эндотоксикоза: методические аспекты изучения и оценки, прогностическая значимость (аналитический обзор) / Н. Ю. Келина, Н. В. Безручко, Г. К. Рубцов // Вестн. Тюмен. гос. ун-та. – 2012. – № 6. – С. 143–147.
6. Сміян С. І. Синдром ендогенної інтоксикації як маркер запального процесу при ревматичних захворюваннях суглобів / С. І. Сміян, О. М. Масик, У. С. Слаба // Вісн. наук. досліджень. – 2000. – No 1. – С. 40–42.
7. Турбидиметрия в лабораторной практике / В. В. Долгов и др. – М.: Реафарм, 2007 – 176 с.
8. Ammitzbøll C. G. CRP genotype and haplotype associations with serum C-reactive protein level and DAS28 in untreated early rheumatoid arthritis patients // Arthritis Res Ther. – 2014; 16(5): 475.
9. Attur M., Krasnokutsky-Samuels S., Samuels J., Steven B. Abramson S.B. Prognostic biomarkers in osteoarthritis // Curr Opin Rheumatol. – 2013. – 25(1): 136–144.
10. Bishnoi M. Chondroitin sulphate: a focus on osteoarthritis // M. Bishnoi, A. Jain, P. Hurkat, S. K. Jain // Glycoconj. J. – 2016. – Vol. 33, № 5. – P. 693–705. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
11. Campo G. M. Sulphate: Antioxidant Properties and Beneficial Effects // G. M. Campo, A. Avenoso, S. Campo et al. // Mini-Reviews in Medicinal Chemistry. – 2006. – P. 6, 1311–1320.
12. Campo G. M. The antioxidant activity of chondroitin-4-sulphate, in carbon tetrachloride-induced acute hepatitis in mice, involves NF-κB and caspase activation // G. M. Campo, A. Avenoso, S. Campo et al. // Br J. Pharmacol. – 2008. – Nov; 155(6): 945–956.
13. Chu C. R. Defining Pre-Osteoarthritis Is Key to Prevention // Cartilage. 2016 Apr; 7(2): 204. doi: 10.1177/1947603515618758.
14. Fehrenbacher J. C. Models of Inflammation: Carrageenan- or Complete Freund's Adjuvant-Induced Edema and Hypersensitivity in the Rat // Curr Protoc Pharmacol. 2012 Mar; 0 5: Unit5.4. doi: 10.1002/0471141755.ph0504s56.
15. Hillström A. Measurement of serum C-reactive protein concentration for discriminating between suppurative arthritis and osteoarthritis in dogs // A. Hillström, J. Bylin, Ragnvi Hagman R. et al. // BMC Vet Res. – 2016; 12: 240.
16. Michael J. W.-P., Schlüter-Brust K.U., Eysel P. The Epidemiology, Etiology, Diagnosis, and Treatment of Osteoarthritis of the Knee // Dtsch Arztebl Int. 2010 Mar; 107(9): 152–162.
17. Morris C. J. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse // Methods Mol. Biol. – 2003. – Vol. 225. – P. 115–121. Available from: <http://link.springer.com/protocol/10.1385/1-59259-374-7%3A115>.
18. Protein measurement with Folin phenol reagent // O. H. Lowry et al. // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol. 193, № 1. – P. 265–275.
19. Serum procalcitonin and C-reactive protein levels as markers of bacterial infection: a systematic review and meta-analysis // L. Simon et al. // Clin. Infect. Dis. – 2004. – Vol. 39, № 2. – P. 206–217.
20. Souich P., García A.G., Vergés J., Montell E. Immunomodulatory and anti-inflammatory effects of chondroitin sulphate // J. Cell Mol Med. – 2009 Aug; 13(8a): 1451–1463.
21. Sproston N.R., Ashworth J.J. Role of C-Reactive Protein at Sites of Inflammation and Infection // Front Immunol. – 2018; 9: 754.
22. Woolf A.D. Global burden of osteoarthritis and musculoskeletal diseases // BMC Musculoskelet Disord. 2015; 16(Suppl 1): S3. Published online 2015 Dec 1. doi: 10.1186/1471-2474-16-S1-S3.
23. Zhang J. Meta-analysis of serum C-reactive protein and cartilage oligomeric matrix protein levels as biomarkers for clinical knee osteoarthritis // BMC Musculoskelet Disord. 2018; 19: 22.
2. Golovach I. Yu. Osteoartrit: fundamentalnyie i prikladnyie aspekty etiopatogeneza zabolovaniya. Nichego ne stoit na meste // Ukrainiyi revmatologichnyi zhurnal. – 2014. – No 2 (56). – S. 4-11.
3. Dobrotina N. A., Kopyitova T. V. Endointoksatsiya organizma cheloveka: metodologicheskie i metodicheskie aspekty // Uchebnoe posobie. Nizhegorodskiy gosudarstvennyy universitet im. N. I. Lobachevskogo. – Nizhniy Novgorod, 2004. – S. 72.
4. Karyakina E. V. Molekuly sredney massy kak integralnyy pokazatel metabolicheskikh narusheniy (obzor literatury) / E. V. Karyakina, S. V. Belova // Klin. labor. diagn. – 2004. – # 3. – S. 3–8.
5. Kelina N. Yu., Bezruchko N. V., Rubtsov G. K. Biohimicheskie proyavleniya endotoksikoza: metodicheskie aspekty izucheniya i otsenki, prognosticheskaya znachimost (analiticheskiy obzor) // Vest. Tyumen. gosud. un-ta. – 2012. – # 6. – S. 143–147.
6. Smiyan S. I., Masuk O. M., Slaba U. S. Sindrom endogennoi Intoksikatsii yak marker zapalnogo protsesu pruv revmatichnuh zahvoryuvannyah suglobiv // Visnuk nauk. doslidzhen. – 2000. – No 1. – S. 40–42.
7. Turbidimetriya v laboratornoy praktike / V. V. Dolgov i dr. – M.: Reafarm. – 2007. – 176 s.
8. Ammitzbøll C. G., Steffensen R., Bogsted M. et al. CRP genotype and haplotype associations with serum C-reactive protein level and DAS28 in untreated early rheumatoid arthritis patients // Arthritis Res Ther. – 2014; 16(5): 475.
9. Attur M., Krasnokutsky-Samuels S., Samuels J., Steven B. Abramson S. B. Prognostic biomarkers in osteoarthritis // Curr Opin Rheumatol. 2013; 25(1): 136–144.
10. Bishnoi M., Jain A., Hurkat P., Jain S. K. Chondroitin sulphate: a focus on osteoarthritis // Glycoconj. J. – 2016. – Vol. 33, № 5. – P. 693–705. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
11. Campo G. M., Avenoso A., Campo S., Ferlazzo A. M. and Calatroni A. Chondroitin Sulphate: Antioxidant Properties and Beneficial Effects // Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 2006, 6, 1311–1320.
12. Campo G. M., Avenoso A., Campo S. et al. The antioxidant activity of chondroitin-4-sulphate, in carbon tetrachloride-induced acute hepatitis in mice, involves NF-κB and caspase activation // Br J Pharmacol. 2008 Nov; 155(6): 945–956.
13. Chu C. R. Defining Pre-Osteoarthritis Is Key to Prevention // Cartilage. 2016 Apr; 7(2): 204. doi: 10.1177/1947603515618758.
14. Fehrenbacher J. C., Vasko M. R., Duarte D. B. Models of Inflammation: Carrageenan- or Complete Freund's Adjuvant-Induced Edema and Hypersensitivity in the Rat // Curr Protoc Pharmacol. 2012 Mar; 0 5: Unit5.4. doi: 10.1002/0471141755.ph0504s56.
15. Hillström A., Bylin J., Ragnvi Hagman R. et al. Measurement of serum C-reactive protein concentration for discriminating between suppurative arthritis and osteoarthritis in dogs // BMC Vet Res. 2016; 12: 240.
16. Michael J. W.-P., Schlüter-Brust K.U., Eysel P. The Epidemiology, Etiology, Diagnosis, and Treatment of Osteoarthritis of the Knee // Dtsch Arztebl Int. 2010 Mar; 107(9): 152–162.
17. Morris C. J. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse // Methods Mol. Biol. – 2003. – Vol. 225. – P. 115–121. Available from: <http://link.springer.com/protocol/10.1385/1-59259-374-7%3A115>.
18. Protein measurement with Folin phenol reagent // O. H. Lowry et al. // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol. 193, № 1. – P. 265–275.
19. Serum procalcitonin and C-reactive protein levels as markers of bacterial infection: a systematic review and meta-analysis // L. Simon [et al.] // Clin. Infect. Dis. – 2004. – Vol. 39, № 2. – P. 206–217.
20. Souich P., García A.G., Vergés J., Montell E. Immunomodulatory and anti-inflammatory effects of chondroitin sulphate // J Cell Mol Med. 2009 Aug; 13(8a): 1451–1463.
21. Sproston N.R., Ashworth J.J. Role of C-Reactive Protein at Sites of Inflammation and Infection // Front Immunol. 2018; 9: 754.
22. Woolf A.D. Global burden of osteoarthritis and musculoskeletal diseases // BMC Musculoskelet Disord. 2015; 16(Suppl 1): S3. Published online 2015 Dec 1. doi: 10.1186/1471-2474-16-S1-S3.
23. Zhang J. Meta-analysis of serum C-reactive protein and cartilage oligomeric matrix protein levels as biomarkers for clinical knee osteoarthritis // BMC Musculoskelet Disord. 2018; 19: 22.

Reference (Scopus):

1. Gabrielyan N.I. Skriningovyiy metod opredeleniya srednih molekuly v biologicheskikh zhidkostyah: Metodicheskie rekomendatsii. Mir, c. 11. (1985).

О. Блохина, асп., Л. Кот, канд. биол. наук,
Е. Торгалло, канд. биол. наук, Е. Дворщенко, д-р биол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

КОНЦЕНТРАЦИЯ С-РЕАКТИВНОГО БЕЛКА И МОЛЕКУЛ НИЗКОЙ И СРЕДНЕЙ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ КРЫС В УСЛОВИЯХ КАРРАГИНАН-ИНДУЦИРОВАННОГО ВОСПАЛЕНИЯ И ДЛИТЕЛЬНОГО ПРОФИЛАКТИЧЕСКОГО ВВЕДЕНИЯ ХОНДРОИТИНА СУЛЬФАТА

Целью работы было исследовать профилактическое действие хондроитина сульфата на концентрацию С-реактивного белка и молекул низкой и средней молекулярной массы в сыворотке крови крыс при локальном воспалении задней конечности. Исследования прове-

Надійшла до редколегії 04.03.2019
Отримано виправлений варіант 05.04.2019
Підписано до друку 05.04.2019

Received in the editorial 04.03.2019
Received a revised version on 05.04.2019
Signed in the press on 05.04.2019

дены на белых нелинейных половозрелых крысах-самцах массой 180–240 г с соблюдением общих этических принципов экспериментов на животных. Всех животных разделяли на четыре экспериментальные группы. Первая группа – контроль: животным субплантарно вводили 0,1 мл 0,9 % раствора NaCl в заднюю правую конечность. Вторая группа – животным ежедневно в течение 28 суток внутримышечно вводили терапевтическую дозу 3 мг × кг⁻¹ хондроитина сульфата. Третья группа – животным ежедневно в течение 28 суток внутримышечно вводили 0,1 мл 0,9 % раствора NaCl в заднюю правую конечность и на 29-й день моделировали воспалительный отек конечности (животным субплантарно вводили 0,1 мл 1 % раствора каррагинан в заднюю правую конечность). Четвертая группа – крысам ежедневно в течение 28 дней внутримышечно вводили терапевтическую дозу 3 мг × кг⁻¹ хондроитина сульфата, после чего на 29-й день моделировали воспалительный отек конечности. Животных умерщвляли через 3:00 после инъекции раствора каррагинанна согласно протоколу этического комитета, после чего быстро делали забор крови для дальнейших исследований. Общее количество животных, вовлеченных в экспериментальные исследования, составила 40 особей. Концентрацию С-реактивного белка определяли турбидиметрическим методом. Содержание молекул низкой и средней молекулярной массы определяли скрининговым методом. Установлено, что при каррагинан-индуцированном воспалении задней конечности в сыворотке крови возрастает концентрация С-реактивного белка и молекул низкой и средней молекулярной массы. Показано, что при профилактическом введении препарата на основе хондроитин сульфата животным с каррагинан-индуцированным воспалением вышеуказанные показатели восстанавливались.

Ключевые слова: острое воспаление конечности, хондроитин сульфат, С-реактивный белок, молекулы низкой и средней молекулярной массы.

O. Blokhina, Ph. D stud., L. Kot, Ph. D., Ie.Torgalo, Ph. D., K. Dvorshchenko, Dr. Sc.
Taras Shevchenka National University of Kyiv, Kyiv, Ukraina

C-REACTIVE PROTEIN AND MEDIUM WEIGHT MOLECULES CONCENTRATION IN SERUM OF RATS UNDER CONDITIONS OF CARRAGEENAN-INDUCED INFLAMMATION AND PROLONGED PROPHYLACTIC ADMINISTRATION OF CHONDROITIN SULFATE

The aim of the work was to investigate the preventive effect of Chondroitin Sulfate on the concentration of C-reactive protein and medium weight molecules in blood serum of rats at local inflammation of the hind limb. The studies were conducted on white non-linear, sexually mature male rats weighing 180–240 g, in compliance with the general ethical principles of experiments on animals. All animals were divided into four experimental groups. The first group – control: animals sub-planar injected 0.1 ml of 0.9 % NaCl solution into the posterior right limb. The second group – animals received a therapeutic dose of 3 mg × kg⁻¹ chondroitin sulfate daily for 28 days daily. The third group – animals were infused intramuscularly with 0.1 ml of 0.9 % NaCl solution in the posterior right limb for 28 days and for 29 days inflammatory edema of the limb was stimulated (animals were sub-planar injected with 0.1 ml of 1 % carrageenan solution to the posterior right limb) The fourth group – for 28 days rats were daily intramuscularly injected with a therapeutic dose of 3 mg × kg⁻¹ chondroitin sulfate, after which on 29th day, inflammatory edema of the limb was stimulated. Animals were killed 3 hours after injection of carrageenan solution according to the protocol of the ethical committee, and then blood sampling for further research was quickly taken. The total number of animals involved in experimental studies was 40 individuals. C-reactive protein concentration was determined by turbidimetric method. The content of medium weight molecules was determined by screening method. It has been established that with carrageenan-induced inflammation of the posterior limb, the concentration of C-reactive protein and medium weight molecules increases in the serum. It was shown that the prophylactic administration of chondroitin sulfate based drug on animals with carrageenan-induced inflammation restored the abovementioned parameters.

Key words: acute inflammation of the limb, chondroitin sulfate, C-reactive protein, medium weight molecules.

УДК 634.712:006.015.5(477)

В. Войцехівський, канд. с.-г. наук, А. Андрусик, канд. с.-г. наук, Б. Васьківський, студ.
Національний університет біоресурсів і природокористування України, Київ, Україна,
О. Войцехівська, канд. біол. наук
Київський національний університет ім. Тараса Шевченка, Київ, Україна,
С. Васьківська, зав. відділу
Український інститут експертизи сортів рослин, Київ, Україна,
А. Токар, д-р с.-г. наук
Уманський національний університет садівництва, Умань, Україна

БІОЛОГІЧНА ЦІННІСТЬ ПЛОДІВ МАЛИНИ

Організм людини потребує постійного надходження біологічно активних речовин. Цінним джерелом натуральних і доступних БАР є ягідна продукція, зокрема ягоди малини. Ягоди малини містять комплекс біологічно активних речовин, зокрема фруктозу, глюкозу, органічні кислоти, вітаміни групи А, В1, В2, С, РР, Е, ефірні олії, пектини, клітковину, комплекс поліфенолів, солі міді, заліза, калію, фолієву кислоту тощо. Завдяки наявності саліцилової кислоти ягоди малини здатні тривалий час зберігати свої корисні властивості в різних продуктах переробки. Ягоди містять багато грубих харчових волокон, що є сприятливим для травлення, β-ситостерин і антоціани мають протисклеротичні властивості, а кумарини нормалізують згортання крові. Метою досліджень було здійснення порівняльної оцінки вмісту основних біохімічних сполук та якості ягід різних сортів і гібридів малини, вирощених у навчально-дослідному полі "Плодоовочевий сад" НУБіП України. Під час проведення досліджень використано комплекс міжнародних та державних нормативних документів, а саме: ягоди відбирали у стані технічної стиглості, відповідно до ДСТУ 7179:2010; розмір зразка відповідав ДСТУ ISO 874-2002; визначення компонентів біохімічного складу проводили таким чином: вміст сухих розчинних речовин визначали згідно з ISO 2173-2013, інвертних цукрів – ДСТУ 4954:2008, титрованих кислот – ДСТУ 4957:2008, аскорбінової кислоти – ДСТУ ISO 6557-2:2014; органолептичну оцінку – за загальноприйнятною методикою. За отриманими результатами встановлено, що серед досліджуваних зразків ягоди сортів Бабине літо, Сонце Києва, гібридів – Гібрид № 4а, Гібрид № 2 характеризувались найвищими органолептичними та біохімічними показниками, тому їх доцільно використовувати як для споживання у свіжому вигляді, так і для перероблення. Отримані результати доцільно враховувати при плануванні та створенні насаджень малини, а також у подальшій селекційній роботі для отримання конкурентоспроможних сортів та гібридів малини з підвищеним вмістом біологічно активних сполук у ягодах.

Ключові слова: ягоди, малина, сорт, біохімічний склад, біологічно активні речовини, якість.

Вступ. Культура малини є надзвичайно поширеною на території України. Насадження містяться переважно у приватному секторі, але з кожним роком спостерігається збільшення площ та виробництва малини в середньому на 5–10 % у господарствах усіх форм власності [13, 14].

За даними з наукових джерел встановлено, що формування біологічно активних речовин у ягодах та їх смакові характеристики залежать від ряду факторів, зокрема ґрунтово-кліматичних умов вирощування, сорту, технології, застосування ріст-регулюючих речовин тощо [4, 9, 10, 16].

Ягоди малини, завдяки здатності формувати комплекс біологічно активних речовин, мають цінні лікувально-профілактичні властивості. Вони містять фруктозу, глюкозу, комплекс органічних кислот, ефірні олії, пектини, клітковину, комплекс поліфенолів. Серед мінеральних біологічно активних речовин виявлено такі, на 100 г маси сирової речовини: кальцій – 25 мг, залізо – 0,69, магній – 22, фосфор – 29, калій – 151, натрій – 1 мг, цинк – 0,42, мідь – 0,09 мг, марганець – 0,67 мкг і селен – 0,2 мкг. Ягоди малини багаті на вітаміни, на 100 г маси сирової речовини: аскорбінова кислота – 26,2 мг, тіамін – 0,032, рибофлавін – 0,038, ніотинова кислота – 0,598, пантотенова кислота – 0,329, вітамін В₆ – 0,055, бетаїн – 0,8, холін 12,3, вітамін Е (α-токоферол – 0,87, β – 0,06, γ – 1,42, δ – 1,04 мг), фолієва кислота – 21 мкг, каротин (α – 16, β – 12 мкг), лютеїн + зеаксантин – 136 мкг та вітамін К (філлохінон) – 7,8 мкг. За вмістом заліза малина поступається лише вишні й агрусу. Завдяки наявності саліцилової кислоти в ягодах, малина здатна тривалий час зберігати свої корисні властивості: сушена, перетерта з цукром чи у вигляді варення, майже так само корисна, як і свіжа. Ягоди містять багато грубих харчових волокон, що є сприятливим для травлення, β-ситостерин і антоціани мають протисклеротичні властивості, а кумарини нормалізують згортання крові. Комплекс органічних кислот у плодах малини в основному представлений лимонною, яблучною і саліциловою. Тому малина має сечогінні, жовчогінні, протианемічні, потогінні властивості, сприяє зміцненню стінок кровоносних судин, оздоровлення кишечнику тощо. Свіжі ягоди малини ефективні при лікуванні атеросклерозу, гіпертонії, колітів, гастритів, цинги, недокрів'я. Малина дуже корисна для вагітних і тих, хто планує дітей, завдяки підвищеному вмісту фолієвої кислоти. Малина покращує роботу нирок і знімає набряки, оскільки відвар з її листя має легку сечогінну дію. Малина корисна людям, життя і професійна діяльність яких пов'язана з фізичними навантаженнями і нервовим напруженням [1, 5, 6, 7, 12].

Ягоди малини є відмінним джерелом біологічно активної аскорбінової кислоти (вітамін С). Наразі помічено істотне коливання вмісту цієї сполуки залежно від сорту, гібриду, зони вирощування, агротехнологій і погодних умов. Участь аскорбінової кислоти в біохімічних процесах людського організму дуже різноманітна. Вона є частиною окислювально-відновлювальної системи, необхідної для синтезу білка. Цей вітамін бере участь в утворенні колагену, який є важливим компонентом зв'язку, хрящів, кісток і дентину зубів. Аскорбінова кислота необхідна для нормальної роботи нервової тканини, вона сприяє всмоктуванню заліза у травному тракті з подальшим формуванням гемоглобіну, підтримує в клітинах організму активну (відновлену) форму фолієвої кислоти, яка незамінна під час синтезу білків і нуклеїнових кислот.

Вітамін С бере участь в обміні вуглеводів, прискорює засвоєння і руйнування глюкози та пірвіноградної кислоти, необхідних для отримання енергії в клітинах. Аскорбінова кислота стимулює антибактеріальну активність лейкоцитів і підсилює фагоцитоз, при цьому сприяє виробленню протизапальних речовин і має протиалергічну дію. Підвищуючи активність дихальних ферментів клітин печінки, вітамін С прискорює руйнування токсичних продуктів, покращує обмін речовин і забезпечує синтез білків системи згортання крові [2–3, 9–10, 13].

Тому в сучасних ринкових і екологічних умовах важливо здійснювати добір таких сортів та гібридів малини, які б характеризувалися високим урожаєм, стабільними і високими показниками біологічно активних речовин [6, 8, 13].

Метою наших досліджень було проаналізувати вміст основних біологічно активних речовин в ягодах малини та виявити найцінніші зразки.

Матеріали і методи. Дослідження проведено на кафедрі технології зберігання, переробки та стандартизації продукції рослинництва ім. проф. Б. В. Лесика НУБіП України. Для порівняльного аналізу використано багаторічні дані. Ягоди відбирали у стані технічної стиглості, відповідно до ДСТУ 7179:2010, розмір зразка відповідав ДСТУ ISO 874-2002. Уміст сухих розчинних речовин (СРВ) визначали згідно з ISO 2173-2013, інвертний цукор – ДСТУ 4954: 2008, титровані кислоти – ДСТУ 4957: 2008, вітамін С (аскорбінову кислоту) – ДСТУ ISO 6557-2:2014. Найкращі зразки визначали шляхом ранжування досліджуваних показників за значущістю [11, 15].

Результати та їх обговорення. У результаті проведених досліджень встановлено, що вміст сухих речовин (СР) у досліджуваних сортах коливався в межах від 14,2 % (Благородна) до 19,5 % (Моллінг) (табл. 1). На доволі високому рівні цей показник (понад 17,0 %) у сортів Журавлик, Новокітаївська та Красний дощ. Найнижчим цей показник (14–16 %) є у зразків Гібрид № 2, Сонце Києва, Благородна.

Вміст сухих розчинних речовин у ягодах малини коливався в межах 9,5–14,0 %. Для технічної переробки доцільно використовувати сорти із вмістом СРР не менше 9,0 %. Найвищий уміст цих сполук виявлено в ягодах сортів Моллінг (14,0 %), Журавлик (12,8 %). Найнижчі показники СРР спостерігали у сортів Сонце Києва (9,5 %), Благородна (9,8 %), у решти сортів уміст СРР коливався в межах (10,0–12,0 %). З огляду вищенаведених даних для технічної переробки придатні всі досліджувані сорти й гібриди малини. У результаті проведеного кореляційного аналізу виявлено тісну пряму залежність між вмістом СР та сухих розчинних речовин (СРР) ($r = 0,86 \pm 0,14$; $y = 0,1737x^2 - 5,0174x + 45,943$) і концентрацією інвертованого цукру ($r = 0,80 \pm 0,09$; $y = 0,0279x^2 + 0,5123x + 6,6762$).

Таблиця 1. Уміст хімічних сполук в ягодах малини

Сорти	Вміст, %				Цукрово-кислотний індекс
	СР*	СРР**	інвертних цукрів	титрованих кислот	
Одарка	16,7	10,0	6,64	1,50	4,42
Журавлик	18,2	12,8	6,10	1,65	3,69
Моллінг	19,5	14,0	7,50	1,35	5,55
Основ'янка	17,5	11,8	6,27	0,96	6,53
Бабине літо	17,4	11,5	7,06	1,44	4,90
Гібрид № 12	17,0	11,0	5,94	1,34	4,43
Гібрид № 4а	15,2	10,2	4,92	1,02	4,82
Гібрид № 2	16,4	10,0	5,64	0,64	8,81
Марія	17,2	10,0	5,51	1,50	3,67
Сонце Києва	15,5	9,5	5,26	1,06	4,96
Новокітаївська	17,0	11,5	6,10	1,92	3,10

Красний дощ	17,0	11,2	6,27	1,09	5,75
Благородна	14,2	9,8	5,26	1,41	3,73
<i>HIP₀₅</i>	1,83	0,95	1,22	0,35	1,11

* сухі речовини

** сухі розчинні речовини

Частину СРР становлять загальні цукри, у досліджуваних зразках їх вміст від 4,92 (Гібрид № 4а) до 7,06 % (Бабине літо). Більше 6,0 % моноцукрів помічено у зразках сортів Одарка, Основ'янка, Новокиївська, Красний дощ. Статистична обробка даних виявила тісну пряму кореляційну залежність між вмістом СРР і концентрацією інвертованих цукрів ($r = 0,75 \pm 0,13$; $y = -0,0058x^2 + 0,5478x + 0,7073$).

Уміст органічних кислот у ягодах малини різних сортів коливається в межах 0,64–1,92 %. Найвищий їх вміст виявлено у сортів: Новокиївська (1,92 %), Журавлик (1,65), Бабине літо (1,44), а найнижчий – у зразків Основ'янка (0,96 %), Гібрид № 2 (0,62), Гібрид № 4а (1,02 %).

Ягоди малини містили аскорбінову кислоту до 14,52–34,32 мг/100 г залежно від сорту (рис. 1). За вмістом аскорбінової кислоти (понад 30 мг/100 г сирової речовини) слід зазначити ягоди сортів Моллінг та Журавлик; понад 25 мг/100 г – у ягодах сортів Основ'янка, Бабине літо та Гібрид № 4а. Доволі низьким вмістом вітаміну С характеризувались ягоди сортів Красний дощ (14,52 мг/100г), Сонце Києва (17,16 мг/100 г). Для решти сортів і гібридів характерне середнє значення цього показника (18,48–24,42 мг/100 г) (рис. 1).

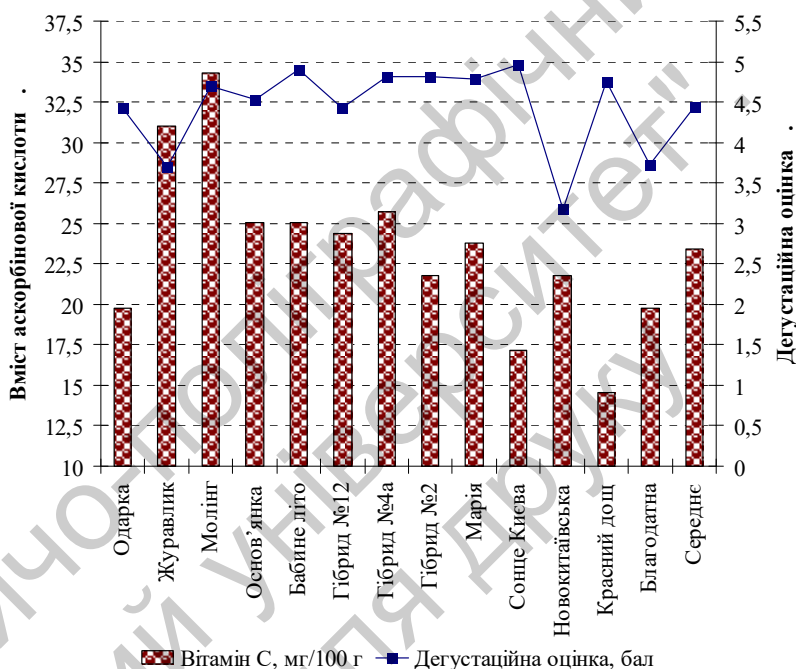


Рис. 1. Уміст аскорбінової кислоти та якість ягід досліджуваних зразків малини

Органолептична оцінка зразків малини показала, що найбільш збалансований смак і аромат характерний для ягід сортів Основ'янка, Красний дощ і Гібрид № 2, цукрово-кислотний коефіцієнт яких становить 6,53, 5,75 та 8,81. Більш низький показник цукрово-кислотного індексу спостерігали у ягід сортів Новокиївська, Журавлик та Благородна.

У результаті статистичної обробки даних виявлено обернену кореляційну залежність між органолептичними показниками ягід і вмістом титрованих кислот ($r = -0,60 \pm 0,14$) та пряму залежність органолептичної оцінки з цукрово-кислотним індексом ($r = 0,49 \pm 0,08$; $y = -1,1435x^2 + 1,7371x + 4,1376$).

Висновок. Проведений аналіз якісних характеристик ягід малини за біохімічним складом основних біологічно активних речовин і кореляційний аналіз їхніх органолептичних властивостей дозволив зазначити сорти Бабине літо, Сонце Києва, гібриди – Гібрид № 4а, Гібрид № 2 як найбільш цінні, тому їх доцільно використовувати для споживання у свіжому вигляді, а також для перероблення. Наразі найбільший вміст аскорбінової кислоти в ягодах сортів Журавлик та Моллінг (понад

30 мг/100 г) дозволяє виділити їх як перспективну високовітамінну-фармацевтично цінну сировину. Отримані результати доцільно використати у подальшій селекційній роботі для створення конкурентоспроможних сортів та гібридів малини з підвищеним вмістом біологічно активних речовин у ягодах, а також урахувати при плануванні й підборі сортименту малини для вирощування якісної та біологічно цінної продукції в зоні Лісостепу України, а також для споживання у свіжому вигляді й промислового перероблення.

Список використаної літератури:

1. Аврач А. С. Биологически активные вещества плодов и водных извлечений малины обыкновенной / А. С. Аврач, Е. В. Сергунова, Я. В. Куксова // Фармация. – 2014. – № 1. – С. 8–10.
2. Бархатова Є. І. Визначення рівня аскорбінової кислоти в лікарських рослинах і можливість їх практичного застосування при гіповітаміннозі С / Є. І. Бархатова, Р. Г. Сафін, Н. А. Бархатова // Юний учений. – 2017. – № 5. – С. 60–67.
3. Войцехівська О. В. Фенольні сполуки: різноманіття, біологічна активність, перспективи застосування / О. В. Войцехівська, О. В. Ситар, Н. Ю. Таран // Вісн. Харківськ. нац. аграр. ун-ту. Серія біологія. – 2015. – Вип. 1 (34). – С. 104–119.
4. Жбанова Е. В. Изменчивость по годам биохимического состава ягод ремонтантных сортов малины / Е. В. Жбанова, Е. И. Ознобкина

// Агроэкологические аспекты устойчивого развития АПК: Материалы XII междунар. науч. конф., Брянск, 2015. – С. 72–75.

5. Кароматов И.Д., Малина как лечебное средство / И.Д. Кароматов, М.Р. Аслонова // Биология и интегративная медицина. – 2018. – № 3. – С. 211–226.

6. Environmental effect on antioxidant content of ten raspberry cultivars / P. P. Moore, P. Perkins-Veazie, C. A. Weber, L. Howard // Acta Hort. – 777. P. 499-504. doi.org/10.17660/ActaHortic.2008.777.76.

7. Никулин А.А. Биохимическая оценка сортов ремонтантной малины / А.А. Никулин, А.Ф. Никулин // Агроэкологические аспекты устойчивого развития АПК: Материалы XII Междунар. науч. конф., Брянск, 2015. – С. 120–123.

8. Productivity and fruit quality of primocane raspberry cultivars and selections / A. Sasnauskas, L. Buskiene, T. Siksnianas and Rubinskiene // Acta Hort. – 2012. – 946. P. 89-93. doi.org/10.17660/ActaHortic.2012.946.11.

9. Семенова Л. Г. Химический состав плодов малины и ежевики в условиях предгорной зоны Адыгеи / Л. Г. Семенова, Е. А. Добренков // Состояние и перспективы развития ягодоводства в России: Материалы Всерос. науч.-метод. конф., 19–22 июня 2006. – Орел: ВНИИСПК, 2006. – С. 258–261.

10. Семенова Л. Г. Устойчивость ягодных культур к экстремальным факторам среды Северного Кавказа / Л. Г. Семенова // Садоводство и виноградарство XXI века: Материалы междунар. науч.-практ. конф. – Краснодар, 1999. – Ч. 3. – С. 210–213.

11. Скалецька Л. Ф. Методи наукових досліджень зі зберігання та переробки продукції рослинництва: навч. посіб. / Л. Ф. Скалецька, Г. І. Подпрятков, О. В. Завадська. – К.: ЦП Компринт, 2014. – 416 с.

12. Orzeł A. Evaluation of vegetative growth and fruit chemistry of some raspberry and blackberry cultivars grown in southern Poland / A. Orzeł, K. Król-Dyrek, A. Kostecka-Gugala et al. // Acta Hort. – 2016. – 1133, 371-378. doi.org/10.17660/ActaHortic.2016.1133.58.

13. Подпрятков Г. І. Товарознавство продукції рослинництва / Г. І. Подпрятков, Л. Ф. Скалецька, В. І. Войцехівський. – К.: Арістей, 2005. – 256 с.

14. Подпрятков Г. І. Технології зберігання, переробки та стандартизація сільськогосподарської продукції / Г. І. Подпрятков, В. І. Войцехівський, М. Кіліан та ін. – К.: ЦП Компринт, 2017. – 658 с.

15. Франс Дж. Математические модели в сельском хозяйстве / Дж. Франс, Дж. Х. М. Торнли / пер. с англ. А. С. Каменского; под ред. Ф. И. Ерешко. – М.: Агропромиздат, 1987. – 400 с.

16. Яшин Я. И. Природные антиоксиданты – надежная защита человека от опасных болезней и старения. / В. Ю. Рыжнев, А. Я. Яшин, Н. И. Черноусова. – М.: НПО "Химвавтоматика", 2008. – 122 с.

References (Scopus):

1. Avrach A.S., Sergunova E.V., Kuksova Ya.V. Biologicheski aktivnie veschestva plodov i vodnih izvlecheniy maliny obiknovennoi [Biologically active substances of fruits and water extracts of raspberry ordinary]. Pharmacy. 2014; 1: P. 8–10. Russian.

2. Barhatova E.I., Safin R.G., Barhatova N.A. Vznachennya rinvya askorbinovoyi kisloti v liksrskiyi roslinah i mozhlivih yih praktichnogo zastosuvannya pri gipovitaminozi C [Determination of the level of ascorbic acid in medicinal plants and the possibility of their practical application with hypovitaminosis C Yuniy ucheniy [Young scientist]. 2017; 5: P. 60–67. Ukrainian.

3. Voytsekhivska O.V., Sitar O.V., Taran N.Yu. Fenolni spoluki: riznomanitya, biologichna aktivnist, perspektivi zastosuvannya [Phenolic compounds: diversity, biological activity, prospects! Application]. Visnik harkivskogo natsionalnogo agrarnogo universitetu seriya biologiya [Bulletin of Kharkov National Agrarian University series biology]. 2015; Vol. 1(34): P. 104–119. Ukrainian.

4. Zhanova E.V., Oznobkina E.I. Izmenchivost po godam biokhicheskogo sostava yagod remontantnyih sortov maliny [The variability by years of the biochemical composition of berries of raspberry remnant varieties]. Agroekologicheskie aspektyi ustoychivogo razvitiya

АПК: Materialy XII mezhdunarodnoy nauchnoy konferentsii. – Agro-environmental aspects of sustainable development of the agro-industrial complex: Proceedings of the XII international scientific conference. 2015: P. 72–75. Russian.

5. Karomatov I.D., Aslonova M.R. Malina kak lechebnoe sredstvo [Raspberry as a remedy]. Biologiya i integrativnaya meditsina [Biology and Integrative Medicine]. 2018;3: P. 211–226.

6. Moore P.P., Perkins-Veazie P., Weber C.A., Howard, L. Environmental effect on antioxidant content of ten raspberry cultivars. Acta Hort. 2008; 777: P. 499-504. doi.org/10.17660/ActaHortic.2008.777.76.

7. Nikulin A.A., Nikulin A.F. Biokhicheskaya otsenka sortov remontantnoy maliny. [Biochemical evaluation of varieties of repairing raspberries]. Agroekologicheskie aspektyi ustoychivogo razvitiya APK: Materialy XII mezhdunarodnoy nauchnoy konferentsii. [Agro-ecological aspects of sustainable development of agroindustrial complex: Materials of the XII international scientific conference]. 2015. P. 120-123. Russian.

8. Sasnauskas A., Buskiene L., Siksnianas T., Rubinskiene, M. Productivity and fruit quality of primocane raspberry cultivars and selections. Acta Hort. 2015; 946: P. 89-93. doi.org/10.17660/ActaHortic.2012.946.11.

9. Semenova L., Dobrenkov E. Himicheskii sostav plodov maliny i ezheviki v usloviyah predgornoy zonyi Adygei. [The chemical composition of the fruits of raspberry and blackberry in the foothill zone of Adygea]. Sostoyanie i perspektivy razvitiya yagodovodstva v Rossii: materialy Vseros. nauch.-metod. konf. [State and prospects for the development of berry in Russia: materials All-Russian scientific and methodical conf.]. 2006. Oryol: VNIISPК, 2006. P. 258-261. Russian.

10. Semenova L.G. Ustoychivost yagodnykh kultur k ekstremalnym faktoram sredy Severnogo Kavkaza. [Resistance of berry crops to extreme environmental factors of the North Caucasus]. Sadovodstvo i vinogradarstvo 21 veka: materialy mezhd. nauch.-prakt. konf. [Horticulture and Viticulture of the 21st Century: materials of the Int. scientific-practical conf.]. – Krasnodar, 1999. – P. 3. – P. 210–213. Russian.

11. Skaletska L.F., Podpryatov G.I., Zavadskaya O.V. Metodi naukovykh doslidzhen zi zberigannya ta pererobki produktii roslinnitstva: navch. posib. [Methods of scientific research on preservation and repartition of plant products]. – K. ITC Komprint, 2014. 416 p. Ukrainian.

12. Orzeł A., Król-Dyrek K., Kostecka-Gugala A. At al. Evaluation of vegetative growth and fruit chemistry of some raspberry and blackberry cultivars grown in southern Poland. Acta Hort. 2016; 1133: 371–378. doi.org/10.17660/ActaHortic.2016.1133.58.

13. Podpryatov G.I., Skaletska L.F., Voitsekhivskiy V.I. Tovaroznavstvo produktii roslinnitstva. [Commodity study of crop production]. K. Aristey. 2005. – 256 p. Ukrainian.

14. Podpryatov G.I., Voitsekhivskiy V.I., Killian M. Tehnologii zberigannya, pererobki ta standartizatsiya silskogospodarskoi produktii. [Technologies of storage, processing and standardization of agricultural products]. K. ITC Komprint, 2017. 658 p. Ukrainian.

15. Frans J., Thornley J.H.M. Matematicheskie modeli v sel'skom hozyaystve. [Mathematical models in agriculture]. Per. s ang. A.S.Kamenskogo / Pod red. F.I. Ereshko. M. Agropromizdat. 1987. – 400 p. Russian.

16. Yashin A.Y., Ryzhnev V.Yu., Chernousova N.I. Prirodnyie antioksidanty – nadezhnaya zaschita cheloveka ot opasnykh bolezney i stareniya. [Natural antioxidants – reliable protection of the person from dangerous diseases and aging]. M. NPO Himavtomatika. 2008. – 122 p. Russian.

Надійшла до редколегії 05.03.2019
Отримано виправлений варіант 05.04.2019
Підписано до друку 05.04.2019

Received in the editorial 05.03.2019
Received a revised version on 05.04.2019
Signed in the press on 05.04.2019

В. Войцеховский, канд. с.-х. наук, А. Андрусик, канд. с.-х. наук, Б. Васильковский, студ. Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, Киев, Украина, О. Войцеховская, канд. биол. наук Киевский национальный университет им. Тараса Шевченка, Киев, Украина, С. Васильковская, зав. отделением Украинский институт экспертизы сортов растений, Киев, Украина, А. Токарь, д-р с.-х. наук Уманский национальный университет садоводства, Умань, Украина

БИОЛОГИЧЕСКАЯ ЦЕННОСТЬ ПЛОДОВ МАЛИНЫ

Организм человека нуждается в постоянной поступлении биологически активных веществ. Ценным источником натуральных и доступных БАВ является ягодная продукция, в частности ягоды малины. Ягоды малины содержат комплекс биологически активных веществ: фруктозу, глюкозу, органические кислоты, витамины группы А, В₁, В₂, С, Р, Е, эфирные масла, пектины, клетчатку, комплекс полифенолов, соли меди, железа, калия, фолиевую кислоту и др. Благодаря наличию салициловой кислоты ягоды малины способны длительное время сохранять свои полезные свойства в различных продуктах переработки. Ягоды содержат много грубых пищевых волокон, что благоприятно для пищеварения, β-ситостерин и антоцианы имеют противосклеротические свойства, а кумарины нормализуют свертываемость крови. Целью исследования было осуществление сравнительной оценки содержания основных биохимических веществ и качества ягод различных сортов и гибридов малины, выращенных на учебно-опытном поле "Плодово-огородной сад" НУБиП Украины. При проведении исследований использованы комплекс международных и государственных нормативных документов, а именно: ягоды отбирали в состоянии технической спелости в соответствии ДСТУ 7179 : 2010; размер образца отвечал ДСТУ ISO 874-2002; определение компонентов биохимического состава проводили: содержание сухих растворимых веществ опре-

було показано, що складний тест, який виконується бімануально і заснований на поєднанні завдань Струпа, Поффенберга, Сперрі, відображає міжпівкульне передавання інформації [1]. Ефект Струпа, який дозволяє оцінити рівень довільної уваги, широко використовується і у дослідженні мовних функцій [10]. Завдання Струпа полягає у тому, що обстежуваному подається слово, яке означає певний колір, написане або відповідним кольором – конгруентне (напр., "червоне" червоним), або невідповідним кольором – неконгруентне ("червоне" зеленим). При збігу семантичного значення і кольору реакції здійснюються найшвидше (явище полегшення), при розбіжності – найповільніше (явище інтерференції). Згідно з "анатомічною моделлю" Поффенберга, коли використовується рука з того самого боку, що і латералізований вхід, виявлення стимулу й моторна відповідь об'єднуються в одній і тій самій півкулі (не перехрещений шлях). На противагу, коли використовується друга рука, протилежна до сторони пред'явлення стимулу, виявлення і відповідь мають бути об'єднані між півкулями через мозолисте тіло (перехрещений шлях). Цей довший шлях має повільніший час реакції, що і було виявлено Поффенбергом та підтверджено багатьма іншими дослідниками. Завдання Сперрі полягає в тому, що використовуються подразники першої та другої сигнальних систем, які більшою мірою залучають до оброблення праву та ліву півкулі мозку відповідно. Подразник (слово "зелений" або "червоний", написане відповідним або невідповідним кольором) пред'являвся справа або зліва від центра екрана. У випадку збігу кольору слова і його семантичного значення потрібно було натискати клавішу іпсилатеральною рукою (відповідь "так"), розбіжності – контралатеральною рукою (відповідь "ні"). Було виявлено, що відповіді "так" надаються швидше, ніж відповіді "ні", як правою, так і лівою рукою. Порівняння латентних періодів (ЛП) однойменних відповідей обох рук показало, що відповіді "так" надаються швидше правою рукою, а відповіді "ні" – лівою, унаслідок чого різниця ЛП між "так" і "ні" для лівої руки менша, ніж для правої. Це вказує на легше перенесення інформації із лівої півкулі у праву, ніж у зворотному напрямку [1]. Метою роботи стало дослідження зв'язку успішності виконання комбінованого тесту із завданнями Струпа, Поффенберга, Сперрі рідною (українською) та іноземною (англійською) мовами із успішністю навчання хлопців 9-х класів.

Матеріали та методи. Обстежуваними були учні 9-х класів Українського фізико-математичного ліцею КНУ імені Тараса Шевченка (хлопці віком 14–15 років). Дослідження проводилось за допомогою комп'ютерної методики – модифікованої версії тесту під операційну систему MS Windows одночасного пред'явлення подразників, які належать до різних сигнальних систем [2]. У цьому дослідженні були використані українська та англійська мови. Схема обстеження полягала у проходженні кожним учнем 4-х субтестів. Під час 1-го субтесту на чорному фоні екрану подавалися подразники ("ЧЕРВОНИЙ" або "ЗЕЛЕНИЙ" (українською мовою), які написані червоним або зеленим кольором і експонуються ліворуч або праворуч від центра екрана. У випадку збігу кольору слова і його семантичного значення необхідно реагувати рукою з боку появи сигналу – натискати на клавіатурі комп'ютера клавішу іпсилатеральною рукою (відповідь "так"), у разі розбіжності – натискати іншу клавішу протилежною рукою (відповідь "ні"). Слова подаються у довільному режимі (час очікування наступного подразника псевдовипадковий в інтервалі

від 1,5 до 2,0 с, тобто доволі довгий, не створює для обстежуваного часової депривації). Під час 2-го субтесту на чорному фоні екрану подавалися подразники "RED" або "GREEN" (англійською мовою) за аналогічною схемою. У наступних 2-х субтестах на чорному фоні екрану подавалися подразники ("ЧЕРВОНИЙ", "ЗЕЛЕНИЙ", "ЖОВТИЙ", "СИНИЙ") – українською мовою (3-й субтест) та подразники "RED", "GREEN" "YELLOW", "BLUE" – англійською мовою (4-й субтест) за аналогічною схемою. У кожному пред'явленні на 160 мс раніше від появи слова для привертання уваги та фокусування зору обстежуваного в центрі екрана з'являється білий хрестик. Загальна кількість пред'явлених сигналів дорівнює 160. Для оцінки успішності навчання було зібрано бали за перший семестр із дев'яти дисциплін (гуманітарні, природничі, точні науки) в I групі (n = 13) – хлопчики, які пройшли комп'ютерне тестування, і в II групі (n = 53) – хлопчики, які не проходили тестування. Також для обстежуваних I групи були зібрані результати суб'єктивної оцінки вчителем рівня володіння англійською мовою учнями (від 1 до 10 балів).

Статистичний аналіз результатів проводився за допомогою пакету STATISTICA 6.0 (Statsoft, USA, 2001). Нормальність розподілів змінних перевірялась тестом Ліліфора, який є модифікацією тесту Колмогорова – Смірнова. Оскільки субтести проходили одні й ті самі обстежувані, а розподіл частини параметрів за критерієм Ліліфора відрізнявся від нормального, для множинного порівняння груп було використано ранговий дисперсійний аналіз Фрідмана. Усі величини ефектів часткової ета у квадраті (partial eta squared) були розраховані з використанням ANOVA. ЛП реакцій аналізувалися 3 × 2 повторними вимірюваннями ANOVA з факторами: Мова + Кількість кольорів ("рідна+два кольори", "іноземна+два кольори", "рідна+чотири кольори", "іноземна+чотири кольори"), Рука ("ліва" проти "правої"), Тип відповіді ("так" проти "ні"). Для порівняння двох незалежних вибірок було застосовано критерій Вілкоксона (критерій T). Кореляційний аналіз даних проводився за Спірменом. Критичний рівень значущості при перевірці статистичних гіпотез приймався рівним $p = 0,05$.

Результати та їх обговорення. ЛП реакції при першому проходженні тесту (українською мовою, два кольори – червоний і зелений) виявились довшими, ніж при трьох наступних, в яких застосовувались подразники як українською, так і англійською мовами, і як на два, так і на чотири кольори ($F(3, 36) = 12,462$, $p = 0,0001$, $\eta^2 = 0,509$) (рис. 1). Тому цілком зрозуміло, що перше проходження тесту можна розглядати як впрацювання, а в подальшому кількість кольорів і мова не впливали на швидкість і якість проходження тестів (кількість допущених помилок була невеликою і не відрізнялась при проходженні всіх тестів).

Реакції "так" здійснюються швидше, ніж реакції "ні" ($F(1, 12) = 33,916$, $p = 0,0008$, $\eta^2 = 0,738$), тобто наявний ефект Струпа. За аналізом ЛП реакцій виявлений ефект взаємодії між Типом відповіді ("так" проти "ні") і Рукою (права проти лівої) ($F(1, 12) = 6,8129$, $p = 0,02280$, $\eta^2 = 0,362$). Це повністю узгоджується з нашими попередніми результатами і вказує на базовий характер виявленого механізму міжпівкульного перенесення інформації [1].

За результатами кореляційного аналізу успішності навчання з ЛП реакції при проходженні тестів отримали статистично значущі коефіцієнти кореляції з успішністю навчання практично лише з англійської мови (табл. 1). Отримані негативні значення коефіцієнтів кореляції

означають, що чим коротші ЛП реакцій, тим вища успішність навчання учнів. Це вказує на те, що успішність

навчання з англійської мови найбільше залежить від швидкості міжпівкульної взаємодії.

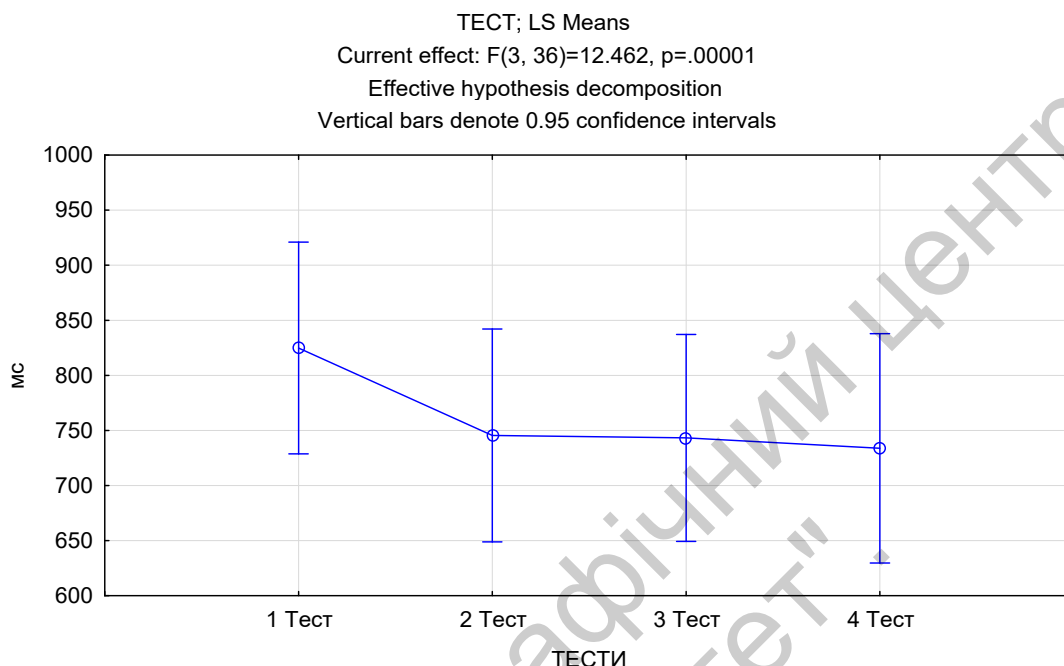


Рис. 1. Аналіз ANOVA латентних періодів реакції хлопчиків при проходженні комбінованого тесту із завданнями Струпа, Поффенберга, Сперрі рідною (українською) та іноземною (англійською) мовами ($n = 13$)

Примітка: Тест 1: два кольори, слова українською мовою; Тест 2: два кольори, слова англійською мовою; Тест 3: чотири кольори, слова українською мовою; Тест 4: чотири кольори, слова англійською мовою.

Цікаво, що суб'єктивна оцінка знань учнів з англійської мови вчителем менше корелює з ЛП реакцій при виконанні тесту, ніж семестрова оцінка, виставлена ним самим (табл. 1). Це означає, що суб'єктивна оцінка педагога може бути дещо оманливою, оскільки включає і

ті емоційні аспекти сприйняття учня, які не пов'язані із рівнем його оволодіння предметом.

Оцінка з англійської мови для протестованих хлопців становила 7,92 ($n = 13$), тоді як для всіх хлопців 9-х класів – 6,96 ($n = 53$), тобто була майже на 1 бал нижчою.

Таблиця 1. Коефіцієнти кореляції показників успішності навчання та латентних періодів реакції при проходженні комбінованого тесту із завданнями Струпа, Поффенберга, Сперрі рідною (українською) та іноземною (англійською) мовами у хлопців ($n = 13$)

Spearman Rank Order Correlations MD pairwise deleted Marked correlations are significant at $p < 0.05000$

	англійська мова	українська мова	історія	географія	хімія	біологія	алгебра	геометрія	фізика	суб'єктивна оцінка рівня англ. мови вчителем
Лв "Так" 2У	-0.31	0.18	0.28	0.45	0.50	0.28	0.50	0.42	0.53	-0.22
Лв "Ні" 2У	-0.24	-0.22	0.08	0.14	0.06	-0.07	0.07	0.19	0.12	-0.17
Пр "Так" 2У	-0.56	-0.10	0.13	0.24	0.38	0.18	0.31	0.18	0.39	-0.41
Пр "Ні" 2У	-0.48	-0.31	0.11	0.01	0.20	-0.10	0.28	0.32	0.31	-0.47
Лв "Так" 2А	-0.65	-0.30	-0.18	0.07	0.15	0.06	-0.09	-0.07	0.09	-0.45
Лв "Ні" 2А	-0.45	-0.33	-0.03	-0.10	0.08	0.20	-0.12	-0.14	-0.01	-0.21
Пр "Так" 2А	-0.70	-0.34	-0.07	-0.05	0.14	0.22	-0.03	-0.14	0.16	-0.52
Пр "Ні" 2А	-0.66	-0.41	0.01	-0.17	0.14	0.20	-0.00	0.03	0.20	-0.54
Лв "Так" 4У	-0.77	-0.37	-0.13	-0.09	0.02	0.03	-0.08	-0.18	0.06	-0.69
Лв "Ні" 4У	-0.83	-0.54	-0.19	-0.31	-0.24	-0.05	-0.06	-0.35	-0.01	-0.73
Пр "Так" 4У	-0.73	-0.29	-0.05	-0.09	-0.02	-0.04	-0.03	-0.10	0.01	-0.66
Пр "Ні" 4У	-0.84	-0.43	-0.05	-0.13	-0.16	-0.10	0.17	-0.14	0.20	-0.75
Лв "Так" 4А	-0.63	-0.14	0.20	0.16	0.04	0.18	0.35	0.00	0.43	-0.52
Лв "Ні" 4А	-0.63	-0.22	0.18	0.06	-0.07	0.01	0.25	-0.07	0.43	-0.60
Пр "Так" 4А	-0.12	0.27	0.73	0.01	0.06	0.50	0.37	0.11	0.43	-0.11
Пр "Ні" 4А	-0.71	-0.22	0.19	0.02	-0.05	0.03	0.32	0.04	0.35	-0.67

Примітка: Лв – ліва рука, Пр – права рука; "Так" – реакція у разі збігу кольору слова і його семантичного значення; "Ні" – реакція у разі розбіжності кольору слова та його семантичного значення; 2У – пред'явлення двох кольорів українською мовою, 2А – пред'я-

влення двох кольорів англійською мовою; 4У – пред'явлення чотирьох кольорів українською мовою, 4А – пред'явлення чотирьох кольорів англійською мовою. Жирним і більшим кеглем виділено статистично значущі коефіцієнти кореляції.

Кореляційний аналіз показників успішності навчання виявив, що у групі протестованих хлопців (табл. 2) успішність із англійської мови пов'язана лише з успішністю з української мови, тоді як успішність навчання за іншими предметами доволі тісно корелює між собою. На відміну від іноземної мови, успішність з української мови тісно пов'язана з успішністю по всіх предметах, і навіть із суб'єктивною оцінкою рівня англійської мови вчителем.

Можемо припустити, що в учнів, які мають кращі знання з англійської мови, у мозку складається окрема нейромережа для опрацювання цієї інформації, яка є доволі незалежною від нейромереж, що необхідні для успішного опанування всіх інших предметів. Успішність навчання за всіма іншими предметами залежить від рідної мови, на базі якої це навчання здійснюється (табл. 2, 3). Оскільки нами отримані кореляційні зв'язки латентних періодів реакції при проходженні комбінованого тесту із завданнями Струпа, Поффенберга, Спер-

рі, які відображають швидкість міжпівкульного передавання інформації, лише з успішністю навчання з англійської мови (табл. 1), то саме ефективна міжпівкульна взаємодія, імовірно, є базовою вимогою для успішного оволодіння іноземною мовою, оскільки нейронні основи мови представлені в обох півкулях: знаково-символьні – у лівій, а образно-емоційні – у правій. Для того, щоб іноземна мова автоматизувалась і ставала "все ріднішою", необхідний швидкий доступ виконавчих структур мозку, таких, як фронтопарієтальна нейромережа, до лінгвістичних нейромереж, представлених у обох півкулях. За даними літератури, гальмівний механізм контролю з боку дорзолатеральної префронтальної кори як ключової структури фронтопарієтальної системи мозку може бути одним із декількох механізмів, що лежить в основі двомовної переваги [5]. Отримані нами результати доповнюють ці уявлення, указуючи на важливість швидкості міжпівкульної взаємодії.

Таблиця 2. Коефіцієнти кореляції показників успішності навчання при проходженні комбінованого тесту із завданнями Струпа, Поффенберга, Сперрі рідною (українською) та іноземною (англійською) мовами у хлопців (n = 13)

Spearman Rank Order Correlations MD pairwise deleted Marked correlations are significant at p < .05000

	англ. мова	укр. мова	історія	географія	хімія	біологія	алгебра	геометрія	фізика	суб'єктивна оцінка рівня англ. мови вчителем
англ. мова	1.00									
укр. мова	0.67	1.00								
історія	0.35	0.70	1.00							
географія	0.38	0.76	0.42	1.00						
хімія	0.28	0.65	0.56	0.67	1.00					
біологія	0.31	0.66	0.66	0.52	0.53	1.00				
алгебра	0.15	0.64	0.72	0.66	0.64	0.45	1.00			
геометрія	0.29	0.58	0.61	0.61	0.75	0.43	0.77	1.00		
фізика	-0.00	0.56	0.71	0.64	0.72	0.56	0.86	0.68	1.00	
суб'єктивна оцінка рівня англ. мови вчителем	0.93	0.71	0.37	0.51	0.34	0.44	0.24	0.30	0.08	1.00

Примітка: жирним і більшим кеглем виділено статистично значущі коефіцієнти кореляції.

У загальній групі учнів показники дещо інші. Успішність із англійської мови пов'язана з успішністю навчання за всім блоком гуманітарних та природничих предметів (табл. 3).

Таблиця 3. Коефіцієнти кореляції показників успішності навчання при проходженні комбінованого тесту із завданнями Струпа, Поффенберга, Сперрі рідною (українською) та іноземною (англійською) мовами у хлопців (n = 53)

Spearman Rank Order Correlations MD pairwise deleted Marked correlations are significant at p < .05000

	англ. мова	укр. мова	історія	географія	хімія	біологія	алгебра	геометрія	фізика
англ. мова	1.00								
укр. мова	0.50	1.00							
історія	0.45	0.58	1.00						
географія	0.47	0.54	0.60	1.00					
хімія	0.33	0.34	0.53	0.37	1.00				
біологія	0.47	0.51	0.51	0.39	0.35	1.00			
алгебра	0.25	0.46	0.33	0.33	0.41	0.43	1.00		
геометрія	0.25	0.36	0.16	0.14	0.36	0.44	0.74	1.00	
фізика	0.25	0.42	0.36	0.38	0.53	0.34	0.55	0.55	1.00

Примітка: жирним і більшим кеглем виділено статистично значущі коефіцієнти кореляції.

Висновки: Виявили статистично значущі коефіцієнти кореляції латентних періодів реакцій при виконанні складного тесту Струпа з успішністю навчання з англійської мови, що може вказувати на особливу за-

лежність успішності оволодіння іноземною мовою від ефективності міжпівкульної взаємодії. В учнів із вищим рівнем навчання з англійської мови отримано прямий кореляційний зв'язок успішності навчання із цього

предмета лише з успішністю навчання з української мови, тоді як у учнів із нижчим рівнем навчання з англійської мови виявлено також прямі кореляційні зв'язки з оцінками з історії та природничих наук. Імовірно, у мозку учнів із вищим рівнем опанування іноземної мови виникають тісніші зв'язки між нейронними системами оброблення обох мов – рідної та іноземної. Використання цього тесту має прогностичне значення: чим коротші латентні періоди реакції – тим кращий рівень володіння англійською мовою.

Список використаних джерел:

1. Куценко Т. В. Міжпівкульне перенесення інформації при виконанні складного тесту Струпа із залученням просторової ознаки у правшів і лівшів / Т. В. Куценко // Вісн. Черкаськ. ун-ту. Серія: Біологічні науки. – 2017. – № 1. – С. 37–47.
2. Куценко Т. В. Виконання комбінованого тесту із завданнями Струпа, Поффенберга, Сперри у нав'язаному та довільному режимі / Т. В. Куценко, Д. Б. Наседкін // Вісн. Черкаськ. ун-ту. Серія: Біологічні науки. – 2018. – № 1. – С. 62–69.
3. Caldwell-Harris C. L. Emotionality differences between a native and foreign language implications for everyday life / C. L. Caldwell-Harris // Current Directions in Psychological Science. – 2015. – Vol. 24. – P. 214–219.
4. Costa A. Your morals depend on language / A. Costa, A. Foucart, S. Hayakawa et al. // PLoS one. – 2014. – 9 (4).-e94842.
5. D'Souza D. Bilingual Language Control Mechanisms in Anterior Cingulate Cortex Dorsolateral Prefrontal Cortex: A Developmental Perspective / D. D'Souza, H. D'Souza // Journal of Neuroscience. – 2016. – 36 (20). – P. 5434–5436.
6. Donnelly S. Examining the bilingual advantage on conflict resolution tasks: a meta-analysis / S. Donnelly, P. J. Brooks, B. Homer // Paper presented at the 37th Annual Conference of the Cognitive Science Society, Pasadena, CA, July. – 2015. – 596–601.
7. Grundy J. G. and Kalinka Timmer Bilingualism and working memory capacity: A comprehensive meta-analysis / J. G. Grundy, K. Timmer // Second Language Research. – 2017. – Vol. 33(3). – P. 325–340.
8. Geukes S. Stroop effects from newly learned color words: effects of memory consolidation and episodic context / S. Geukes, M. G. Gaskell, P. Zwitserlood // Frontiers in Psychology. – 2015. – Vol. 6. – No. 278. – P. 1–16.
9. Lehtonen M. Is bilingualism associated with enhanced executive functioning in adults? A meta-analytic review / M. Lehtonen, A. Sovari, A. Laine et al. // Psychological Bulletin. – 2018. – 144 (4). – P. 394–425.

10. MacLeod C. M. Half a century of research on the Stroop effect: an integrative review // Psychological Bulletin. – 1991. – Vol. 101. – No. 2. – P. 163–203.

References (Scopus):

1. Kutsenko T. Interhemispheric transfer of information in performance of complex Stroop test involving spatial properties by right- and left-handers / Kutsenko T. // Bulletin of Cherkasy university. Biological Sciences Series. – 2017. – № 1. – P. 37–47
2. Kutsenko T. Performance of the combined test with the tasks of Stroop, Poffenberger, Sperry in the forced and voluntary regimes / Kutsenko T., Nasiedkin D. // Bulletin of Cherkasy university. Biological Sciences Series. – 2018. – № 1. – P. 62–69.
3. Caldwell-Harris C. L. Emotionality differences between a native and foreign language implications for everyday life / Caldwell-Harris C. L. // Current Directions in Psychological Science. – 2015. – Vol. 24. – P. 214–219.
4. Costa A. Your morals depend on language / Costa A., Foucart A., Hayakawa S., Aparici M., Apesteguia J., Heafner J., Keysar B. // PLoS one. – 2014. – 9 (4).-e94842.
5. D'Souza D. Bilingual Language Control Mechanisms in Anterior Cingulate Cortex Dorsolateral Prefrontal Cortex: A Developmental Perspective/ D'Souza D., D'Souza H. //Journal of Neuroscience. – 2016. – 36 (20). – P. 5434-5436.
6. Donnelly S. Examining the bilingual advantage on conflict resolution tasks: a meta-analysis / Donnelly S., Brooks P.J., Homer B. // Paper presented at the 37th Annual Conference of the Cognitive Science Society, Pasadena, CA, July. – 2015. – 596–601.
7. Grundy J. G. and Kalinka Timmer Bilingualism and working memory capacity: A comprehensive meta-analysis / Grundy J.G., Timmer K. // Second Language Research. – 2017. – Vol. 33(3). – P. 325–340.
8. Geukes S. Stroop effects from newly learned color words: effects of memory consolidation and episodic context / Geukes S., Gaskell M.G., Zwitserlood P // Frontiers in Psychology. – 2015. – Vol. 6. – No. 278. – P. 1–16.
9. Lehtonen, M. Is bilingualism associated with enhanced executive functioning in adults? A meta-analytic review / Lehtonen, M., Sovari, A., Laine, A., Järvenpää, J., de Bruin, A., & Antfolk, J. // Psychological Bulletin. – 2018. – 144(4). – P. 394–425.
10. MacLeod C. M. Half a century of research on the Stroop effect: an integrative review // Psychological Bulletin. – 1991. – Vol. 101. – No. 2. – P. 163–203.

Надійшла до редколегії 05.03.2019
Отримано виправлений варіант 08.04.2019
Підписано до друку 08.04.2019

Received in the editorial 05.03.2019
Received a revised version on 08.04.2019
Signed in the press on 08.04.2019

Т. Куценко, канд. биол. наук, доц., Д. Наседкін, мол. наук. співроб., Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна, Л. Латищенко, канд. биол. наук, учитель вищої категорії, М. Гавриленко, учениця Український фізико-математический лицей КНУ імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

СВЯЗЬ УСПЕВАЕМОСТІ В ИЗУЧЕНИИ ИНОСТРАННОГО ЯЗЫКА СО СКОРОСТЬЮ МЕЖПОЛУШАРНОГО ПЕРЕНОСА ИНФОРМАЦИИ

Двуязычные лица якобы превосходят одноязычных лиц в выполнении невербальных задач на тестирование исполнительных функций, таких, как тесты Симона, Фленкера и Струпа, а также в мощности оперативной памяти. Другие исследователи сомневаются относительно таких когнитивных преимуществ билингвов и мультилингвов. В обследовании применен комбинированный тест с заданиями Струпа, Поффенберга, Сперри на родном (украинском) и иностранном (английском) языках. В качестве обследуемых выступали ученики лицея (юноши 14–15 лет). Раздражитель (слово "зеленый" или "красный", "желтый" или "синий", написанное соответствующим или несоответствующим цветом) предъявлялся справа или слева от центра экрана. В случае совпадения цвета слова и его семантического значения нужно было нажимать клавишу ипсилатеральной рукой (ответ "да"), несовпадения – контрольной рукой (ответ "нет"). Принимались во внимание латентные периоды реакции на раздражители, которые отражают скорость межполушарного переноса информации. Корреляционный анализ показателей успешности обучения по девяти предметам из трех блоков (гуманитарные, естественные и точные дисциплины) выявил прямые корреляционные связи скорости реакции при выполнении сложного теста Струпа как на родном, так и на английском языке с успешностью обучения английскому языку, что может указывать на особую зависимость успешности овладения иностранным языком от эффективности межполушарного взаимодействия. Для того, чтобы иностранный язык автоматизировался и становился "все роднее", необходим быстрый доступ исполнительных структур мозга, таких, как фронтотаргетальная нейросеть, к лингвистическим нейросетям, представленным в обоих полушариях. По данным литературы, тормозной механизм контроля со стороны дорзотаргетальной префронтальной коры как ключевой структуры фронтотаргетальной системы мозга может быть одним из нескольких механизмов, лежащих в основе двуязычного преимущества. Полученные нами результаты дополняют эти представления, указывая на важность скорости межполушарного взаимодействия.

Ключевые слова: успешность обучения, задача Струпа, задача Поффенберга, межполушарный перенос информации, иностранный язык.

T. Kutsenko, Phd., D. Nasiedkin, junior researcher
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine,
L. Latyshenko, Phd., M. Gavrylenko, schoolgirl
Ukrainian Physical and Mathematical Lyceum of Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ukraine

RELATION OF SUCCESS IN STUDY OF FOREIGN LANGUAGE WITH SPEED OF INTERHEMISPHERIC TRANSFER OF INFORMATION

Bilingual speakers seem to outreach monolingual speakers in performing non-verbal tasks for testing executive functions, such as Simon, Flanker and Stroop tasks, as well as in capacity of working memory. Other researchers have doubts about these cognitive benefits of bilinguals and multilinguals. The study used a combined test with the tasks of the Stroop, Poffenberger, Sperry in native (Ukrainian) and foreign (English) languages. Schoolboys of lyceum were the subjects surveyed (14-15 years old). Stimuli (the word "Green" or "Red", "Blue" or "Yellow" written in relevant or irrelevant color) were exposed on the right or left from the center of the screen. In the case of congruence the word and its semantic meaning should press one button by the ipsilateral hand ("yes"), while in the case of mismatch – the other button by the contralateral one ("no"). Latent periods of response to stimuli, which reflect the speed of the interhemispheric transfer of information, were taken into account. Correlation analysis of the success in study on the nine subjects of the three blocks (humanities, natural and formal disciplines) reveal a direct correlation of speed of reaction when performing the complex Stroop test in both the native and English languages with the success in the learning English language, what may indicate on special dependence of the success from interhemispheric interaction. In order for the foreign language to be automated and become "all the more native", it is needed the fast access of the executive structures of the brain, such as the front-parietal neural network, to the linguistic neural networks, presented in both hemispheres. According to literature, the inhibitory control mechanism from the dorsolateral prefrontal cortex as the key structure of the front-parietal brain system may be one of several mechanisms underlying bilingual superiority. The results obtained by us complement this conception, indicating the importance of the speed of interhemispheric interaction.

Key words: success in study, task of Stroop, tasks of Pophfenberger, interhemispheric transfer of information, foreign language.

УДК 577.217.5

О. Цуварев, асист.
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна,
Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ, Україна,
Л. Коломієць, в. о. наук. співроб., В. Заєць, канд. біол. наук, І. Блащак, студ.,
О. Корнелюк, д-р біол. наук
Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ, Україна

ВИДІЛЕННЯ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА МУТАНТНОГО N-КІНЦЕВОГО КАТАЛІТИЧНОГО МОДУЛЯ ТИРОЗИЛ-ТРНК СИНТЕТАЗИ *B. TAURUS* ІЗ ЗАМІНОЮ Trp 87 ТА Trp 283 НА АЛАНІН

Аміноацил-тРНК синтетаза є одним із основних ферментів білкового синтезу. Тирозил-тРНК синтетаза (TyrRS) ссавців складається із двох структурних одиниць, N-кінцевого каталітичного (міні TyrRS) та C-кінцевого цитокіно-подібного модулів. У повнорозмірній TyrRS N-кінцевий модуль здійснює каталітичну функцію зв'язування амінокислоти із тРНК, тоді як C-модуль корегує та стабілізує розміщення тРНК в активному центрі фермента. Після розщеплення тирозил-тРНК синтетази еластазою на міні TyrRS та C-модуль, останні виявляють цитокінові властивості. Метою роботи була оптимізація експресії клонованої у плазміді pET30a-39KYRS кДНК міні TyrRS *Bos taurus*, в якій за допомогою сайт-спрямованого мутагенезу кодони триптофана в положенні 87 та 283 замінені на кодони аланіна, та отримання мутантного однотриптофанового білка міні BtTyrRS для подальшого дослідження за допомогою методів флуоресцентної спектроскопії конформаційних змін фермента на стадії утворення тирозиладенілату та при взаємодії з акцепторним кінцем тРНК_{Tyr}, а також визначення впливу залишків триптофану в положенні 87 та 283 в його структурі на структурно-динамічні й функціональні властивості ензиму. Установлено, що заміна двох кодони амінокислоти триптофана на кодони амінокислоти аланіна в кДНК міні BtTyrRS, клонованої в експресуючій плазміді pET30a-39KYRSW40, не впливає на синтез і розчинність мутантної форми ферменту в штамі *E. coli* BL21(DE3)pLysE. Кількість розчинної форми рекомбінантної мутантної міні BtTyrRS у цитоплазмі бактеріальних клітин при експресії в штамі *E. coli* BL21(DE3)pLysE значно підвищується при інкубації бактеріальної культури за температури 25° С порівняно з температурою інкубації при 37° С. Вихід отриманого очищеного білка мутантної міні BtTyrRS становить у середньому 2,5 мг із 100 мл культурального середовища, що є достатнім для проведення подальших структурно-функціональних досліджень мутантної форми ферменту. Методом флуоресцентної спектроскопії показано компактну структуру рекомбінантного білка.

Ключові слова: тирозил-тРНК синтетаза, міні TyrRS, бактеріальна експресія.

Вступ. Аміноацил-тРНК синтетаза (TyrRS) є одним із основних ферментів білкового синтезу. На дорибосомному етапі трансляції у високоспецифічній енергозалежній реакції синтетаза каталізує активацію амінокислоти та приєднання її до гомологічної транспортної РНК, здійснюючи таким чином першу стадію декодування інформації про структуру білка, закладену в нуклеотидній послідовності ДНК та РНК [1, 2].

Тирозил-тРНК синтетаза *Bos taurus* складається із двох структурних модулів, N-кінцевого каталітичного (відповідає укороченій формі фермента міні BtTyrRS, 342 а.з., 39 кДа) та C-кінцевого цитокіноподібного (166 а.з., 20 кДа) [2]. У повнорозмірній BtTyrRS (528 а.з., 59.2 кДа) N-кінцевий модуль здійснює каталітичну функцію ковалентного зв'язування відповідної амінокислоти із тРНК, тоді як C-модуль корегує та стабілізує розміщення тРНК в активному центрі фермента [1, 2]. Після розщеплення тирозил-тРНК синтетази еластазою на міні BtTyrRS та C-модуль останні виявляють цитокінові властивості [3–5].

Тести на цитокінову активність NH₂-кінцевого каталітичного домену TyrRS виявили, що міні TyrRS є хемотоксичним фактором для нейтрофілів, а також стимулює ангиогенез по концентраційно залежному шляху. Уважається, що цитокінова активність міні TyrRS опо-

середковується консервативним мотивом ELR у каталітичному домені синтетази [4–5].

У фізіологічних умовах тирозил-тРНК синтетаза *Bos taurus* являє собою гомодимер α₂ типу, мономером якого є повнорозмірний фермент. При виділенні BtTyrRS із печінки бика було показано, що поряд із основною формою виділяється також і функціонально активна протеолітично модифікована форма тирозил-тРНК синтетази з молекулярною вагою 39 кДа, яка має повну ферментативну активність в експериментах *in vitro* [2, 6–7].

Оскільки N-кінцевий каталітичний модуль синтетази являє собою інтерлейкін-подібний цитокін і виявляє проангіогенні властивості. Він є перспективним об'єктом для досліджень з метою можливого використання в подальшому в якості у вигляді лікарських препаратів.

У структурі каталітичного модуля тирозил-тРНК синтетази містяться три залишки триптофану W40, W87 і W283, які розташовані, відповідно, в активному центрі ферменту, в області димеризації мономерів міні BtTyrRS та в сайті зв'язування триплета антикодону тРНК_{Tyr}. Таке розташування залишків триптофану в амінокислотній послідовності білка робить дуже перспективним дослідження його властивостей методами флуоресцентної спектроскопії за умов наявності лише одного залишка в кожному із трьох положень у структурі ферменту. У зв'язку з цим за допомогою сайт-

спрямованого мутагенезу ми замінили в кДНК міні *BtTyrRS*, клонованої в плазміді *pET30a-39KYRS*, кодони *Trp87* та *Trp283* на кодони аланіну, залишивши лише один кодон триптофану в каталітичному центрі ферменту *W40* (Стаття подана до друку).

Метою нашої роботи було отримання даного рекомбінантного одотриптофанового білка міні *BtTyrRS* для подальшого дослідження конформаційних змін ферменту на стадії утворення тирозиладенілату та при взаємодії з акцепторним кінцем *tRNKTyr*, а також визначення впливу залишків триптофану в положенні *87* та *283* у його структурі на структурно-динамічні та функціональні властивості ензиму.

На сьогодні запроваджено декілька гетерологічних експресійних систем для отримання рекомбінантних білків. Вони засновані на клітинних лініях ссавців, клітинах дріжджів і бактерій, а також клітинних лініях комах [8]. Серед них найбільшим попитом користується бактеріальна система *E. coli*. Експресія білків у *E. coli* є недорогим, швидким і простим методом, який дозволяє отримати рекомбінантні білки у великих кількостях у нативному стані [9, 10]. Ми використали в нашій роботі бактеріальну систему *E. coli* для синтезу мутантної форми міні *TyrRS Bos taurus*.

Матеріали і методи. У роботі використовували штам-продуцент рекомбінантного білка, отриманий на основі реципієнта *E. coli* BL21(DE3)pLysE (Stratagene, США), трансформованого відповідною конструкцією за загальною прийнятною методикою [11]. Плазмідна конструкція *pET30a-39KYRSW40* була створена на базі вектора *pET-30a(+)* ("Novagen", США) і містила кДНК, що кодує синтез мутантної по залишках триптофанів у положенні *87* та *283* міні *BtTyrRS* під контролем промотора фага *T7*. Селективним маркером плазміді *pET30a(+)* є ген, який забезпечує стійкість трансформованих клітин до антибіотику канаміцину. Плазмідну ДНК виділяли за допомогою кіта GeneJET Plasmid Miniprep Kit фірми "Thermo Scientific". Концентрацію плазмідної ДНК визначали на спектрофотометрі NanoDrop 2000 ("Thermo Scientific").

Для отримання рекомбінантної плазміді *pET30a-39KYRSW40*, трансформації її у клітини *E. coli* та експресії кДНК каталітичного модуля тирозил-*tRNK* синтети *Bos taurus* використовували відповідно генно-інженерні штами *E. coli* DH5 α та BL21(DE3)pLysE. Компетентні клітини *E. coli* отримували відповідно до методів Нішимури і співавторів [12] та Іное [13]. Усі процедури із трансформації плазмідної ДНК, що кодує послідовність мутантної міні *BtTyrRS*, проводили згідно із [13]. Плазмідні конструкції аналізували методом електрофорезу в 0,7–1 % агарозному гелі.

Вирощування культури *E. coli* та індукцію експресії рекомбінантної міні *BtTyrRS* у бактеріальній культурі проводили в середовищі Лурія-Бертані (LB) із 30 мг/мл антибіотику канаміцину. Трансформовані рекомбінантною плазмідною *pET30a-39KYRSW40* компетентні клітини *E. coli* BL21(DE3)pLysE вирощували на шейкері (Environmental Shaker Incubator ES-20) при 37°С до оптичної густини $A_{600} = 0,7$ та індукували синтез цільового білка додаванням 1 М ізопропіл- β -D-тіогалактопіранозиду (IPTG) до 1 мМ концентрації з наступною інкубацією при 37°С та 25°С упродовж 4 та 16 год відповідно. Зібрану біомасу зі 100 мл культури ресуспен-

дували у 12 мл буфера для лізису клітин (50 мМ натрій-фосфатний буфер, рН 8,0, 500 мМ NaCl, 10 мМ імідазол, 5 мМ β -меркаптоетанол). Лізис проводили за допомогою ультразвукового дезінтегратора *UZ-озвучуванням* (шість циклів по 20 с, інтервали 20 с). Лізат освітлювали центрифугуванням при 13000 об/хв упродовж 30 хв при 4°С. Супернатант наносили на врівноважену буфером для лізису клітин *Ni-NTA* агарозну колонку об'ємом 1 мл, промивали 10 мл буфера для промивки (50 мМ натрій-фосфатний буфер, рН 8,0, 500 мМ NaCl, 20 мМ імідазол, 5 мМ β -меркаптоетанол). Рекомбінантний білок елюювали 5 мл буфера для елюції (50 мМ натрій-фосфатного буфер, рН 8,0, 150 мМ NaCl, 200 мМ імідазол, 5 мМ β -меркаптоетанол). Фракції, у яких було виявлено білок, об'єднували і діалізували проти 200 мл буфера для діалізу (500 мМ натрій-фосфатний буфер рН 8,0, 150 мМ NaCl) упродовж 20-ти год при +4°С. Електрофоретичний аналіз експресії рекомбінантного білка та елюату проводили у 12 % поліакриламідному гелі в денатуруючих умовах буферної системи Леммлі [14]. Гелі фарбували барвником *Cumassie blue R250*. Концентрацію очищеного мутантного білка міні *BtTyrRS* визначали спектрофотометрично на спектрофотометрі *BioMate 5*, використовуючи коефіцієнт екстинкції 9970M-1cm⁻¹ за довжини хвилі 280 нм. Коефіцієнт оптичного поглинання визначали за даними амінокислотного аналізу за допомогою програми *ProtParam*.

Спектри флюоресценції реєстрували на спектрофлуориметрі *Hitachi M850* (Японія), який був обладнаний термостатованим кюветотримачем. Температуру в кюветі визначали з точністю до +0,2°С. Вимірювання проводили у кварцевій кюветі з довжиною оптичного шляху 0,5 см. Спектральна ширина щілин для монохроматора збуджуючого світла та реєструючої системи становила 5–10 нм. Довжина хвилі збуджуючого світла дорівнювала 280 нм, інтервал довжини хвилі для спектрів флюоресценції становив 300–400 нм, реєстрацію флюоресценції проводили під кутом 90° до напрямку пучка збуджуючого світла за температури 25°С.

Результати та їх обговорення. У відділі білкової інженерії і біоінформатики Інституту молекулярної біології та генетики НАНУ було отримано, клоновано та секвеновано повну нуклеотидну послідовність кДНК гену тирозил-*tRNK* синтети *Bos taurus* [15], а також створено експресуючі конструкції *pET-30a(+)-59KYRS* та *pET-30a(+)-39KYRS*, які містили, відповідно, вставки кДНК повнорозмірної *BtTyrRS* (M1–S528) та каталітичного N-кінцевого модуля синтети (M1–P342). Вставка кДНК міні *BtTyrRS* містила також послідовність нуклеотидів, які кодують міжмодульний лінкер (D343–E359), 10 а.з. C-модуля (P360–D369), 42 N-кінцеві амінокислоти вектора та 12 залишків полілінкера плазміді (Дубровський О. Л., неопубліковані дані). Експресовані у штамі *E. coli* BL21 (DE3) рекомбінантні білки зберігали аміноацилюючу здатність, притаманну для нативної аміноацил-*tRNK* синтети. Було побудовано комп'ютерну модель структурної організації N-кінцевого каталітичного модуля *TyrRS Bos taurus* [16]. Цю модель просторової структури гомодимера міні *BtTyrRS* із виділеними трьома триптофановими залишками в положенні 40, 87 та 283 у її структурі наведено на рис. 1.



Рис. 1. Модель просторової структури димера N-кінцевого каталітичного модуля тирозил-тРНК синтетази *Bos taurus*

Клоновані у плазмідах рЕТ-30а-59KYRS та рЕТ-30а-39KYRS кДНК повнорозмірної тирозил-т-РНК синтетази *BtTyrRS* та міні *BtTyrRS* були використані для отримання кодованих ними рекомбінантних білків у системі *E. coli* BL21(DE3)pLysE після трансформації плазмід у бактеріальні клітини. Оскільки кінцевий вихід цільового рекомбінантного білка в бактеріальних системах значною мірою залежить від умов культивування, було експериментально визначено оптимальні параметри для експресії *BtTyrRS* та міні *BtTyrRS* у *E. coli* [17–18]. У роботах досліджувався вплив на експресію *BtTyrRS* і міні *BtTyrRS* таких основних факторів, як кількість індуктора синтезу білка, що вноситься в культуральне середовище, температура та час культивування культури до та після додавання індуктора.

Було показано, що найбільш високий рівень синтезу рекомбінантної міні *BtTyrRS* у *E. coli* досягався при додаванні в культуру індуктора синтезу IPTG у концентрації 1 мМ на 2 годину культивування при досягнанні культурою оптичної густини $OD_{600} = 0,7-0,9$ та інкубації упродовж 4 год за 37° С.

Ми використали ці умови культивування клітин *E. coli* штаму BL21(DE3)pLysE, трансформованих плазмідною рЕТ30а-39KYRSW40, що кодує синтез мутантного по залишках триптофанів у положенні 87 та 283 каталітичного модуля аміноацил-тРНК синтетази, для отримання мутантної міні *BtTyrRS*. Оскільки відомо, що послідовність клонованих генів в експресуючих векторах серії рЕТ із надзвичайно сильним промотором фага Т7 відіграє значну роль як у синтезі рекомбінантних білків, так і в отриманні розчинної фракції новосинтезованих білків, заміна двох кодонів триптофану на кодони аланіну в структурі міні *BtTyrRS* у нашому випадку могла бути критичною і призвести до зниження синтезу ензиму чи його переходу в нерозчинні тільця включення [19]. Тому ми провели одночасно експресію в *E. coli* мутантної та нативної форм міні *BtTyrRS* із плазмід рЕТ-30а(+)-39KYRS і рЕТ30а-39KYRSW40. Як видно з електрофореграми на рис. 2, мутації не вплинули на експресію мутантного білка: кількість синтезованих у бактеріальній культурі після індукції IPTG нативної та мутантної форм каталітичного модуля тирозил-т-РНК синтетази практично однакова.

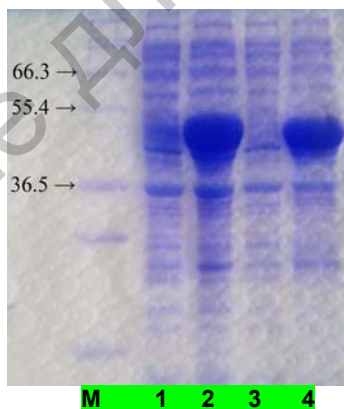


Рис. 2. Електрофоретичний аналіз експресії нативної та мутантної форм каталітичного модуля тирозинової аміноацил-тРНК синтетази у штамі *E. coli* BL21(DE3)pLysE

- М – Маркерна суміш білків ("Invitrogen", Mark 12 Unstained Standart)
- 1 – Клітинний лізат бактеріальної культури трансформованої плазмідною рЕТ-30а(+)-39KYRS штаму BL21(DE3)pLysE до індукції IPTG (контроль)
- 2 – Клітинний лізат бактеріальної культури трансформованої плазмідною рЕТ-30а(+)-39KYRS штаму BL21(DE3)pLysE після індукції IPTG (контроль)
- 3 – Клітинний лізат бактеріальної культури трансформованої плазмідною рЕТ30а-39KYRSW40 штаму BL21(DE3)pLysE до індукції IPTG
- 4 – Клітинний лізат бактеріальної культури трансформованої плазмідною рЕТ30а-39KYRSW40 штаму BL21(DE3)pLysE після індукції IPTG

Аналіз клітинного осаду після освітлювання бактеріальних лізатів у процесі виділення білків показав, що значна кількість як контрольної, так і мутантної форми ензиму все ж знаходяться в цитоплазмі в нерозчинній фракції в тільцях включення приблизно в рівних пропорціях (результати не наведено). Хоча розчинна фракція білка в обох випадках дозволяє отримати достатню кількість рекомбінантних білків для дослідження їх властивостей як біохімічними, так і флюоресцентними методами, було вирішено проаналізувати синтез цільово-

го білка в культурі *E. coli* штаму BL21(DE3)pLysE після індукції IPTG за температури інкубації 25°С. Результати показали в 1,5 рази вищу концентрацію синтезованого білка в розчинній фракції. Після хроматографічної очистки на Ni-NTA агарозі із 100 мл бактеріальної культури було отримано з урахуванням коефіцієнта екстинції 27850 M⁻¹ cm⁻¹ до 2,5 мг гомогенного рекомбінантного мутантного білка міні *BtTyrRS*, чистота якого згідно з електрофорезом досягає 95 % (рис. 3).

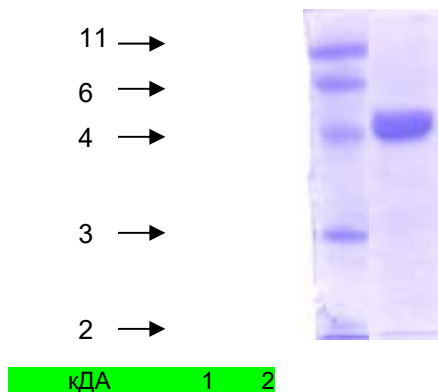


Рис. 3. Електрофоретичний контроль чистоти мутантного білка 39 К TyrRS після хроматографічної очистки на Ni-NTA агарозі (12-відсотковий розділюючий гель)

1 – маркерна суміш (Unstained Protein Molecular Weight Marker #SM0431 Fermentas)
2 – мутантна міні-TyrRS (39 kDa)

Флюоресцентні характеристики отриманого білка, зокрема ширина спектра флуоресценції $\Delta\lambda$ біля 55 нм та його максимум, що припадає на 328 нм, показують

екранування залишку триптофана 40 W гідрофобним мікрооточенням в активному центрі мутантної форми фермента (рис. 4).

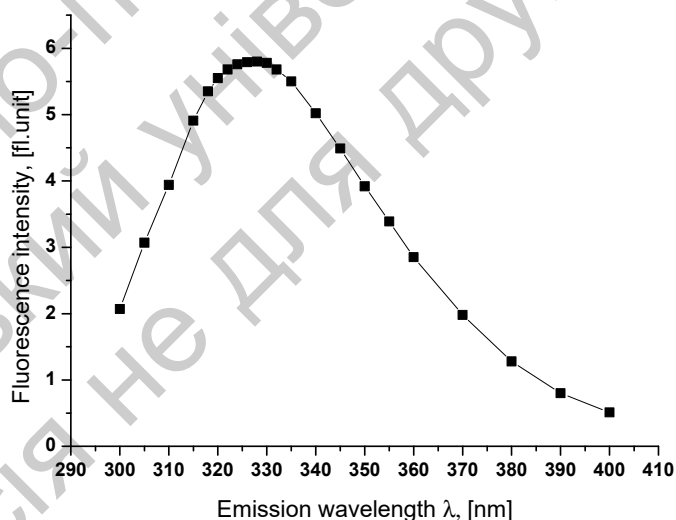


Рис. 4. Спектр флуоресценції мутантної форми W87/283A каталітичного модуля тирозил-тРНКсинтетази *B. taurus* за довжини хвилі збудження 280 нм

Це свідчить про компактний стан отриманого білка і нативність його структури [20]. За даними сервера ProtParam, молекулярна вага отриманої мутантної міні *BtTyrRS* дорівнює 47364,36 Да, ізоелектрична точка pI дорівнює 6,42.

Висновки. У результаті проведеної роботи нами показано, що заміна двох кодонів амінокислоти триптофана на кодони амінокислоти аланіна в кДНК каталітичного модуля тирозинової аміноацил-тРНК синтетази, клонованої в експресуючому векторі pET30a-

39KYRSW40, не впливає на синтез та розчинність мутантної форми ферменту в штамі *E. coli* BL21(DE3)pLysE. Кількість розчинної форми рекомбінантної мутантної міні *BtTyrRS* у цитоплазмі бактеріальних клітин при експресії у штамі *E. coli* BL21(DE3)pLysE значно підвищується при інкубації бактеріальної культури за температури 25°С порівняно з температурою інкубації 37°С. Вихід очищеного гомогенного білка мутантної міні *BtTyrRS* становить у середньому 2,5 мг із 100 мл культурального середовища, що є достатнім для проведення пода-

льших структурно-функціональних досліджень мутантної форми ферменту.

2.52.5 мг гомогенного рекомбінантного мутантного білка білка ?

Список використаних джерел:

- Pang Y. L. J. tRNA synthetase: tRNA aminoacylation and beyond / Y. L. J. Pang, K. Poruri, S. A. Martinis // WIREs RNA. – 2014. – Vol. 56, N 4. – P. 461–480.
- Kornelyuk A. I. Structural and functional investigation of mammalian tyrosyl-tRNA synthetase // Biopolym. Cell. – 1998. – Vol. 14, N 4. – P. 349–359.
- Kornelyuk A. I. Cytokine activity of the non-catalytic EMAP-2-like domain of mammalian tyrosyl-tRNA synthetase / A. I. Kornelyuk, M. P. Tas, A. Dubrovsky et al. // Biopolymers and Cell. – 1999. – Vol. 15, N 2. – P. 168–72.
- Wakasugi K. Induction of angiogenesis by the fragment of human tyrosyl-tRNA synthetase / K. Wakasugi, B. M. Slike, J. Hood et al. // J. Biol. Chem. – 2002. – Vol. 277, N 23. – P. 20124–20126.
- Guo M. Essential nontranslational function of tRNA synthetases / M. Guo M., P. Schimmel // Nature Chemical Biology. – 2013. – Vol. 9, N 3. – P. 145–153.
- Корнелюк А. И. Тирозил-тРНК синтетазы из печени быка. Выделение и физико-химические свойства / А. И. Корнелюк, И. В. Курочкин, Г. Х. Мауца // Молекулярная биология. – 1988. – Т. 22, N 1. – С. 176–186.
- Gnatenko D. V. Isolation and characteristics of functionally active proteolytically modified form of tyrosyl-tRNA synthetase from the bovine liver / D. V. Gnatenko, A. I. Kornelyuk, I. V. Kurochkin et al. // Ukr. Biochem. J. – 1991. – Vol. 63, N 4. – P. 61–67.
- Demain A. L. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms / A. L. Demain, P. Vaishnav // Biotechnol. Adv. – 2009. – Vol. 27, N 3. – P. 297–306.
- Sahdev S. Production of active eucariotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies / S. Sahdev, S. K. Khattar, K. S. Saini et al. // Mol. Cell. Biochem. – 2008. – Vol. 307, № 2. – P. 249–264.
- Rosano G. L. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges / G. L. Rosano, E. A. Cessarelli // Frontiers in Microbiol. – 2014. – Vol. 5. – P. 1–17.
- Sambrook J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual / J. Sambrook, T. Fritsch, T. Maniatis. – 2th ed. – New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- Nishimura A. Rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells / A. Nishimura, M. Morita, Y. Nishimura et al. // Nucl. Acids Res. – 1990. – Vol. 18, № 20. – P. 6169.
- Inoue H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* plasmids / H. Inoue, H. Nojima, H. Okayama // Gene. – 1990. – Vol. 96. – P. 23–28.
- Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U. K. Laemmli // Nature. – 1970. – Vol. 227, № 5259. – P. 680–685.
- Levanets O. V. PCR amplification, cloning and sequencing of cDNA fragment encoding a nucleotide binding domain of mammalian tyrosyl-tRNA synthetase / O. V. Levanets, V. G. Naidenov, M. I. Woodmaska et al. // Biopolym. Cell. – 1996. – Vol. 12, № 5. – P. 66–70.
- Kravchuk O. V. Computational modeling and molecular dynamics simulations of mammalian cytoplasmic tyrosyl-tRNA synthetase and its complexes with substrates / O. V. Kravchuk, O. V. Savvitskiy, K. O. Odynets // J. Biomol. Struct. Dynamics. – 2016. – Vol. 35, № 13. – P. 2772–2788.
- Кондратюк Ю. Оптимізація процесу біосинтезу каталітичного модуля тирозил-тРНК синтетази ссавців та його дослідження імунохімічними методами / Ю. Кондратюк, М. Бабарик, Л. Сидорик та ін. // Вісн. Київ. ун-ту. Серія Біологія. – 2010. – Т. 56. – С. 33–35.
- Кондратюк Ю. Ю. Оптимізація бактеріальної експресії тирозил-тРНК синтетази ссавців при культивуванні штаму *Escherichia coli* BL21(DE3) *pLysE* / Ю. Ю. Кондратюк, М. А. Бабарик, О. І. Корнелюк // Мікробіологія і біотехнологія. – 2009. – Т. 8. – С. 6–12.
- Studier F. W. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high level expression of cloned genes / F. W. Studier, B. A. Moffat // J. Mol. Biol. – 1986. – Vol. 189, N 1. – P. 113–30.
- Reshetnyak Y. K. Decomposition of protein tryptophan fluorescence spectra into log-normal components. II. The statistical proof of discreteness of

tryptophan classes in proteins / Y. K. Reshetnyak, E. A. Burnstein // Biophysical J. – 2001. – Vol. 81. – P. 1710–1734.

References (Scopus):

- Pang YLJ, Poruri K, Martinis SA. tRNA synthetase: tRNA aminoacylation and beyond. WIREs RNA. 2014; 5(4): 461–480.
- Kornelyuk AI. Structural and functional investigation of mammalian tyrosyl-tRNA synthetase. Biopolym. Cell. 1998; 14(4):349-359.
- Kornelyuk A.I, Tas M. P., Dubrovsky A., Murray C. J. Cytokine activity of the non-catalytic EMAP-2-like domain of mammalian tyrosyl-tRNA synthetase. Biopolym Cell. 1999; 15(2): 168–72.
- Wakasugi, Slike BM, Hood J [et al.]. Induction of angiogenesis by the fragment of human tyrosyl-tRNA synthetase. J Biol Chem. 2002; 277(23): 20124-20126.
- Guo M., Schimmel P. Essential nontranslational function of tRNA synthetases. Nat Chem Biol. 2013; 9(3): 145–153.
- Корнелюк А.И., Курочкин И.В., Мауца Г.Х. Тирозил-тРНК синтетаза из печени быка. Выделение и физико-химические свойства. Молекулярная биология. 1988; 22(1):176–186.
- Gnatenko D.V., Kornelyuk A.I., Kurochkin I.V., Ribkinska T.A., Matsuka GKh, Isolation and characteristics of functionally active proteolytically modified form of tyrosyl-tRNA synthetase from the bovine liver. Ukr Biochem J. 1991;63(4): 61–67.
- Demain A.L., Vaishnav P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organism. Biotechnol Adv. 2009; 27(3): 297–306.
- Sahdev S., Khattar S.K., Saini K.S. Production of active eucariotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. Mol Cell Biochem. 2008; 307(2): 249–264.
- Rosano G.L., Cessarelli E.A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. Front Microbiol. 2014; 5:1-17.
- Sambrook J., Fritsch T., Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2th ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- Nishimura A., Morita M., Nishimura Y., Sugino Y. Rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells. Nucl Acids Res. 1990; 18(20): 6169.
- Inoue H., Nojima H., Okayama H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* plasmids. Gene. 1990; 96: 23-28.
- Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970;227(5259):680-685.
- Levanets O.V., Naidenov V.G., Woodmaska M.I., Odynets K.A., Matsuka G.H., Kornelyuk A.I. PCR amplification, cloning and sequencing of cDNA fragment encoding a nucleotide binding domain of mammalian tyrosyl-tRNA synthetase. Biopolym Cell. 1996; 12(5):66-70.
- Kravchuk O.V., Savvitskiy O.V., Odynets K.O., Mykuliak V.V., Korneliuk A.I. Computational modeling and molecular dynamics simulations of mammalian cytoplasmic tyrosyl-tRNA synthetase and its complexes with substrates. J Biomol Struct Dynamics. 2016; 35(13): 2772-2788.
- Кондратюк Ю.Ю., Бабарик М., Сидорик Л., Корнелюк О. Оптимізація процесу біосинтезу каталітичного модуля тирозил-тРНК синтетази ссавців та його дослідження імунохімічними методами. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія Біологія. 2010; 56:33-35.
- Кондратюк Ю.Ю., Бабарик М.А., Корнелюк О.І. Оптимізація бактеріальної експресії тирозил-тРНК синтетази ссавців при культивуванні штаму *Escherichia coli* BL21(DE3) *pLysE*. Мікробіологія і біотехнологія. 2009; 8:6-12.
- Studier F.W., Moffatt B.A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high level expression of cloned genes. J Mol Biol. 1986; 189(1):113-30.
- Reshetnyak Y.K., Burnstein E.A. Decomposition of protein tryptophan fluorescence spectra into log-normal components. II. The statistical proof of discreteness of tryptophan classes in proteins. Biophysical J. 2001; 81:1710-1734.

Надійшла до редколегії 05.03.2019

Отримано виправлений варіант 08.04.2019

Підписано до друку 08.04.2019

Received in the editorial 05.03.2019

Received a revised version on 08.04.2019

Signed in the press on 08.04.2019

А. Цуварев, асист.
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна,
Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, Київ, Україна,
Л. Коломиец, і. о. научн. сотруд., В. Заец, канд. биол. наук, И. Блашак, студ.,
А. Корнелюк, д-р биол. наук
Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, Київ, Україна

ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА МУТАНТНОГО N-КОНЦЕВОГО КАТАЛИТИЧЕСКОГО МОДУЛЯ ТИРОЗИЛ-тРНК СИНТЕТАЗЫ В. TAURUS С ЗАМЕНОЙ Trp 87 И Trp 283 НА АЛАНИН

Аминоацил-тРНК синтетазы является одним из основных ферментов белкового синтеза. Тирозил-тРНК синтетазы (TyrRS) млекопитающих состоит из двух структурных единиц, N-концевого каталитического (мини TyrRS) и C-концевого цитокноподобного модулей. В полноразмерной TyrRS N-концевой модуль осуществляет каталитическую функцию связывания аминокислоты с тРНК, тогда как C-модуль корректирует и стабилизирует размещение тРНК в активном центре фермента. После расщепления тирозил-тРНК синтетазы эластазой на мини TyrRS и C-модуль, последние проявляют цитокниное свойство.

Целью работы была оптимизация экспрессии клонированной в плазмиде pET30a-39KYRS кДНК мини TyrRS *Bos taurus*, в которой с помощью сайт-направленного мутагенеза кодона триптофана в положении 87 и 283 заменены на кодоны аланина и получение мутантного однотриптофанового белка мини BtTyrRS для дальнейшего исследования с помощью методов флуоресцентной спектроскопии конформационных изменений фермента на стадии образования тирозиладенилата и при взаимодействии с акцепторной концом тРНК^{Tyr}, а также определение влияния остатков триптофана в положении 87 и 283 в его структуре на структурно-динамические и функциональные свойства фермента.

Установлено, что замена двух кодонов триптофана на кодоны аланина в кДНК мини TyrRS, клонированной в экспрессирующей плазмиде pET30a-39KYRSW40, не влияет на синтез и растворимость мутантной формы фермента в штамме *E. coli* BL21 (DE3) pLysE. Количество растворимой формы рекомбинантной мутантной мини BtTyrRS в цитоплазме бактериальных клеток при экспрессии в штамме *E. coli* BL21 (DE3) pLysE значительно повышается при инкубации бактериальной культуры при температуре 25° С по сравнению с температурой инкубации при 37° С. Выход полученного очищенного белка мутантной мини BtTyrRS составляет в среднем 2,5 мг с 100 мл культуральной среды, что является достаточным для проведения дальнейших структурно-функциональных исследований мутантной формы фермента. Методом флуоресцентной спектроскопии показана компактная структура рекомбинантного белка.

Ключевые слова: тирозил-тРНК синтетаза, мини TyrRS, бактериальная экспрессия.

O. Tsuvarev, assistant

Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine,

Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine,

L. Kolomiets, research assistant., V. Zayets, Ph.D., I. Blaszcak, student., A. Kornelyuk, Dr.Sc.

Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF THE MUTANT N-TERMINAL CATALYTICAL MODULE OF THE *B. TAURUS* TYROSYL-tRNA SYNTHETASE WITH THE REPLACEMENT OF Trp 87 AND Trp 283 BY ALANINE

Aminoacyl-tRNA synthetase (TyrRS) is one of the major enzymes of protein synthesis. The mammalian tyrosyl-tRNA synthetase consists of two structural units, the N-terminal catalytic (mini TyrRS) and the C-terminal cytokine-like modules. In a full length TyrRS, the N-terminal module carries out the catalytic function of binding the amino acid to tRNA, while the C-module adjusts and stabilizes the placement of tRNA in the active center of the enzyme. After cleavage of tyrosyl-tRNA synthetase with elastase on the mini TyrRS and C-module, the latter exhibit cytokine properties.

The aim of the work was to optimize the expression of cloned cDNA miniTyrRS *Bos taurus* in plasmid pET30a-39KYRS in which the tryptophan codons at position 87 and 283 are replaced with alanine codons using the site-directed mutagenesis, and to obtain the mutant one-tryptophan protein of the mini BtTyrRS for further study on using methods of fluorescence spectroscopy of conformational changes of the enzyme at the stage of tyrosyladenylate formation and in interaction with the acceptor end of tRNA^{Tyr}, as well as determination of the effect of tryptophan residues in positions 87 and 283 in its structure on the structurally dynamic and functional properties of the enzyme.

It was found that the replacement of two tryptophan codons into the alanine codons in the cDNA of the mini TyrRS cloned in the expressing plasmid pET30a-39KYRSW40 does not affect the synthesis and solubility of the mutant form of the enzyme in the strain *E. coli* BL21 (DE3) pLysE. The amount of soluble form of the recombinant mutant mini BtTyrRS in the cytoplasm of bacterial cells, when expressed in *E. coli* BL21 (DE3) pLysE strain, is significantly enhanced by incubation of bacterial culture at a temperature 25 ° C compared to a culture incubation at 37 ° C. The yield of the obtained purified protein of the mutant mini BtTyrRS is 2.5 mg per average from 100 ml of culture medium, which is sufficient for further structural and functional studies of the mutant form of the enzyme. The compact structure of the recombinant protein is shown by fluorescence spectroscopy.

Key words: tyrosyl-tRNA synthetase, mini TyrRS, bacterial expression

UDK 57.084.1:615.357:616-091.814:616-056.527

O. Kalmukova, Ph. D stud., T. Kushmyruk, stud., M. Dzerzhynsky, Dr. Sc.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

THE EFFECTS OF MELATONIN ADMINISTRATION IN DETERMINED TIMES OF DAY ON THE KIDNEY IN RATS WITH HIGH-CALORIE DIET-INDUCED OBESITY

Kidneys, like the cardiovascular system, are one of the main target organs, the most vulnerable to obesity, because the first take on the metabolism correction function at an increasing excess of fat tissue in the body. Kidney affection under obesity is a multifactorial thing that is caused by a number of processes, including inflammation, oxidative stress, lipid metabolism disorders, renin-angiotensin-aldosterone system activation, insulin resistance and other factors. An optimal candidate for reducing the harmful effects of kidneys obesity should be a compound that simultaneously exhibits anti-inflammatory and antioxidant properties, controls the circadian rhythm, and also affects on the adipokines secretion. The molecule that meets these conditions is melatonin. The aim of our study was to determine morpho-functional state (morphology characteristic of kidney glomeruli and tubules; morphometric parameters: area and density of glomeruli) of kidney in rats with high-calorie (high fat) diet-induced obesity after melatonin administration in determined time of the day. Melatonin was administered daily by gavage for 7 weeks in dose 30 mg/kg 1 h before lights-off (ZT11) rats with high-calorie diet (HCD). Rats with HCD had huge changes in kidney morphology, which manifested in presence of numerous mesangial cells outside glomeruli and lipid droplets in tubules epithelial cells, while area and density of glomeruli in cm² decrease. In general kidney with above mentioned characteristic from HCD rats lose their ability to conduct strongly renal function. After melatonin used in rats with HCD arise leveling of pathological changes, which associated with consumption of HCD. Namely, in rats with development obesity melatonin administrations led to increase area and density of in comparison to HCD group, moreover glomeruli density reach control values. This is suggest that melatonin have protecting effect against glomerular degeneration. In conclusions, melatonin influence on kidney morpho-functional state in rats with HCD and turn back pathological its changes, moreover evening administration can use for obesity therapy via its strong action on conservation glomerular morphology.

Key words: melatonin, obesity, chronotherapy, kidney, high-fat diet, glomeruli.

Introduction. Obesity is one of the main problems of modern society. According to the World Health Organization (WHO), overweight and obesity have become one of the most serious health problems of the 21st century and are recognized as an emerging chronic non-infectious "pandemic" [1]. Obesity is a chronic, reverse disease characterized by fat deposits and an increase in body weight due to adipose tissue. It can be the cause the development of type 2 diabetes, impaired reproductive system functions, cardiovascular, and is accompanied by complications such

as chronic kidney disease. Kidneys, like the cardiovascular system, are the main target organs, which sensitive to obesity, because some of the first take on the metabolism correction function during increasing excess of adipose tissue in the body [2].

Kidney affection during obesity is a multifactorial phenomenon caused by a number of processes, including inflammation, oxidative stress, lipid metabolism disorders, activation of the renin-angiotensin-aldosterone system, increased insulin production, and the formation of insulin

resistance and other factors [3]. At present, obesity has not identified a clear specific clinical and morphological variant of kidney damage, but, according to the study, the most frequent manifestations of nephropathy in obesity in adults are microalbuminuria, proteinuria, hyperfiltration and, less often – a decrease in the filtration function of the kidneys [4]. Obesity is a proven factor for the progression of many variants of chronic kidney disease and terminal renal failure. The formation of kidney damage in obesity is realized in several ways [5]:

- auto- and paracrine effects of adipose tissue hormones and cytokines;
- the effect of insulin resistance, hyperinsulinemia and dyslipidemia;
- disorders of systemic and renal hemodynamics;
- the role of relative oligonephronia with the formation of intra-glomerular hypertension.

Melatonin is an indole hormone produced by the pineal gland and carries out a number of functions in the body: metabolic (lipolytic and hypoglycemic); rhythm control; immunomodulatory antioxidant and mitochondrial-protector. The effect of melatonin on weight loss can be explained by numerous physiological processes of indolamine, which are provided by various mechanisms [6–10]:

- activation of ATP synthesis in mitochondria;
- regulation of expression of the insulin receptor gene, providing a normal glucose metabolism;
- participating in the activation of gonadotropins secretion in the pituitary gland, which leads to suitable producing of testosterone – an important fat burning hormone;
- complicity in the metabolism of serotonin and vitamin D, essential for the implementation of eating behavior within the framework of the functioning of the "brain reward system", as well as for maintaining a normal body shape, primarily due to the optimal amount and quality of muscle mass;
- Antioxidant effect;
- Interaction with leptin.

Thus, melatonin is a universal endogenous adaptogen that regulates homeostasis according to changes in the environment and the influence of pathogenic factors on the body.

In humans blood pressure, body temperature, blood concentrations of melatonin, insulin, corticosteroids and adrenalin display nearly 24-hour (circadian) cyclic rhythms. Chronotherapy aims to reduce adverse drug reactions and optimize drug efficacy by timing drug administrations in accordance with the body's circadian rhythms [11–12]. Peak of melatonin synthesis at mid night, and also receptors mainly are presented after light-off mostly. Thus, melatonin administration after 1 hour light-off supposedly will be more effective than others routs of administrations [13].

Materials and methods. White nonlinear male rats weighing 100-120 g were used in this study. The light cycle was 12-h light and 12-h darkness, with lights-off at 19:00 h. All experiments on animals were carried out in compliance with the international principles of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for experimental and other scientific purposes (European Convention, Strasburg, 1986), Article 26 of the Law of Ukraine "On the Protection of Animals from Cruelty" (No. 3447-IV, February 21, 2006) as well as all norms of bioethics and biological safety.

During the first week, all animals received standard rodent chow. On the 8th day, the animals were randomized into 2 groups: control animals received standard chow (3,81 kcal/g) for 10 weeks and experimental rats received high-calorie diet (5,35 kcal/g) consisting of standard chow (60 %), lard (10 %), eggs (10 %), sugar (9 %), peanut (5 %), dry milk (5 %) and vegetable oil (1 %) [14]. Food and water were available ad libitum. To confirm the development of obesity the animals were weighed one times a week until the average body gain reached a significant difference of at least 30% between the two groups and the respective animals were classified as having the normal body mass (Control) and those with development of obesity (HCD). Rats of HCD and Control groups were divided into two subgroups: one subgroup received no MT, animals of the second and subgroups obtained MT administrations – single peroral by gavage introductions, 1 h before light-off (group HCD ZT11 and M ZT11). Thus, the experimental subgroups are indicated below as normal body mass (control), HCD, M ZT11, HCD ZT11.

Melatonin (Alcon Biosciences, USA) was administered daily by gavage for 7 wk (30 mg/kg) 1 h before lights-off (ZT11). Melatonin treatment was began at 6th week of study after obesity is developed.

Food and water consumption were measured daily at the same time (09:00 to 10:00 h) and body weights were determined once a week. Body weight gain, relative daily food (kcal/day/g body weight) and relative daily water consumption (ml/day/g body weight) was determined for each rat.

On the last day of the experiment, the animals were decapitated, and then the kidney was isolated. Also the visceral (epididymal, retroperitoneal, mesenteric, perirenal) fat pads were dissected and immediately weighed.

Histological examination was performed to characterize the morphology and functional status of kidney. Fragments of kidney in the size of 1 x 1 cm were fixed in 4 % of paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer for 72 hours, after which they were dehydrated and embedded into paraffin according to a standard procedure. From the paraffin blocks, 5 μ m sections were performed and stained with Bemer's hematoxylin and eosin. Further examination of sections was performed using a light microscope BX41 (Olympus, Japan). Microphotographs were taken using the DP20 (Olympus, Japan) digital camera and the QuickPHOTO MICRO software (Promicra, Czech Republic).

The cross-sectional area of the kidney glomeruli and the numerical density of the glomeruli were used as criteria for assessing the morphology and functional kidney cortex status of glomerular zone. All parameters were measured using the ImageJ software (National Institutes of Health, USA).

Statistical data analysis was performed using the Statistica 6.0 (Stat-Soft, USA) and Microsoft Excel 2010 software (Microsoft, USA). The distribution of values was estimated using Shapiro-Wilk W-test. Since the deviation of these values distribution of from the normality was minor, to evaluate the differences between the values we used Student's t-test. The differences with probability of the null hypothesis

$p < 0.05$ were considered significant. The obtained results are presented as the mean \pm standard error of mean.

Results and discussion. In the sections of the kidney cortical part (tubular zone) HCD group rats were fixed changes in tubular epitheliocytes, namely, cytoplasm accommodate a few amount lipid droplets (Fig. 1, B, **arrow**), which did not stain with water-soluble dyes.

Accumulation of lipid droplets is due to the fact that during obesity as a result of intensive lipolysis, a large number of circulating free fatty acids have been in blood flow. Low levels of adiponectin, tissue resistance to leptin, and cytokines prevent the capture of free fatty acids by mitochondria, inhibit their oxidation and contribute to the accumulation of free fatty acids in the cell [15].

In HCD group also (**Fig. 1 B**, asterisk) marked protein aggregates in the lumen of the renal tubule, which may be the first signs of proteinuria. One mechanism for the appearance of such changes is an elevated angiotensin II level during obesity development, which can directly increase the

permeability of the basal membrane of the glomeruli, thereby contributing to increased proteinuria [16]. Violation of the renal tubules morpho-functional state may be due to hyperinsulinemia during obesity development. Excess insulin stimulates mesangial and proximal tubular cells to produce TGF- β (transforming growth factor β) [17] and contribute to the formation of IGF-1 (insulin-like growth factor 1) in vascular smooth muscle cells and other cell types. In turn, IGF-1 and TGF- β increases the activity of the cytokines [18]. This is manifested by the effect of fibrogenesis on renal tubular cells and interstitial fibroblasts [19].

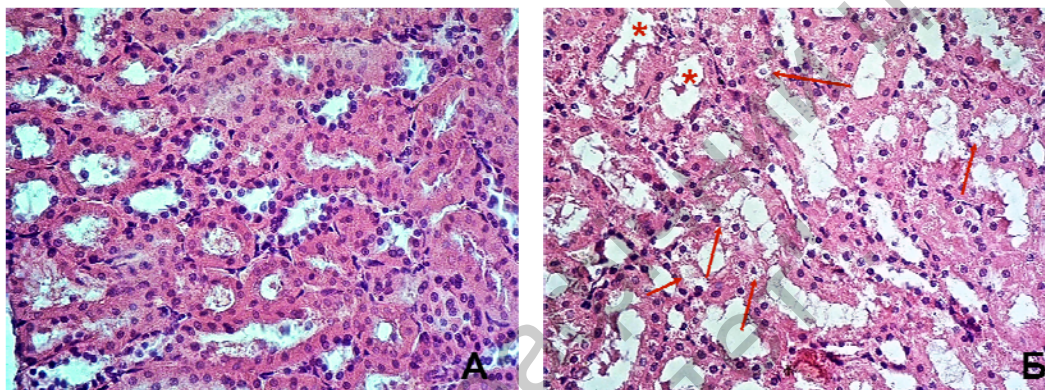


Fig. 1. Microphotographs of rats' kidney sections of the cortical part (tubules):

A – control group, B – HCD group; hematoxylin-eosin staining; oc. x10, ob. x100
Notes: * – lipid droplets, asterisk – protein aggregates in the lumen of the renal tubule

In the kidney cortical part (glomerular zone) under conditions of obesity, expanded space of the capsule (**Fig. 2, B**, asterisk) and enlarged mesangial region from extra-glomerular cells (**Fig. 2, B**, arrow) are observed. One of the mechanisms for the development of such changes is the increase in the level of proinflammatory cytokines, in particular TNF- α , as one of the key pro-inflammatory factors that stimulates the activation of proliferation and sclerosis in mesangial cells of the renal tissue [20], since obesity leads to infiltration of adipose tissue by macrophages. TNF- α is expressed and secreted by adipose tissue. Its concentration correlates with the degree of obesity and its associated insulin resistance, reducing the activity of the insulin receptor. In addition, an increase in the levels of TNF- α promotes the generation of reactive oxygen species (ROS) in glomerular and proximal tubular cells. The enhancement of ROS activity leads to kidney damage in several ways, which include increased renal endothelial dysfunction, microalbuminuria, mesangial expansion, and fibrosis [21]. Another idea to increase the mesangial area is the endothelia (ET) signal system [22]. Internal renal arteries are characterized by the highest sensitivity to ET-1 compared with other organs. Like AT II, ET-1 causes spasm of the glomeruli arterioles, moreover constrict efferent arterioles more pronounced than the degree of narrowing afferent. Together with the ability to modulate the tone of the vascular wall, ET-1 has the properties of a growth factor that promotes proliferation of mesangial cells, smooth muscle cells of vessels, fibroblasts and endothelial cells, and enhances the production of fibronectin and collagen IV by mesangial cells, as well as the synthesis of soluble and insoluble fibrin by smooth vascular cells of the vessels [23].

The obtained data indicate the negative effect of obesity on the morpho-functional structure of the kidneys (**Fig. 3**). Thus, the cross-sectional area of the renal

glomeruli for the HCD group is by 20 % less than for the control group. In general, there is a decrease in the number of renal glomeruli by 36% compared with control values. An explanation for such a decrease in the number of renal glomeruli is that obesity leads to the formation of a relative deficit of nephrons to total body weight, therefore, even with the normal number of nephrons at birth, the condition of comparative oligonephronia [24]. During obesity the total area of the filtration surface in a nephrons with normal number can not withstand against metabolites excessive loading at an adequate level for a long time. The deficiency of nephrons in relation to body weight at the initial stages is offset by hypertrophy of glomeruli and hyperfiltration, which develop under the influence of hormones and growth factors, that are produced by adipose tissue, and leads to an increase in total renal filtration relative to the body surface [25].

Melatonin administration during obesity development has led to an increase the renal glomeruli area and the number of glomeruli – 10 % and 35 % both, respectively in compare with HCD group. Interestingly, the glomeruli number reached control values (no significant difference), and the glomeruli area in the HCD ZT11 group take an intermediate position – that is, they significantly differ from the control by 10 %. This mechanism initially is compensatory, but with prolonged increase in the volume of adipose tissue, a steady violation of hemodynamics in each individual nephron is formed. As a result, intraglomerular hypertension develops, which is considered one of the main factors in the progression of kidney damage [26]. Prolonged action of increased hydrodynamic pressure as a result leads to renal glomeruli fibrosis, reduction of the active nephrons mass, attenuation of functional renal reserve, the development of true oligonephronia [27].

Melatonin administration to rats with standard diet (M ZT11) did not affect the renal glomeruli area and the

number of glomeruli in relation to control group.

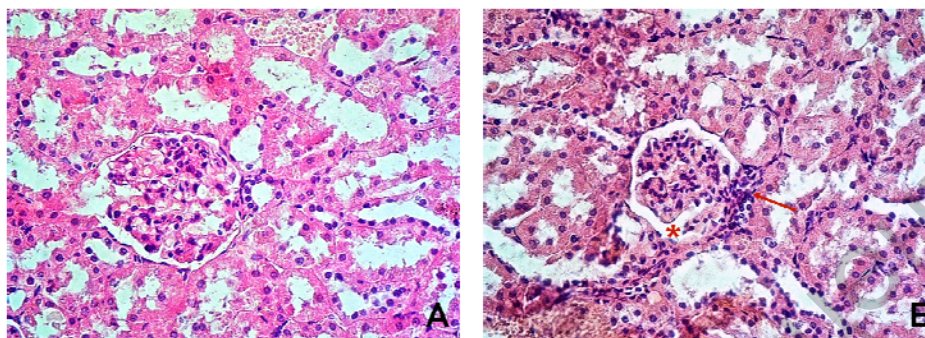


Fig. 2. Microphotographs of rats' kidney sections of the cortical part (tubules):

A – control group, B – HCD group; hematoxylin-eosin staining; oc. x10, ob. x100

Notes: * – expanded space of the capsule, asterisk – enlarged mesangial region from extraglomerular cells

The results of this study about the high-calorie diet-induced obesity effects on the morpho-functional state of rats kidney, in many manifestations, coincide with the studies of other authors. In a significant number of studies catch out intracellular lipid inclusion in renal epithelium

cells [28–30], reduction the total area and number of glomeruli, expansion of the Bowman space, accumulation of fibrin [31–32]. Thus, an increased mesangial region was noted in this work, also was detected in the kidneys of rats with obesity-induced type 2 diabetes [33].

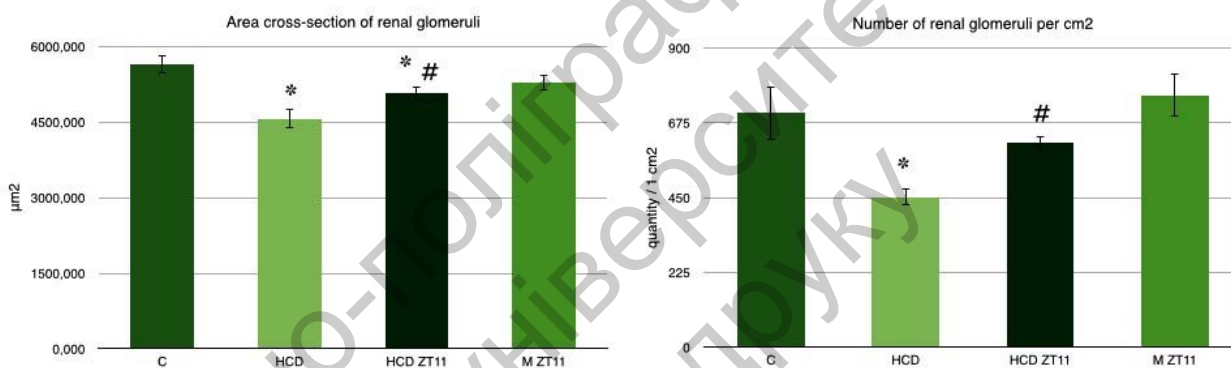


Fig. 3. The morphometric analysis data of the rats' kidney glomeruli area and number (numerical density)

Notes: * – a significant difference between the control and experimental groups, $p \leq 0.05$;

– a significant difference between the HCD and experimental groups, $p \leq 0.05$

Other studies also noted the beneficial effects of melatonin therapy on the kidney morpho-functional state of in animals with obesity and other metabolic diseases. In various animal models associated with experimental pyelonephritis, renal insufficiency, hypertension, diabetes and various variants of nephrotoxicity, melatonin reduces oxidative stress, suppresses chronic inflammation and limit apoptosis [34–36].

Melatonin had also effect on the general body weight. During obesity development relative visceral fat weight is the most sensitive criterion for assessing obesity in animals [37].

Relative visceral fat weight (Fig. 3) in HCD increased by 65 % compare to control. HCD ZT11 did not differ from control, but show significance to HCD: by 38,5 %. Melatonin administration in group M ZT11 did not influence on relative visceral fat weight.

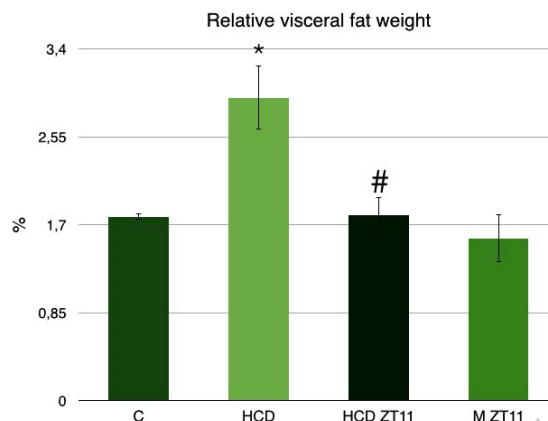


Fig. 4. The morphometric analysis data of the rats' relative visceral fat weight

Notes: * – a significant difference between the control and experimental groups, $p \leq 0.05$;

– a significant difference between the HCD and experimental groups, $p \leq 0.05$

In the same study melatonin also demonstrate attenuation of pathology changes during obesity: in rabbits with HCD induced obesity melatonin administration (subcutaneously in a dose of 1 mg/kg daily 2–3 h before lights-off for 4 weeks) provide disappearance of interstitial foam cells with multiple tiny intracytoplasmic fat droplets that displace in the renal tubules [38]. In alloxan-treated diabetic rats after melatonin (200 μ g/ animal/day by gavage for 8 weeks in the morning between 9 AM and 11 AM) intervention ameliorated degenerative changes in Bowman's capsule with marked expansion in Bowman's space and necrosed tubular wall [39]. Amelioration of streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats by melatonin (dose of 10 mg/kg/day for 30 day by intraperitoneal injection) that manifestation in tubules was markedly reduced of TGF β -1, but also explored mild epithelial desquamation in tubules and hydropic degeneration in some tubular cells [40]. For the choose a uni effective protocol of melatonin administration further study are needed in the chronotherapy key [41].

Conclusions. Thus, it has been established that obesity induced high-calorie diet leads to significant changes in the morphological structure of the kidneys. It has been shown that daily administration of melatonin in a dose of 30 mg/kg for 1 hour before light-off to obese rats leads to improvement of the kidneys morpho-functional state. Namely, the reduction of the pathological changes manifestation in the tubules (the disappearance of intracellular lipid droplets and protein aggregates in the lumen of the tubule) and in the glomeruli (reduction of mesangial site with extraglomerular cells and capsule space) of the kidneys compared with obese animals. In this case, the cross-sectional area of the kidney glomeruli grows, but does not reach the level of control values. While the number of renal glomeruli returns to the level of control groups.

Reference:

1. The official data of the WHO Bulletin published in May 2017. Available from: <http://www.who.int>.
2. Chen H. M. Evaluation of metabolic risk marker in obesity-related glomerulopathy / H. M. Chen, Y. Chen, Y. D. Zhang [et al.] // *Journal of Renal Nutrition*. – 2011. – Vol. 21, № 4. – P. 309–315.
3. Jeffrey L. Obesity-Related Hypertension and Other Renal issues / L. Jeffrey, M. Martin // *J. Lancaster General Hospital*. – 2010. – Vol. 5, № 1. – P. 14–15.
4. Redon J. The kidney in obesity / J. Redon, E. Lurbe // *Current hypertension reports*. – 2015. – Vol. 17, № 6. – P. 43.
5. Garofalo C. A systematic review and meta-analysis suggests obesity predicts onset of chronic kidney disease in the general population / C. Garofalo, S. Borrelli, R. Minutolo [et al.] // *Kidney international*. – 2017. – Vol. 91, № 5. – P. 1224–1235.

6. She M. Melatonin receptors in diabetes: a potential new therapeutical target? / M. She, M. Laudon, W. Yin // *European journal of pharmacology*. – 2014. – Vol. 744. – P. 220–223.

7. Tokonami N. Local renal circadian clocks control fluid–electrolyte homeostasis and BP / N. Tokonami, D. Mordasini, S. Pradervand [et al.] // *Journal of the American Society of Nephrology*. – 2014. – Vol. 25, № 7. – P. 1430–1439.

8. Stacchiotti A. Melatonin drives beneficial Sirtuin 1 expression in leptin-deficient mice liver through MT1 receptor / A. Stacchiotti, L. Nardo, D. Rizzoni [et al.] // *Italian Journal of Anatomy and Embryology*. – 2015. – Vol. 120, № 1. – P. 70.

9. Khoshvakhti H. Effects of melatonin on diclofenac sodium treated rat kidney: a stereological and histopathological study / H. Khoshvakhti, K. K. Yurt, B. Z. Altunkaynak [et al.] // *Renal failure*. – 2015. – Vol. 37, № 8. – P. 1379–1383.

10. Baltatu O. C. Melatonin, mitochondria and hypertension / O. C. Baltatu, F. G. Amaral, L. A. Campos [et al.] // *Cellular and molecular life sciences*. – 2017. – Vol. 74, № 21. – P. 3955–3964.

11. Selfridge J. M. Chronotherapy: intuitive, sound, founded...but not broadly applied / J. M. Selfridge, T. Gotoh, S. Schiffhauer [et al.] // *Drugs*. – 2016. – Vol. 76, № 16. – P. 1507–1521.

12. Münch M., Kramer A. Timing matters: new tools for personalized chronomedicine and circadian health / M. Münch, A. Kramer // *Acta Physiologica*. – 2019. – P. e13300.

13. Sulli G. Training the circadian clock, clocking the drugs, and drugging the clock to prevent, manage, and treat chronic diseases / G. Sulli, E. N. Manoojian, P. R. Taub [et al.] // *Trends in pharmacological sciences*. – 2018. doi.org/10.1016/j.tips.2018.07.003

14. Halenova T. et al. Effect of C60 fullerene nanoparticles on the diet-induced obesity in rats / T. Halenova, N. Raksha, T. Vovk [et al.] // *International journal of obesity (2005)*. – 2018. – Vol. 42, № 12. – P. 1987–1998.

15. Eknayan G. Obesity and chronic kidney disease / G. Eknayan // *Nefrologia (English Edition)*. – 2011. – Vol. 31, № 4. – P. 397–403.

16. Ahn S. Y. Weight loss has an additive effect on the proteinuria reduction of angiotensin II receptor blockers in hypertensive patients with chronic kidney disease / S. Y. Ahn, D. K. Kim, S. S. Han [et al.] // *Kidney research and clinical practice*. – 2018. – Vol. 37, № 1. – P. 49.

17. Khamaisi M. Effect of mild hypoinsulinemia on renal hypertrophy: growth hormone/insulinlike growth factor 1 system in mild streptozotocin diabetes / M. Khamaisi, A. Flyvbjerg, Z. Haramati [et al.] // *Int J Exp Diab Res*. – 2002. – Vol. 3, № 4. – P. 257–264.

18. Sarafidis P. A. Insulin resistance, hyperinsulinemia, and renal injury: mechanisms and implications / P. A. Sarafidis, L. M. Ruilope // *Amer. J. Nephrol*. – 2006. – Vol. 26, № 3. – P. 232–244.

19. Higgins S. P. TGF- β 1/p53 signaling in renal fibrogenesis / S. P. Higgins, Y. Tang, C. E. Higgins [et al.] // *Cellular signalling*. – 2018. – Vol. 43. – P. 1–10.

20. Ma S. Perirenal fat promotes renal arterial endothelial dysfunction in obese swine through tumor necrosis factor- α / S. Ma, X. Y. Zhu, A. Eirin [et al.] // *The Journal of urology*. – 2016. – Vol. 195, № 4. Part 1. – P. 1152–1159.

21. Huang J. Genetic targeting of arginase-II in mouse prevents renal oxidative stress and inflammation in diet-induced obesity / J. Huang, A. Rajapakse, Y. Xiong [et al.] // *Frontiers in physiology*. – 2016. – Vol. 7. – P. 560.

22. Wang C. Thromboxane prostanoid receptors enhance contractions, endothelin-1, and oxidative stress in microvessels from mice with chronic kidney disease / C. Wang, Z. Luo, D. Kohan [et al.] // *Hypertension*. – 2015. – Vol. 65, № 5. – P. 1055–1063.

23. Zanatta C. M. Endothelin-1 gene polymorphisms and diabetic kidney disease in patients with type 2 diabetes mellitus / C. M. Zanatta,

- D. Crispim, D. A. Sortica [et al.] // *Diabetology & metabolic syndrome*. – 2015. – Vol. 7, № 1. – P. 103.
24. Abitbol C. L. Obesity and preterm birth: additive risks in the progression of kidney disease in children / C. L. Abitbol, J. Chandar, M. M. Rodríguez [et al.] // *Pediatric Nephrology*. – 2009. – Vol. 24, № 7. – P. 1363.
25. Briffa J. F. Adipokines as a link between obesity and chronic kidney disease / J. F. Briffa, A. J. McAinch, P. Poronnik [et al.] // *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. – 2013. – Vol. 305, № 12. – P. 1629-1636.
26. Young C. N. The brain subfornical organ mediates leptin-induced increases in renal sympathetic activity but not its metabolic effects / C. N. Young, D. A. Morgan, S. D. Butler [et al.] // *Hypertension*. – 2013. – Vol. 61, № 3. – P. 737-744.
27. Felizardo R. J. F. Obesity in kidney disease: a heavyweight opponent / R. J. F. Felizardo, M. B. da Silva, C. F. Aguiar [et al.] // *World journal of nephrology*. – 2014. – Vol. 3, № 3. – P. 50.
28. Declèves A. E. Regulation of lipid accumulation by AMK-activated kinase in high fat diet-induced kidney injury / A. E. Declèves, Z. Zolkipli, J. Satriano [et al.] // *Kidney international*. – 2014. – Vol. 85, № 3. – P. 611-623.
29. Naumnik B. Renal consequences of obesity / B. Naumnik, M. Mysliwiec // *Medical Science Monitor*. – 2010. – Vol. 16, № 8. – P. 163-170.
30. Nasrallah M. P. Overview of the physiology and pathophysiology of leptin with special emphasis on its role in the kidney / M. P. Nasrallah, F. N. Ziyadeh // *Seminars in nephrology*. – WB Saunders, 2013. – Vol. 33, № 1. – P. 54-65.
31. Yurt K. K. Effects of the melatonin on the kidney of high fat diet fed obese rats: a stereological and histological approach / K. K. Yurt, E. Kayhan, B. Z. Altunkaynak [et al.] // *J Exp Clin Med*. – 2013. – Vol. 30, P. 153-158.
32. Rajan T. Low birth weight and nephron mass and their role in the progression of chronic kidney disease: a case report on identical twins with Alport disease / T. Rajan, S. J. Barbour, C. T. White [et al.] // *Nephrology Dialysis Transplantation*. – 2011. – Vol. 26, № 12. – P. 4136-4139.
33. Winiarska K. Melatonin nephroprotective action in Zucker diabetic fatty rats involves its inhibitory effect on NADPH oxidase / K. Winiarska, J. M. Dzik, M. Labudda [et al.] // *Journal of pineal research*. – 2016. – Vol. 60, № 1. – P. 109-117.
34. Stacchiotti A. Mitochondrial and metabolic dysfunction in renal convoluted tubules of obese mice: protective role of melatonin / A. Stacchiotti, G. Favero, L. Giugno [et al.] // *PLoS one*. – 2014. – Vol. 9, № 10. – P. e111141.
35. Aperis G. The role of melatonin in patients with chronic kidney disease undergoing haemodialysis / G. Aperis, P. Prakash, C. Paliouras [et al.] // *Journal of renal care*. – 2012. – Vol. 38, № 2. – P. 86-92.
36. Russcher M. The role of melatonin treatment in chronic kidney disease / M. Russcher, B. Koch, E. Nagtegaal [et al.] // *Front Biosci (Landmark Ed)*. – 2012. – Vol. 17. – P. 2644-56.
37. Hariri N. High-fat diet-induced obesity in animal models / N. Hariri, L. Thibault // *Nutrition research reviews*. – 2010. – Vol. 23, № 2. – P. 270-299.
38. Hussein M. R. Intake of melatonin is associated with amelioration of physiological changes, both metabolic and morphological pathologies associated with obesity: an animal model / M. R. Hussein, O. G. Ahmed, A. F. Hassan [et al.] // *International journal of experimental pathology*. – 2007. – Vol. 88, № 1. – P. 19-29.
39. Doddigarla Z. Effect of Chromium Picolinate and Melatonin either in Single or in a Combination in Alloxan Induced Male Wistar Rats / Z. Doddigarla, I. Parwez, S. Abidi [et al.] // *Journal of Biomedical Sciences*. – 2016. – Vol. 6. – P. 1-7.
40. Elbe H. Amelioration of streptozotocin-induced diabetic nephropathy by melatonin, quercetin, and resveratrol in rats / H. Elbe, N. Vardi, M. Esrefoglu [et al.] // *Human & experimental toxicology*. – 2015. – Vol. 34, № 1. – P. 100-113.
41. Kaur G. Chronotherapy in practice: the perspective of the community pharmacist / G. Kaur, Y. L. Gan, C. L. Phillips [et al.] // *International journal of clinical pharmacy*. – 2016. – Vol. 38, № 1. – P. 171-182.
- Reference(Scopus):**
- The official data of the WHO Bulletin published in May 2017. Available from: <http://www.who.int>
 - Chen H. M., Chen Y., Zhang Y. D., Zhang P. P., Chen H. P., Wang Q. W., et al. Evaluation of metabolic risk marker in obesity-related glomerulopathy. *Journal of Renal Nutrition*. 2011; 21(4): 309-315.
 - Jeffrey L., Martin M. Obesity-Related Hypertension and Other Renal issues. *J. Lancaster General Hospital*. 2010; 5(1): 14-15.
 - Redon J., Lurbe E. The kidney in obesity. *Current hypertension reports*. 2015; 17(6): 43.
 - Garofalo C., Borrelli S., Minutolo R., Chiodini P., De Nicola L., Conte G. A systematic review and meta-analysis suggests obesity predicts onset of chronic kidney disease in the general population. *Kidney international*. 2017; 91(5): 1224-1235.
 - She M., Laudon M., Yin W. Melatonin receptors in diabetes: a potential new therapeutic target?. *European journal of pharmacology*. 2014; 744: 220-223.
 - Tokonami N., Mordasini D., Pradervand S., Centeno G., Jouffe C., Maillard M., et al. Local renal circadian clocks control fluid-electrolyte homeostasis and BP. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2014; 25(7): 1430-1439.
 - Stacchiotti A., Nardo L., Rizzoni D., Rezzani R., Reiter R. J. Melatonin drives beneficial Sirtuin 1 expression in leptin-deficient mice liver through MT1 receptor. *Italian Journal of Anatomy and Embryology*. 2015; 120(1): 70.
 - Khoshvakhthi H., Yurt K. K., Altunkaynak B. Z., Türkmen A. P., Ellbol E., Aydin I., et al. Effects of melatonin on diclofenac sodium treated rat kidney: a stereological and histopathological study. *Renal failure*. 2015; 37(8): 1379-1383.
 - Baltatu O. C., Amaral F. G., Campos L. A., Cipolla-Neto J. Melatonin, mitochondria and hypertension. *Cellular and molecular life sciences*. 2017; 74(21): 3955-3964.
 - Selfridge J. M., Gotoh T., Schiffhauer S., Liu J., Stauffer P. E., Li A., et al. Chronotherapy: intuitive, sound, founded...but not broadly applied. *Drugs*. 2016; 76(16): 1507-1521.
 - Münch M., Kramer A. Timing matters: new tools for personalized chronomedicine and circadian health. *Acta Physiologica*. 2019; e13300.
 - Sulli G., Manoogian E. N., Taub P. R., Panda S. Training the circadian clock, clocking the drugs, and drugging the clock to prevent, manage, and treat chronic diseases. *Trends in pharmacological sciences*. 2018. doi.org/10.1016/j.tips.2018.07.003.
 - Halenova T., Raksha N., Vovk T., Savchuk O., Ostapchenko L., Prylutskyy Y., et al. Effect of C60 fullerene nanoparticles on the diet-induced obesity in rats. *International journal of obesity (2005)*. 2018; 42(12): 1987-1998.
 - Eknoyan G. Obesity and chronic kidney disease. *Nefrologia (English Edition)*. 2011; 31(4): 397-403.
 - Ahn S. Y., Kim D. K., Han S. S., Park J. H., Shin S. J., Lee S. H., et al. Weight loss has an additive effect on the proteinuria reduction of angiotensin II receptor blockers in hypertensive patients with chronic kidney disease. *Kidney research and clinical practice*. 2018; 37(1): 49.
 - Khamaisi M., Flyvbjerg A., Haramati Z., Raz G., Wexler I. D., Raz I. Effect of mild hypoinsulinemia on renal hypertrophy: growth hormone/insulin-like growth factor I system in mild streptozotocin diabetes. *Journal of Diabetes Research*. 2002; 3(4): 257-264.
 - Sarafidis P. A., Ruilope L. M. Insulin resistance, hyperinsulinemia, and renal injury: mechanisms and implications. *American journal of nephrology*. 2006; 26(3): 232-244.
 - Higgins S. P., Tang Y., Higgins C. E., Mian B., Zhang W., Czekay R. P., et al. TGF-β1/p53 signaling in renal fibrogenesis. *Cellular signalling*. 2018; 43: 1-10.
 - Ma S., Zhu X. Y., Eirin A., Woollard J. R., Jordan K. L., Tang H., et al. Perirenal fat promotes renal arterial endothelial dysfunction in obese swine through tumor necrosis factor-α. *The Journal of urology*. 2016; 195(4 Part 1): 1152-1159.
 - Huang J., Rajapakse A., Xiong Y., Montani J. P., Verrey F., Ming X. F., et al. Genetic targeting of arginase-ii in mouse prevents renal oxidative stress and inflammation in diet-induced obesity. *Frontiers in physiology*. 2016; 7: 560.
 - Wang C., Luo Z., Kohan D., Wellstein A., Jose P. A., Welch W. J., et al. Thromboxane prostanoid receptors enhance contractions, endothelin-1, and oxidative stress in microvessels from mice with chronic kidney disease. *Hypertension*. 2015; 65(5): 1055-1063.
 - Zanatta C. M., Crispim D., Sortica D. A., Klassmann L. P., Gross J. L., Gerchman F., et al. Endothelin-1 gene polymorphisms and diabetic kidney disease in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetology & metabolic syndrome*. 2015; 7(1): 103.
 - Abitbol C. L., Chandar J., Rodríguez M. M., Berho M., Seeherunvong W., Freundlich M., et al. Obesity and preterm birth: additive risks in the progression of kidney disease in children. *Pediatric Nephrology*. 2009; 24(7): 1363.
 - Briffa J. F., McAinch A. J., Poronnik P., Hryciw D. H. Adipokines as a link between obesity and chronic kidney disease. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2013; 305(12): F1629-F1636.
 - Young C. N., Morgan D. A., Butler S. D., Mark A. L., Davissou R. L. The brain subfornical organ mediates leptin-induced increases in renal sympathetic activity but not its metabolic effects. *Hypertension*. 2013; 61(3): 737-744.
 - Felizardo R. J. F., da Silva M. B., Aguiar C. F., Câmara N. O. S. Obesity in kidney disease: a heavyweight opponent. *World journal of nephrology*. 2014; 3(3): 50.
 - Declèves A. E., Zolkipli Z., Satriano J., Wang L., Nakayama T., Rogac M., et al. Regulation of lipid accumulation by AMK-activated kinase in high fat diet-induced kidney injury. *Kidney international*. 2014; 85(3): 611-623.
 - Naumnik B., Mysliwiec M. Renal consequences of obesity. *Medical Science Monitor*. 2010; 16(8): 163-170.
 - Nasrallah M. P., Ziyadeh F. N. Overview of the physiology and pathophysiology of leptin with special emphasis on its role in the kidney. In *Seminars in nephrology*. 2013; 33(1): 54-65.
 - Yurt K. K., Kayhan E., Altunkaynak B. Z., Tümentemur G., Kaplan S. Effects of the melatonin on the kidney of high fat diet fed obese rats: a stereological and histological approach. *J Exp Clin Med*. 2013; 30: 153-158.
 - Rajan T., Barbour S. J., White C. T., Levin A. Low birth weight and nephron mass and their role in the progression of chronic kidney disease: a

case report on identical twins with Alport disease. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2011; 26(12): 4136-4139.

33. Winiarska K., Dzik J. M., Labudda M., Focht D., Sierakowski B., Owczarek A., et al. Melatonin nephroprotective action in Zucker diabetic fatty rats involves its inhibitory effect on NADPH oxidase. *Journal of pineal research*. 2016; 60(1): 109-117.

34. Stacchiotti A., Favero G., Giugno L., Lavazza A., Reiter R. J., Rodella L. F., et al. Mitochondrial and metabolic dysfunction in renal convoluted tubules of obese mice: protective role of melatonin. *PLoS one*. 2014; 9(10): e111141.

35. Aperis G., Prakash P., Paliouras C., Papakonstantinou N., Alivannis P. The role of melatonin in patients with chronic kidney disease undergoing haemodialysis. *Journal of renal care*. 2012; 38(2): 86-92.

36. Russcher M., Koch B., Nagtegaal E., van der Putten K., ter Wee P., Gaillard C. The role of melatonin treatment in chronic kidney disease. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2012; 17: 2644-56.

37. Hariri N., Thibault L. High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nutrition research reviews*. 2010; 23(2): 270-299.

38. Hussein M. R., Ahmed O. G., Hassan A. F., Ahmed M. A. Intake of melatonin is associated with amelioration of physiological changes, both

metabolic and morphological pathologies associated with obesity: an animal model. *International journal of experimental pathology*. 2007; 88(1): 19-29.

39. Doddigarla Z., Parwez I., Abidi S., Ahmad J. (). Effect of Chromium Picolinate and Melatonin either in Single or in a Combination in Alloxan Induced Male Wistar Rats. *Journal of Biomedical Sciences*. 2016; 6: 1-7.

40. Elbe H., Vardi N., Esrefoglu M., Ates B., Yologlu S., Taskapan C. Amelioration of streptozotocin-induced diabetic nephropathy by melatonin, quercetin, and resveratrol in rats. *Human & experimental toxicology*. 2015; 34(1): 100-113.

41. Kaur G., Gan Y. L., Phillips C. L., Wong K., Saini B. Chronotherapy in practice: the perspective of the community pharmacist. *International journal of clinical pharmacy*. 2016; 38(1): 171-182.

Надійшла до редколегії 06.03.2019

Отримано виправлений варіант 08.04.2019

Підписано до друку 08.04.2019

Received in the editorial 06.03.2019

Received a revised version on 08.04.2019

Signed in the press on 08.04.2019

О. Калмыкова, асп., Т. Кушмирук, студ., М. Держинський, д-р біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

ВПЛИВ УВЕДЕННЯ МЕЛАТОНІНУ В ПЕВНИЙ ЧАС ДОБИ НА НИРКИ ЩУРІВ ІЗ ОЖИРІННЯМ, ІНДУКОВАНИМ ВИСОКОКАЛОРИЙНОЮ ДІЄТОЮ

Нирки, як і серцево-судинна система, є одним із основних органів-мішеней, уразливих до ожиріння, тому що першими беруть на себе функцію компенсації метаболізму при надлишку жирової тканини в організмі. Ураження нирок при ожирінні є багатofакторним процесом, що викликано рядом подій, включаючи запалення, оксидативний стрес, порушення ліпідного обміну, активацію системи ренин-ангіотензин-альдостерон, інсулінорезистентність тощо. Оптимальним кандидатом для зняття шкідливого впливу ожиріння на нирки має бути сполука, яка одночасно виявляє протизапальні та антиоксидантні властивості, контролює циркадний ритм, а також впливає на секрецію адипокінів. Молекула, що відповідає цим умовам, – це мелатонін. Метою нашого дослідження було дослідити морфофункціональний стан (морфологічну характеристику клубочків та канальців нирок, оцінити морфометричні параметри: площу та кількість клубочків) нирок у щурів із ожирінням, індукованим висококалорійною дієтою (ВКД), при введенні мелатоніну в певний час доби. Мелатонін уводили щоденно перорально за допомогою зонда протягом семи тижнів у дозі 30 мг/кг за 1 год до вимикання світла (ZT11). Щури із ВКД мали значні зміни в морфології нирок, що виявлялися у наявності численних мезангіальних клітин позаклубочками і ліпідних крапель в епітеліальних клітинах канальців; окрім цього, площа і кількість клубочків на см² зменшувалися. Нирки з вищезазначеними характеристиками у щурів із ВКД утрачають здатність до виконання своїх функцій у повному обсязі. При введенні мелатоніну щурам із ВКД виникає нівелювання патологічних змін, які пов'язані з розвитком ожиріння. А саме: у щурів на фоні розвитку ожиріння введення мелатоніну призводило до збільшення площі й кількості клубочків порівняно із групою ВКД, причому кількість клубочків досягала контрольних значень. Це говорить про те, що мелатонін чинить захисний ефект проти гломерулярної дегенерації. Отже, мелатонін впливає на морфофункціональний стан нирок у щурів при розвитку ожиріння і зменшує патологічні його зміни, причому вечірнє введення може застосовуватися для терапії ожиріння шляхом його дії на збереження морфології клубочків.

Ключові слова: мелатонін, ожиріння, хронотерапія, нирки, висококалорійна дієта, ниркові клубочки.

О. Калмыкова, асп., Т. Кушмирук, студ., Н. Держинский, д-р биол. наук
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

ВЛИЯНИЕ ВВЕДЕНИЯ МЕЛАТОНИНА В ОПРЕДЕЛЕННОЕ ВРЕМЯ СУТОК НА ПОЧКИ КРЫС С ОЖИРЕНИЕМ, ИНДУЦИРОВАННЫМ ВИСОКОКАЛОРИЙНОЙ ДИЕТОЙ

Почки, как и сердечно-сосудистая система, являются одним из основных органов-мишеней, уязвимых при развитии ожирения, так как первыми принимают на себя функцию компенсации метаболизма при избытке жировой ткани в организме. Поражение почек при ожирении является многофакторным процессом, что вызвано рядом событий, включая воспаление, оксидативный стресс, нарушения липидного обмена, активация ренин-ангиотензин-альдостерон, инсулинорезистентность также. Оптимальным кандидатом для снижения вредного влияния ожирения на почки должно быть соединение, которое одновременно проявляет противовоспалительные и антиоксидантные свойства, контролирует циркадный ритм, а также влияет на секрецию адипокинов. Молекула, которая отвечает этим условиям, – это мелатонин. Целью нашего исследования было изучить морфофункциональное состояние (морфологическую характеристику клубочков и канальцев почек, оценить морфометрические параметры: площадь и количество клубочков) почек у крыс с ожирением, индуцированной высококалорийной диетой (ВКД), при введении мелатонина в определенное время суток. Мелатонин вводили ежедневно перорально с помощью зонда в течении семи недель в дозе 30 мг/кг за 1 ч до выключения света (ZT11). Крысы с ВКД имели значительные изменения в морфологии почек, проявившиеся в присутствии многочисленных мезангиальных клеток вне клубочка и липидных капель в эпителиальных клетках канальцев; кроме этого, площадь и количество клубочков на см² уменьшались. Почки с вышеупомянутыми характеристиками у крыс с ВКД теряют способность к выполнению своих функций в полном объеме. При введении мелатонина крысам с ВКД возникает нивелирование патологических изменений, связанных с развитием ожирения. В частности, у крыс на фоне развития ожирения введение мелатонина приводит к увеличению площади и количества клубочков по сравнению с группой ВКД, при чем количество клубочков достигала контрольных значений. Это говорит о том, что мелатонин оказывает защитный эффект против клубочковой дегенерации. Итак, мелатонин влияет на морфофункциональное состояние почек у крыс при развитии ожирения и уменьшает патологические его изменения, причем вечернее введение может применяться для терапии ожирения путем его действия на сохранение морфологии клубочков.

Ключевые слова: мелатонин, ожирение, хронотерапия, почки, высококалорийная диета, почечные клубочки.

УДК 582.28

Т. Кондратюк, канд. біол. наук,
Т. Берегова, д-р біол. наук, Т. Акуленко, інж.,
Є. Торгалюк, канд. біол. наук, В. Верещака д-р мед. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

СИНТЕЗ МЕЛАНОНУ ЧОРНИМИ ДРІЖДЖАМИ *PSEDONADSONIELLA BRUNNEA*: ЗАЛЕЖНІСТЬ ВІД КІЛЬКОСТІ L-ТИРОЗИНУ В КУЛЬТУРАЛЬНОМУ СЕРЕДОВИЩІ

Метою роботи було визначення оптимальних умов синтезу меланіну чорними дріжджоподібними грибами *Pseudonadsoniella brunnea* (Basidiomycota, Agaricomycotina, Agaricomycetes, Polyporales, Meripilaceae) залежно від кількості L-тирозину в культуральному середовищі. У дослідженнях використовували стандартні рідкі живильні середовища Malt extract broth (MEB). L-Тирозин додавали у культуральні середовища кількістю 0,01, 0,025 та 0,05 %. Для отримання меланіну культивування *Pseudonadsoniella brunnea* здійснювали за рН 1-1,5, температури $+21 \pm 1^\circ \text{C}$ упродовж семи діб. Статистичну обробку результатів проводили за загальноприйнятими методами варіаційної статистики. Установлено, що рівень синтезу меланіну чорними дріжджоподібними грибами *Pseudonadsoniella brunnea* залежить від кількості внесеного в культуральне середовище L-тирозину. Аналіз результатів проведених досліджень свідчить, що живильне середовище MEB із вмістом 0,0 % L-тирозину в даній серії експериментів є найкращою композицією для отримання меланіну штамом-продуцентом *Pseudonadsoniella brunnea*. Порівняно з контролем (MEB без унесення

L-тирозину) кількість синтезованого *Pseudonadsoniella brunnea* меланіну за зазначених умов збільшувалось у 2,5 рази. Проведення подальших досліджень стосовно з'ясування оптимальних умов культивування чорних дріжджоподібних грибів *Pseudonadsoniella brunnea* з метою отримання меланіну є актуальним та перспективним.

Ключові слова: чорні дріжджоподібні гриби, продуцент меланіну, L-тирозин.

Вступ. Екстремальні умови існування мікроорганізмів різної таксономічної належності обумовлюють їх культурально-морфологічні, фізіолого-біохімічні та молекулярно-генетичні особливості. Дослідження щодо стійкості мікроорганізмів до найрізноманітніших несприятливих умов довкілля (високі або низькі показники температури, рН середовища, ультрафіолетового випромінювання, вологості, вмісту солей, металів тощо) показують, що за умов дії різноманітних чинників спостерігаються різні вияви адаптації мікроорганізмів до стресових факторів. Виявом активної стратегії адаптації мікроорганізмів, яка дозволяє їм не тільки зберігати життєздатність, а також розмножуватися й розвиватися в умовах під впливом агресивних факторів довкілля є, зокрема, їхня здатність використовувати власний потужний потенціал – продукувати важливі біологічні активні сполуки (БАС). З'ясування біологічних характеристик мікроорганізмів екстремальних місцевостей, пошук серед них продуцентів БАС ведеться в багатьох країнах світу [1-8]. Заначені мікроорганізми здатні до синтезу та накопичення БАС із широким спектром протимікробної, антифунгальної, протипухлинної дії та інших властивостей, які широко застосовуються фармацевтичною індустрією, у медицині, біотехнології тощо [9–10]. За умов дії екстремальних факторів довкілля мікроорганізми здатні до синтезу різноманітних пігментів, зокрема меланіну. Відомо, що меланінам притаманний широкий спектр біологічної дії: вони виявляють антиоксидантну, цито-, фото- і радіопротекторну активність, антимікробну, противірусну, протизапальну, імуномодельючу дію тощо. Із екстремальних місцевостей сьогодні ізольовано та описано значну кількість різноманітних мікроскопічних темнопігментованих грибів, серед яких особливе місце посідають чорні дріжджоподібні гриби (ЧДГ). З урахуванням багатофункціональності меланінів екстремофільні гриби та їх метаболіти визнані перспективними щодо використання в медицині та інших галузях [11–14], зокрема для створення нового класу біологічно активних високотехнологічних матеріалів, протигрибкових препаратів тощо [14–21]. Еумеланіни (чорні або коричневі) утворюються у процесі окислення тирозину (та/або фенілаланіну) до **o**-дигідроксіфенілаланіну (ДОФА) та допахіланону, який далі піддається циклізації до 5,6-дигідроксиіндолу (DHI) або 5,6-дигідроксиіндол-2-карбонової кислоти (DHICA) [13, 22].

Виробництво пігментів мікроорганізмів є однією із нових галузей досліджень у зв'язку зі збільшенням інтересу промисловості до більш безпечних, екологічно чистих продуктів. Мікроорганізми, зокрема мікроскопічні гриби як цінне джерело пігментів, мають також ряд переваг над рослинами та тваринами (із яких отримують пігменти), оскільки вони не мають сезонних обмежень, не конкурують за місцезростання з іншими організмами й можуть активно розвиватися в дешевому культуральному середовищі та паралельно синтезувати пігменти у

необхідній (високій) кількості, що робить такий біопроект економічно вигідним у промисловому масштабі [23–29]. Меланін діє як "грибна броня" завдяки своїй здатності захищати грибку клітину від несприятливих умов. Зазвичай цей пігмент міститься у зовнішньому шарі клітинної стінки, зв'язаному з хітином (та має назву "меланін, пов'язаний із клітинною стінкою"), але в деяких грибах меланін може бути виявлений поза грибною клітиною, зазвичай у формі гранул у культуральному середовищі [30]. Дослідження показали, що склад середовища та умови культивування впливають на синтез пігменту грибами, а маніпулювання цими параметрами може призвести до збільшення виходу пігменту з його подальшим великомасштабним виробництвом для застосування в різних біотехнологічних галузях, біомедицині, дермокосметології, матеріалознавстві, нанотехнологіях [31].

Мікроскопічні ЧДГ *Pseudonadsoniella brunnea* (Basidiomycota, Agaricomycotina, Agaricomycetes, Polyporales, Meripilaceae) синтезують і екскретують у культуральне середовище меланін та є об'єктом наших багатопланових і багаторічних досліджень. Зокрема показано, що меланін, який продукують указані ЧДГ, виявляє антиоксидантну, антифітопатогенну, дерматотропну, ранозагоювальну дію тощо [32–33]. Накопичення меланіну виключно у клітинах мікроорганізмів ускладнює процес його подальшого отримання, оскільки виділення меланіну, що накопичується в клітині, супроводжується впливом на його структуру і, відповідно, властивості [34–35]. Принципова відмінність *Ps. brunnea* – екскреція пігменту в культуральне середовище, що полегшує процес його виділення. ЧДГ *Ps. brunnea* використовуються як продуцент для отримання меланіну у вигляді субстанції для ветеринарного препарату "Мелавіт", який має Реєстраційне посвідчення № ВВ-00545-02-13 від 11.04.2013 р. Штам *Ps. brunnea* зареєстрований у Депозитарії Державного науково-контрольного Інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів під № 607 (Свідоцтво про депонування штаму-продуценту № 607 від 04.07.2014 р.). В Україні аналогічних розробок немає. "Мелавіт" використовується як профілактичний, імуномодулюючий, лікувальний засіб. Застосовується для зняття стресу при вакцинації; зменшення падежу при відлученні молодих тварин при годуванні (свині); профілактики ентеритів у телят; стимуляції моторики кишечника у собак; покращення імунного статусу тварин у несприятливих епізоотичних умовах; для лікування тварин при виразковій хворобі шлунку та дванадцятипалої кишки; при неспецифічному ентериті, ентероколіті, коліті, панкреатиті, онкологічних захворюваннях тощо. Запровадження лікарських і ветеринарних препаратів (профілактичного, імуномодулюючого, лікувального спрямування) на основі меланіну – це створення умов для забезпечення здоров'я людей та тварин.

Отже, проведення лабораторних досліджень із визначення оптимальних умов продукування меланіну чорними дріжджоподібними грибами *Pseudonadsoniella brunnea*, інтенсифікації процесу отримання меланіну як субстанції для різних препаратів є актуальними питаннями.

Метою даної роботи було визначення оптимальних умов синтезу меланіну продуцентом *Pseudonadsoniella brunnea* залежно від кількості L-тирозину в культуральному середовищі.

Методи та матеріали. Матеріалом для досліджень була чиста культура антарктичних ЧДГ *Pseudonadsoniella brunnea* 470 FCKU, що зберігається в Колекції мікроскопічних грибів ННЦ "Інститут біології та медицини" Київського національного університету імені Тараса Шевченка (міжнародний акронім колекції FCKU) [36].

У роботі використовували стандартне рідке живильне середовище Malt extract broth (MEB, виробництва HiMedia Laboratories, Індія та Conda, Іспанія), яке готували як за прописами виробників. Із урахуванням даних щодо слабкої розчинності L-тирозину (0,05г тирозину/100 г розчину за температури +25° С) у культуральні середовища L-Тирозин додавали в кількості 0,01, 0,025 та 0,05 %. Контролем уважали середовище MEB без

додаткового внесення L-тирозину. Для отримання меланіну культивування *Ps. brunnea* здійснювали за кислотності живильного середовища (pH) 1-1,5, температури + 21 ± 1° С упродовж семи діб.

Враховуючи здатність *Pseudonadsoniella brunnea* продукувати меланін за низьких значень кислотності, регулювання pH культуральних середовищ проводили із додаванням 1 М соляної кислоти.

Виділення меланіну із культурального середовища *Ps. Brunnea* здійснювали відповідно до Регламенту "Отримання поліфенолкарбонового комплексу з антарктичних чорних дріжджоподібних грибів *Pseudonadsoniella brunnea* "Меланін" на основі ТУ У 15.9-30034243-004:2005 зі змінами назви штаму, доповненнями та змінами в пп. 2.2.1, 2.2.3, 5.9.3". Основні етапи роботи з отримання меланіну, який продукує *Ps. brunnea*, підпорядковуються обов'язковій кількарзовій зміні pH культурального середовища (після здійснення процесу культивування упродовж семи діб). Метою підвищення pH до 10-11 із використанням гідроксиду натрію є лужний гідроліз біомаси. Подальше зниження pH до низьких значень (1-2) за допомогою соляної кислоти призводить до формування та ущільнення осаду з потрібного кінцевого продукту (меланіну) (рис. 1).

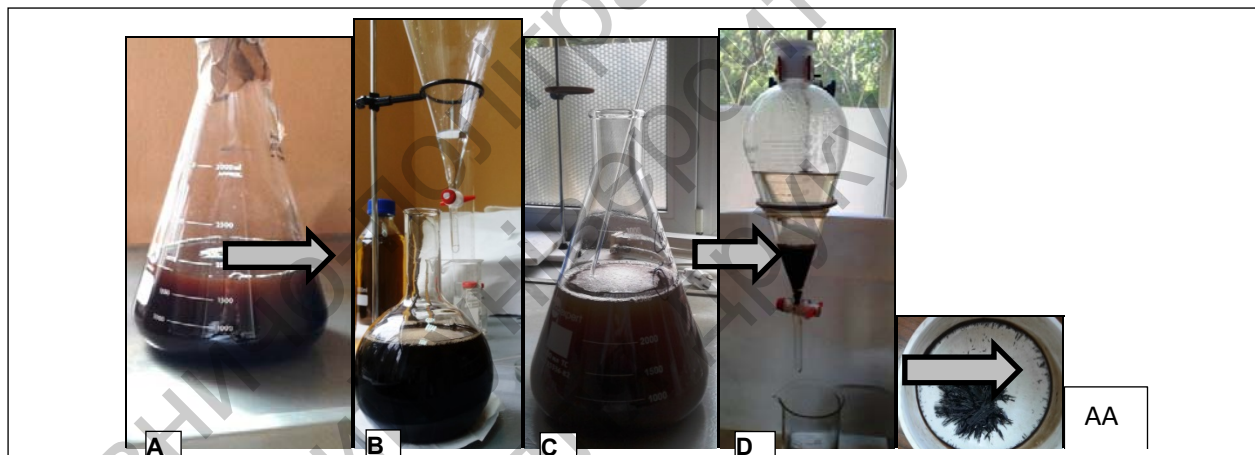


Рис. 1. Основні етапи отримання меланіну:

A – культуральне середовище *Pseudonadsoniella brunnea* після семи діб культивування; B – лужний гідроліз біомаси; C – осад із потрібного кінцевого продукту (меланіну); D – меланін після висушування

Залежно від мети проміжного процесу отримання меланіну "відкидали" або надосадову рідину, або осад. Висушування осаду (кінцевого продукту – меланіну) здійснювали у фарфорових чашках за температури +30° С у термошафі Venticell 55. Після висушування меланін зважували.

Статистичну обробку результатів проводили за загальноприйнятими методами варіаційної статистики. Отримані результати перевіряли на нормальність за допомогою W тесту Шапіро-Уїлка. Оскільки одержані результати виявились нормально розподіленими, порівняння різниці між контрольними та дослідними варіантами проводили за допомогою Anova-аналізу для неза-

лежних вибірок, рівень значущості $p < 0,05$. Отримані дані представлені у вигляді середнього значення (M) і стандартного відхилення (SD).

Результати та їх обговорення. У результаті проведених досліджень нами встановлено, що після семи діб культивування *Pseudonadsoniella brunnea* живильні середовища в різних варіантах експерименту мають різне забарвлення. За умов додавання в культуральне середовище 0,05 % L-тирозину наприкінці терміну експерименту колір середовища змінюється зі світло-коричневого на інтенсивний темно-коричневий (рис. 2).

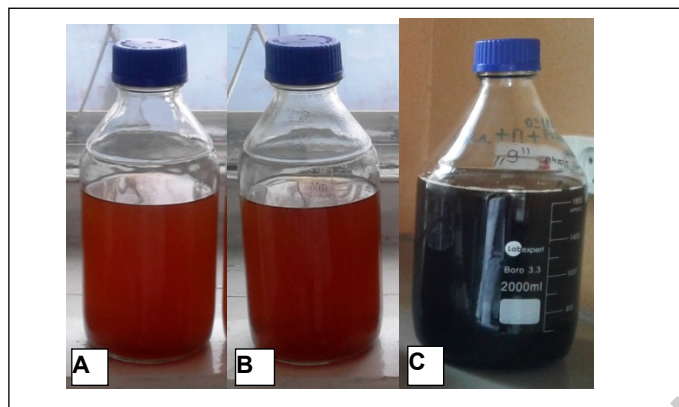


Рис. 2. Зміна кольору культурального середовища *Pseudonadsoniella brunnea* в умовах експерименту

А – культуральне середовище МЕБ без додавання L-тирозини;

В – культуральне середовище МЕБ із 0,01% L-тирозини;

С – культуральне середовище МЕБ із 0,05% L-тирозини.

Термін культивування 7 діб

В усіх варіантах проведеного дослідження додавання до культурального середовища *Pseudonadsoniella brunnea* L-тирозини призводить до збільшення кількості меланіну, який продукують ці чорні дріжджоподібні гриби (рис. 3).

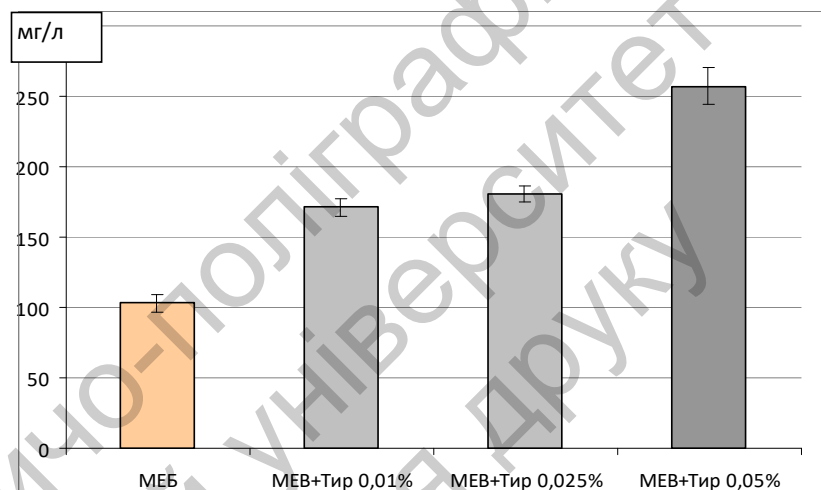


Рис. 3. Кількість (мг/л) синтезованого меланіну культурой ЧДГ *Pseudonadsoniella brunnea* залежно від відсоткового вмісту L-тирозини (Тир) у культуральному середовищі після семи діб культивування

Порівняно з контролем (МЕБ без внесення L-тирозини) кількість синтезованого *Ps. brunnea* меланіну за умов внесення в культуральне середовище 0,05 % L-тирозини збільшувалось у 2,5 рази. У той же час додавання 0,01 та 0,025 % L-тирозини призводило до збільшення кількості отриманого кінцевого продукту (меланіну) порівняно з контролем в 1,7 та 1,76 рази відповідно. Отримана нами інформація підтверджує дані інших авторів щодо збільшення синтезу меланіну іншими темнопігментованими грибами за умов внесення в культуральне середовище L-тирозини [31]. Живильне середовище (МЕБ) із вмістом 0,05 % L-тирозини в цій серії експериментів визнано нами найкращою композицією для отримання меланіну штамом-продуцентом *Ps. brunnea*.

Висновки. Рівень синтезу меланіну чорними дріжджоподібними грибами *Pseudonadsoniella brunnea* залежить від кількості внесеного в культуральне середовище L-тирозини.

Оптимальними умовами синтезу меланіну продуцентом *Pseudonadsoniella brunnea* в даних варіантах

досліджень визнано культуральне середовище МЕБ із вмістом 0,05 % L-тирозини.

Із урахуванням властивостей меланіну, що дозволяє використовувати його в різних галузях медицини, біотехнології тощо, проведення подальших досліджень у напрямі з'ясування оптимальних умов культивування чорних дріжджоподібних грибів *Pseudonadsoniella brunnea* з метою отримання меланіну є актуальним та перспективним.

Список використаних джерел:

1. BanatIbrahim M. Microbial biosurfactants production, applications and future potential / Ibrahim M. Banat, Andrea Franzetti, Isabella Gandolfi et al. // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2010. – Vol. 87, Is. 2. – P. 427–444.
2. Buzzini P. Cold-Adapted Yeasts: A Lesson from the Cold and a Challenge for the XXI Century / In: Buzzini P., Margesin R. (eds.), Cold-Adapted Yeasts // Biodiversity, Adaptation Strategies and Biotechnological Significance. – 2014. – P. 3-22.
3. Dimitrova S. Production of Metabolites with Antioxidant and Emulsifying Properties by Antarctic Strain *Sporobolomyces salmonicolor* AL₁ / S. Dimitrova, K. Pavlova, L. I. Lukanov et al. // Applied Biochemistry and Biotechnology. – 2013. – Vol. 169, Is. 1. – P. 301–311.
4. Margesin R. Characterization of cold-active pectatylases from psychrophilic *Mrakiafrigida* / R. Margesin, V. Fauster, P. A. Fonteyne // Lett. Appl. Microbiol. – 2005. – Vol. 40 (6). – P. 453–459.

5. Nai C. Nutritional physiology of a rock-inhabiting, model microcolonial fungus from an an asexual line age of the Chaetothyriales (Ascomycetes) / C. Nai, H. Wong, A. Pannenbecker and others // *Fungal Genet. Biol.* – 2013. – Vol. 56. – P. 54–66.
6. Poli A. Production and chemical characterization of exopolysaccharide synthesized by psychrophilic yeaststra in *Sporobolomyces salmonicolor* AL₁, isolated from Livingston Island, Antarctica / A. Poli, G. Anzelmo, G. Tommonaro and others // *Folia Microbiologica.* – 2010. – 55. – P. 576–581.
7. Nicolaus B. Exopolysaccharides from extremophiles: from fundamental stobiotechnology / B. Nicolaus, M. Kambourova., E. Toksoy Oner // *Environmental Technology.* – 2010. – Vol. 31, Is. 10. – P. 1145–1158.
8. Singh O., Gabani P. Extremophiles: radiation resistance microbial reserves and therapeutic implications *Journal of Applied Microbiology* 2011. – 110 – 851–861. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.04971.x>
9. Anitori R. Extremophiles: Microbiology and Biotechnology / R. Anitori. – 2012. – 300 p.
10. Svahn S. *Penicillium nalgiovense* Laxaisolated from Antarctica is a new source of the antifungal metabolite amphotericin B / S. Svahn., B. Olsen., L. Bohlin // *Fungal Biology and Biotechnology.* – 2015. – 1. – P. 2–11.
11. Eisenman H. Synthesis and assembly of fungal melanin / H. C. Eisenman, A. Casadevall // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2012. – 93(3). – P. 931–940.
12. Falalyeyeva T. M. The influence of melanin is olated from Antarctic yeasts on cortisol blood level of rats in conditions of stress action / T. Falalyeyeva, O. Tsyryuk, N. Chyzhanska and others // *Ukr. Antarctic J.* – 2009. – 8. – P. 391–394.
13. Plonka P. Melanin synthesis in microorganisms – Biotechnological and medical aspects / P. Plonka M. Grabacka // *Acta biochimica Polonica.* – 2006. – 53(3). – P. 429–443.
14. Belozerskaya T. Melanin Pigments of Fungi / T. Belozerskaya, N. Gessler, A. Aver'yanov // In book: *Fungal Metabolites.* – 2018. – P. 263–291. DOI: 10.1007/978-3-319-19456-1_29-1.
15. Chyzhanska N. Effect of melanin isolated from Antarctic yeasts on preservation of pig livestock after ablatation / N. Chyzhanska, T. Beregova Effect // *Ukr. Antarctic J.* – 2009. – 8. – P. 382–385.
16. Boo S. Thermal stress responses in Antarctic yeast, *Glaciozyma Antarctica* PI12, characterized by real-time quantitative PCR / S. Boo, C. Wong, K. Rodrigues and others // *Polar Biol.* – 2013. – 36. – P. 381–389.
17. Turchetti B. Influence of a bioticvariables on culturable yeast diversity in two distinct Alpeglaciers / B. Turchetti, M. Goretti, E. Branda and others // *FEMS Microbiol. Ecol.* – 2013. – Vol. – 86 (2). – P. 327–340.
18. Jacek W. Endolithic microbial habitats as refuges for life in polyextreme environment of the Atacama Desert // *Current Opinion in Microbiology.* – 10.1016/j.mib.2018.01.003, 43, (124-131), (2018).
19. Iara F. Fungal diversity in the Atacama Desert / F. Iara, V. Santiago, N. Gonçalves // *Antonie van Leeuwenhoek.* – 10.1007/s10482-018-1060-6, 111, 8, (1345-1360), (2018).
20. Culka A. Raman microspectrometric study of pigments in melanized fungi from the hyperarid Atacama desert gypsumcrust / A. Culka, J. Jehlička // *Journal of Raman Spectroscopy.* – 48, 11, (1487-1493), (2017).
21. Vivian N. Taxonomy, phylogeny and ecology of cultivable fungi presenting sea water gradients across the Northern Antarctica Peninsula / N. Vivian, A. Carlos, Rosa and Luiz H. Rosa. and others // *Extremophiles.* – 21, 6, (1005), (2017).
22. Eisenman H. Synthesis and assembly of fungal melanin / H. Eisenman, A. Casadevall // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2012; 93 (3): 931–940.
23. Lopes F. Pigment production by filamentous fungion agro-industrial by products: An eco-friendly alternative / F. Lopes, D. Tichota, J. Pereira and others // *Appl Biochem Biotechnol.* – 2013; 171(3):616–625.
24. Demain A. Importance of microbial natural products and the need to revitalize their discovery / A. Demain // *J. Ind Microbiol Biotechnol.* – 2014; 41(2): 185–201.
25. Kumar A. Microbialpigments: Production and their applications in various industries / A. Kumar, H. Vishwakarma, J. Singh // *Int J Pharm Chem BiolSci.* – 2015; 5(1): 203–212.
26. Panesar R. Production of microbial pigments utilizing agro-industrial waste / R. Panesar, S. Kaur, P. Panesar // *A review Curr Opin Food Sci.* – 2015; 1: 70–76. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cofs.2014.12.002>.
27. Akilandeswari P. Exploration of industrially important pigments from oil fungi / P. Akilandeswari, B. Pradeep // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2016; 100(4):1631–1643.
28. Duran N. Ecological-friendly pigments fungi / N. Duran, M. Teixeira, R. De Conti and others // *Critic Rev Food Sci Nutr.* – 2002; 42(1): 53–66.
29. Dufossé L. Filamentous fungiareal gescale producers of pigments and colorantsf or the food industry / L. Dufossé, M. Fouillaud, Y. Caro // *Curr Opin Biotechnol.* – 2014; 26: 56–61.
30. Butler M., Day A. Fungalmelanins / M. Butler, A. Day // *A review Can J Microbiol.* – 1998; 44(12): 1115–1136.
31. Sandra R., Gabriela S., Helen F. Production of Melanin Pigment by Fungi and Its Biotechnological Applications 2017 Additional in formation is available at the end of the chapter <http://dx.doi.org/10.5772/67375/>
32. Taburets O. V. The Effect of "Melanin-Gel" on the Wound Healing / O. V. Taburets, O. O. Morgaienko, T. O. Kondratyuk and others // *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences (RJPBCS).* – 2016. – 7(3). – P. 2031–2038.
33. Dranitsina A. S. Tgfb1, Ptgs2 Genes Expression During Dynamics of Wound Healing and with the Treatment of Melanin / A. S. Dranitsina, O. V. Taburets, K. O. Dvorshchenko and others // *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences (RJPBCS).* – 2017 – 8(1). – P. 2014–2023.
34. Nosanchuk Joshua D. The contribution of melanin to microbial pathogenesis / Joshua D. Nosanchuk // *Cell Microbiol.* – 2003. – Vol. 5 (4). – 203–223.
35. Nosanchuk Joshua D. Fungal Melanin: What do We Know About Structure? / Joshua D. Nosanchuk // *Front Microbiol.* – 2015. – Vol. 6. – 1463 (7 p). doi: 10.3389/fmicb.2015.01463
36. Kondratiuk T. Microorganisms, perspective for biotechnology, medicine, environmental technologies, in the collection of microscopic fungi ESC "Institute of biology and medicine" / T. Kondratiuk, T. Akulenko, T. Beregova and others // *Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv. Series: Biology.* – 2017. – 73. – P. 22–30. <http://birovestnik.com/index.php/biology/pages/view/indexing>

Reference (Scopus)

- Banatbrahim M. Microbial biosurfactants production, applications and future potential // *Applied Microbiology and Biotechnology.* – 2010. – Vol. 87, Is. 2. – P. 427–444.
- Buzzini P. Cold-Adapted Yeasts: A Lesson from the Cold and a Challenge for the XXI Century. *Cold-Adapted Yeasts. Biodiversity, Adaptation Strategies and Biotechnological Significance.* – 2014. – P. 3–22.
- Dimitrova S. Production of Metabolites with Antioxidant and Emulsifying Properties by Antarctic Strain *Sporobolomyces salmonicolor* AL₁ // *Applied Biochemistry and Biotechnology.* – 2013. – V. 169, Is. 1. – P. 301–311.
- Margesin R. Characterization of cold-active pectatylases from psychrophilic *Mrakiafrigida* // *Lett. Appl. Microbiol.* – 2005. – Vol. 40 (6). – P. 453–459.
- Nai, H. Wong, A. Pannenbecker, et al. Nutritional physiology of a rock-inhabiting, model microcolonial fungus from an an asexual line age of the Chaetothyriales (Ascomycetes) // *Fungal Genet. Biol.* – 2013. – Vol. 56. – P. 54–66.
- Poli A. Production and chemical characterization of exopolysaccharide synthesized by psychrophilic yeaststra in *Sporobolomyces salmonicolor* AL₁, isolated from Livingston Island, Antarctica // *Folia Microbiologica.* – 2010. – 55. – P. 576–581.
- Nicolaus B. Exopolysaccharides from extremophiles: from fundamental stobiotechnology // *Environmental Technology.* – 2010. – V. 31, Is. 10. – P. 1145–1158.
- Singh O., Gabani P. Extremophiles: radiation resistance microbial reserves and therapeutic implications // *Journal of Applied Microbiology.* 2011. – 110. – 851–861. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.04971.x>.
- Anitori R. Extremophiles: Microbiology and Biotechnology. – 2012. – 300 p.
- Svahn S. *Penicillium nalgiovense* Laxaisolated from Antarctica is a new source of the antifungal metabolite amphotericin B // *Fungal Biology and Biotechnology.* – 2015. – 1. – P. 2–11.
- Eisenman H. Synthesis and assembly of fungal melanin // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2012. – 93(3). – P. 931–940.
- Falalyeyeva T. M. The influence of melanin is olated from Antarctic yeasts on cortisol blood level of rats in conditions of stress action // *Ukr. Antarctic J.* – 2009. – 8. – 391–394.
- Plonka P. Melanin synthesis in microorganisms – Biotechnological and medical aspects // *Acta biochimica Polonica.* – 2006. – 53(3). – P. 429–443.
- Belozerskaya T. Melanin Pigments of Fungi // In book: *Fungal Metabolites.* – 2018. – P. 263–291. DOI: 10.1007/978-3-319-19456-1_29-1.
- Chyzhanska N. Effect of melanin isolated from Antarctic yeasts on preservation of pig livestock after ablatation // *Ukr. Antarctic J.* – 2009. – 8. – P. 382–385.
- Boo S. Thermal stress responses in Antarctic yeast, *Glaciozyma Antarctica* PI12, characterized by real-time quantitative PCR // *Polar Biol.* – 2013. – 36. – P. 381–389.
- Turchetti B. Influence of a bioticvariables on culturable yeast diversity in two distinct Alpeglaciers // *FEMS Microbiol. Ecol.* – 2013. – Vol. – 86 (2). – P. 327–340.
- Jacek W. Endolithic microbial habitats as refuges for life in polyextreme environment of the Atacama Desert. *Current Opinion in Microbiology.* 10.1016/j.mib.2018.01.003, 43, (124-131), (2018).
- Iara F., Santiago V., Gonçalves N. Fungal diversity in the Atacama Desert, *Antonie van Leeuwenhoek.* 10.1007/s10482-018-1060-6, 111, 8, (1345-1360), (2018).
- Culka A., Jehlička J. Raman microspectrometric study of pigments in melanized fungi from the hyperarid Atacama desert gypsumcrust, *Journal of Raman Spectroscopy.* 48, 11, (1487-1493), (2017).
- Vivian N. et al. Taxonomy, phylogeny and ecology of cultivable fungi presenting sea water gradients across the Northern Antarctica Peninsula // *Extremophiles.* 21, 6, (1005), (2017).
- Eisenman H. Synthesis and assembly of fungal melanin// *Appl Microbiol Biotechnol.* 2012; 93(3):931–940.

23. Lopes F. Pigment production by filamentous fungion agro-industrial by products: An eco-friendly alternative // *Appl Biochem Biotechnol.* 2013; 171(3): 616–625.
24. Demain A. Importance of microbial natural products and the need to revitalize their discovery // *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2014; 41(2): 185–201.
25. Kumar A. Microbialpigments: Production and their applications in various industries // *Int J Pharm Chem BiolSci.* 2015; 5(1): 203–212.
26. Panesar R., Kaur S., Panesar P. Production of microbial pigments utilizing agro-industrial waste: A review. *Curr Opin Food Sci* 2015; 1:70–76. Availablefrom: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cofs.2014.12.002>.
27. Akilandeswari P., Pradeep B. Exploration of industrially important pigments from oil fungi. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2016;100(4):1631–1643.
28. Duran N. Ecological-friendly pigments fungi // *Critic Rev Food Sci Nutr.* 2002; 42(1): 53–66.
29. Dufossé L., Fouillaud M., Caro Y., Mapari S., Sutthiwong N. Filamentous fungi are natural producers of pigments and colorants for the food industry. *Curr Opin Biotechnol.* 2014;26:56–61.
30. Butler M., Day A. Fungalmelanins: A review. *Can J Microbiol.* 1998; 44(12): 1115–1136.
31. Sandra R., Gabriela S., Helen F. Production of Melanin Pigment by Fungi and Its Biotechnological Applications 2017. Additional information is available at the end of the chapter <http://dx.doi.org/10.5772/67375>.
32. Taburets O. V. The Effect of "Melanin-Gel" on the Wound Healing // *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences (RJPBCS).* – 2016. – 7(3). – P. 2031-2038.
33. Dranitsina A. S. Tgfb1, Ptgs2 Genes Expression During Dynamics of Wound Healing and with the Treatment of Melanin // *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences (RJPBCS).* – 2017 – 8(1). – P. 2014-2023.
34. Nosanchuk Joshua D. The contribution of melanin to microbial pathogenesis // *Cell Microbiol.* – 2003. – V. 5 (4). – 203–223.
35. Nosanchuk Joshua D. Fungal Melanin: What do We Know About Structure? // *Front Microbiol* – 2015. – Vol. 6. – 1463 (7 p). doi: 10.3389/fmicb.2015.01463
36. Kondratiuk T., Akulenko T., Beregova T., Ostapchenko L. Microorganisms, perspective for biotechnology, medicine, environmental technologies, in the collection of microscopic fungi ESC "Institute of biology and medicine", Taras Shevchenko national university of Kyiv // *Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv. Series: Biology.* 2017. 73. P. 22-30. <http://biovestnik.com/index.php/biology/pages/view/indexing>

Надійшла до редколегії 07.03.2019
Отримано виправлений варіант 09.04.2019
Підписано до друку 09.04.2019

Received in the editorial 07.03.2019
Received a revised version on 09.04.2019
Signed in the press on 09.04.2019

Видавничо-поліграфічний центр
"Київський університет".
Версія не для друку

Т. Кондратиук, канд. биол. наук,
Т. Береговая, д-р биол. наук, Т. Акуленко, инж., Е. Торгалло, канд. биол. наук,
В. Верещака, д-р мед. наук
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

СИНТЕЗ МЕЛАНИНА ЧЕРНЫМИ ДРОЖЖАМИ *PSEDONADSONIELLA BRUNNEA*: ЗАВИСИМОСТЬ ОТ КОЛИЧЕСТВА L-ТИРОЗИНА В КУЛЬТУРАЛЬНОЙ СРЕДЕ

Целью работы было установление оптимальных условий синтеза меланина черными дрожжеподобными грибами *Pseudonadsoniella brunnea* (*Basidiomycota*, *Agaricomycotina*, *Agaricomycetes*, *Polyporales*, *Meripilaceae*) в зависимости от количества L-тирозина в культуральной среде. В исследованиях использовали жидкие культуральные среды Malt extract broth (MEB). L-Тирозин добавляли в культуральные среды в количестве 0,01, 0,025 и 0,05 %. Для получения меланина культивирование *Pseudonadsoniella brunnea* осуществляли при pH 1-1,5 и температуре +21±1°C в течение семи суток. Статистическую обработку результатов проводили с использованием общепринятых методов вариационной статистики. Установлено, что уровень синтеза меланина черными дрожжеподобными грибами *Pseudonadsoniella brunnea* зависит от количества внесенного в культуральную среду L-тирозина. Анализ результатов проведенных исследований свидетельствует, что питательная среда MEB, содержащая 0,05 % L-тирозина в данной серии экспериментов является лучшей композицией для получения меланина штаммом-продуцентом *Pseudonadsoniella brunnea*. В сравнении с контролем (MEB без внесения L-тирозина) количество синтезированного *Pseudonadsoniella brunnea* меланина в указанных условиях увеличивалось в 2,5 раза. Проведение дальнейших исследований в направлении выяснения оптимальных условий культивирования черных дрожжеподобных грибов *Pseudonadsoniella brunnea* с целью получения меланина является актуальным и перспективным.

Ключевые слова: черные дрожжеподобные грибы, продуцент меланина, L-тирозин.

T. Kondratiuk, Ph. D.,
T. Beregova, Dr. Sc., T. Akulenko, engineer, Ie. Torgallo, Ph. D., V. Vereschaka, Dr.Sc
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

MELANIN SYNTHESIS BY BLACK Yeast-LIKE FUNGIPSEDONADSONIELLA BRUNNEA: DEPENDENCE OF L-TYROSINE QUANTITY IN THE CULTURAL MEDIUM

To determine the optimal conditions for the synthesis of melanin by black yeast fungi *Pseudonadsoniella brunnea* (*Basidiomycota*, *Agaricomycotina*, *Agaricomycetes*, *Polyporales*, *Meripilaceae*), depending on the amount of L-tyrosine in the culture medium was the purpose of the work. The standard Malt Extract Broth (MEB) liquid nutrient medium was used within this study. L-tyrosine was added to the culture medium in a quantity of 0.01, 0.025 and 0.05%. To obtain the melanin the cultivation of *Pseudonadsoniella brunnea* was carried out at pH 1-1.5, temperature + 21 ± 1 ° C during 7 days. Statistical processing of the results was carried out using generally accepted methods of variation statistics. It has been established that the level of melanin synthesis by black yeast-like fungi *Pseudonadsoniella brunnea* depends on the amount of L-tyrosine introduced into the culture medium. The MEB nutrient medium containing 0.05% L-tyrosine in this series of experiments found to be the best composition for obtaining melanin by the strain-producer *Pseudonadsoniella brunnea*. Compared to control (MEB without L-tyrosine), the amount of melanin synthesized by *Ps. brunnea* in these conditions increased by 2.5 times. The further research into the optimal conditions for the cultivation of black yeast-like fungi *Pseudonadsoniella brunnea* in order to obtain melanin is relevant and promising.

Key words: black yeast-like fungi, melanin producer, L-tyrosine

УДК: 616.62-006.6-073

В. Дмитрик, асп., О. Савчук, д-р биол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна,
І. Андрійченко, студ.
ТОВ "Фармацевтичний завод "Біофарма, Київ, Україна

ВМІСТ МЕТАЛОМАТРИЧНИХ ПРОТЕЇНАЗ У ПУХЛИНІ РАКУ СЕЧОВОГО МІХУРА

Рак сечового міхура (РСМ) є дев'ятим за частотою серед онкологічних захворювань, із найбільшим показником кількості хворих у розвинених країнах. Захворювання частіше діагностують у чоловіків – близько 75 %. Здатність до інвазії навколишніх тканин і метастазування в окремі органи є одним із фундаментальних властивостей злоякісних пухлин. Згідно із сучасним уявленням про механізми метастазування, для інвазійного росту клітинам пухлин необхідно долати бар'єри, які являють собою базальні мембрани, позаклітинний матрикс і тканинні структури. Майже всі компоненти позаклітинного матриксу можуть бути деградованими за допомогою металоматричних протеїназ (ММП). Більше того, субстратами ММП можуть бути прекурсори факторів росту та молекули адгезії на поверхні клітин. ММП також беруть участь в епітеліально-мезенхіальному перетворенні, чим і забезпечується метастазування. Попередні дослідження інших авторів указують на збільшення біосинтезу різноманітних ММП у середовищі пухлин та в метастазах, такі зміни асоційовані зі ступенем диференціювання пухлини, глибиною інвазії, а також їх пов'язують із поганим подальшим прогнозом і низькою виживаністю хворих із різноманітними онкологічними захворюваннями. Метою нашої роботи було дослідити вміст ММП-1, 2, 3, 8 та ТІМП-1 у пухлинах і стінках здорового міхура у хворих на РСМ залежно від стадії за TNM-класифікацією. Нами досліджено збільшення вмісту ММП-1, 2, 3, 8 та ТІМП-1 у зразках здорових стінок сечового міхура для 3-ої та 4-ої стадії РСМ, що вказує на участь досліджуваних показників на ріст та інвазію пухлин сечового міхура. Дані нашого дослідження узгоджуються з даними попередніх досліджень, проведених при вивченні інших новоутворень, які вказують про взаємозв'язок досліджуваних показників із розвитком онкологічних захворювань.

Ключові слова: рак сечового міхура, ММП, ТІМП, імуноферментний аналіз.

Вступ. Рак сечового міхура (РСМ) є дев'ятим за частотою серед онкологічних захворювань. Найбільший показник кількості хворих – у розвинених країнах. Захворювання частіше діагностують у чоловіків – близько 75 % [8].

На всіх етапах метастазування та інвазії трансформована клітина перебуває в тісному контакті із позаклітинним матриксом, тому одним із головних молекулярних механізмів інвазії та метастазування вважається порушення базальної мембрани протеїназами й пошко-

дження позаклітинного матриксу. Окрім деградування позаклітинного матриксу, у метастазуванні суттєву роль відіграють процеси порушення адгезивних контактів і, як наслідок, клітини пухлин набувають здатність до руху. Для цього злоякісні пухлини виробляють протеолітичні ферменти. Матриксні металопроотеїнази (ММП) вважаються основними протеолітичними ферментами, беруть участь на всіх етапах прогресування та метастазування пухлин [10]. Також протеїнази беруть участь у пухлинному ангиогенезу, сприяють поширенню нових

капілярів. У процесі канцерогенезу регуляторні шляхи, які впливають на деградацію позаклітинного матриксу, порушуються та відбувається патологічна експресія регуляторних білків, що дає змогу трансформованим клітинам пройти всі етапи метастазування [4, 14]. Залежно від структурно функціональних особливостей та субстратної специфічності ММП поділяють на декілька підкласів. Основними підкласами ММП є колагенази широкого спектру дії (напр., ММП-1, 8), желатинази (ММП-2), стромелізини (ММП-3) та ММП мембранного типу [21,22].

Попередні дослідження інших авторів указують на збільшення біосинтезу різноманітних ММП у середовищі пухлин та в метастазах, такі зміни асоційовані зі ступенем диференціювання пухлини, глибиною інвазії, а також їх пов'язують із поганим подальшим прогнозом та низькою виживаністю хворих з різноманітними онкологічними захворюваннями [3, 5, 22].

Метою нашої роботи було дослідити вміст ММП-1, 2, 3, 8 та ТІМП-1 у пухлинах та стінках здорового міхура у хворих на РСМ залежно від стадії за TNM-класифікацією.

Матеріали та методи. Зразки здорових і патологічних тканин отримані у хворих на РСМ. Заключний діагноз ставився після рентгенологічних, ендоскопічних, клінічних методів дослідження з обов'язковою морфологічною верифікацією. У досліді брали участь 42 пацієнти: 10 пацієнтів із першою стадією РСМ, 12 пацієнтів – із другою стадією, 10 – із третьою та 10 – із четвертою.

Гомогенати пухлин сечового міхура були отримані під час операційного втручання. Здорові тканини стінок стравоходу були отримані за допомогою біопсії та використані як контроль. Усі зразки гомогенатів здорових стінок і пухлин були нормалізовані за концентрацією білка 10 мкг/мл, використовуючи метод за Бредфорд [2].

Уміст ММП-1, 2, 3, 8 та ТІМП-1 у гомогенатах тканин пухлин визначали з використанням методу імуноферментного аналізу в модифікації ELISA [8]. Використовували набір первинних та вторинних антитіл виробника SantaCruz Biotechnology, CA, USA. У плашки для імуноферментного аналізу наносили попередньо нормалі-

зовані за концентрацією білка гомогенати тканин здорових стінок та пухлин і залишали на ніч за температури 4° С. Після промивки на плашки наносили 5 % обезжирене сухе молоко та інкубували протягом 1 год за температури 37° С, після чого знову промивали. Після інкубації протягом 1 год при 37° С із відповідними первинними антитілами проти відповідних БТШ плашки промивали та інкубувалися протягом 1 год за температури 37° С із відповідними вторинними антитілами конюгованими з пероксидазою хрому. Після чергової промивки було додано субстрати до пероксидази хрому. Реакцію зупиняли додаванням 2,5 Н Н₂SO₄. Показники оптичної щільності отримували за допомогою відповідного рідера для мікроплашок (μQuant™, BioTek Instruments, Inc) за довжини хвилі 492 нм.

Статистичну обробку отриманих результатів проводили за допомогою методів варіаційної статистики з використанням комп'ютерної програми Excel.

Результати та обговорення. Здатність до інвазії навколишніх тканин і метастазування в окремі органи є одним із фундаментальних властивостей злоякісних пухлин. Позаклітинний матрикс та базальна мембрана разом становлять первинний бар'єр проти метастазування. Майже всі компоненти позаклітинного матриксу можуть бути деградованими за допомогою ММП, більш того, субстратами ММП можуть бути прекурсори факторів росту та молекули адгезії на поверхні клітин. ММП також беруть участь в епітеліально-мезенхіальному перетворенні, що забезпечує метастазування пухлин [19]. Окрім того, ММП беруть участь в ангіогенезі шляхом релізу його факторів, таких, як ендотеліальний фактор росту судин (VEGF – від англ. Vascularendo the lial growth factor) [1]. Тим не менш, деякі продукти деградації позаклітинного матриксу виявляють антиангіогенні властивості [7]. Таким чином, ММП можуть виявляти подвійний ефект на ангіогенез. Запрограмована клітинна смерть – апоптоз, упорядкований процес, в якому небажані, дефектні або пошкоджені клітини селективно та швидко елімінуються з організму. ММП відіграють важливу роль в апоптозі, виявляючи як проапоптозні, так і протиапоптозні властивості [11].

Таблиця 1. Уміст ММП-1 у тканинах пухлин РСМ порівняно із тканинами здорових стінок сечового міхура згідно з TNM класифікації захворювання

Група	Вміст ММП-1 (у.о./мл)
Контроль	0.258±0.023
Стадія 1	0.277±0.051
Стадія 2	0.273±0.038
Стадія 3	0.463±0.047*
Стадія 4	0.585±0.083*

M ± m, n = 10; * – p < 0,01 достовірно стосовно значень контролю.

Відомо, що ММП-1 забезпечує інвазію пухлин за допомогою розчинення позаклітинного матриксу, активації остеокластів та метастазування за різних онкологічних захворювань [9, 17]. У ході нашого дослідження вміст ММП-1 у зразках гомогенатів тканин пухлин збільшений

для всіх стадій порівняно зі зразками гомогенатів здорових стінок сечового міхура (табл. 1). Достовірно збільшення помічене для 3 та 4 стадії у 1,8 (p < 0,01) та 2,3 рази (p < 0,01).

Таблиця 2. Уміст ММП-2 у тканинах пухлин РСМ порівняно із тканинами здорових стінок сечового міхура згідно з TNM класифікації захворювання

Група	Вміст ММП-2 (у.о./мл)
Контроль	0.196±0.036
Стадія 1	0.152±0.03
Стадія 2	0.16±0.021
Стадія 3	0.229±0.05
Стадія 4	0.375±0.058*

M ± m, n = 10; * – p < 0,05 достовірно стосовно значень контролю.

ММП-2 продукується клітинами пухлин та стромальними клітинами у формі прозимогенів. Після активації гідролізом ММП-2 порушує структуру IV типу колагену базальної мембрани, чим порушує здатність базальної мембрани стримувати рух трансформованих клітин [23]. Активіація та каталітична активність ММП-2 пов'язана з

її здатністю взаємодіяти з молекулами клітинної оболонки. Нами досліджено збільшення вмісту ММП-2 у тканинах пухлин при РСМ. Уміст ММП-2 у тканинах пухлин був недостовірно вищим у 1,7 разів для 3-ої стадії РСМ та достовірно вищий майже у 2 рази ($p < 0,05$) у зразках пухлин 4-ої стадії захворювання (табл. 2).

Таблиця 3. Уміст ММП-3 у тканинах пухлин РСМ порівняно із тканинами здорових стінок сечового міхура згідно з TNM класифікації захворювання

Група	Вміст ММП-3 (у.о./мл)
Контроль	0.133±0.011
Стадія 1	0.126±0.023
Стадія 2	0.128±0.018
Стадія 3	0.186±0.041*
Стадія 4	0.339±0.054*

$M \pm m$, $n = 10$; * – $p < 0,05$ достовірно щодо значень контролю.

Попередні дослідження вказують на участь ММП-3 в інвазії пухлин [6]. Уважається, що ММП-3 може бути як запобіжним, так і пропухлинним фактором стосовно росту пухлин [12]. За результатами нашого дослідження,

уміст ММП-3 у зразках тканин пухлин був достовірно вищим в 1,4 ($p < 0,01$) та у 2,5 ($p < 0,01$) разів для 3-ої та 4-ої стадії порівняно зі зразками здорових тканин сечового міхура (табл. 3).

Таблиця 4. Уміст ММП-8 у тканинах пухлин РСМ порівняно із тканинами здорових стінок сечового міхура згідно з TNM класифікації захворювання

Група	Вміст ММП-8 (у.о./мл)
Контроль	0.322±0.037
Стадія 1	0.325±0.043
Стадія 2	0.337±0.066
Стадія 3	0.474±0.132
Стадія 4	0.778±0.136*

$M \pm m$, $n = 10$; * – $p < 0,01$ достовірно стосовно значень контролю.

ММП-8 може сприяти інвазії та метастазам завдяки участі в регуляції інтерлейкінів IL-1 β , IL-6 та IL-8 [18, 20]. ММП-8 також розглядають як супресор пухлинного росту за рахунок участі в розщепленні ряду субстратів, до яких можна віднести матриксні білки та хемокіни [20]. У процесі нашого дослідження вміст ММП-8 у зразках гомогенатів тканин пухлин був вищим в 1,4 для 3-ої стадії та у 2,4 ($p < 0,01$) рази – для 4-ої стадії порівняно зі зразками у тканинах здорових стінок сечового міхура (табл. 4).

ТІМП відіграють важливу роль у регуляції широкого спектру клітинних процесів, беруть участь у контролі та

ремодельованні позаклітинного матриксу, міжклітинній адгезії та сигналіну (із залученням факторів росту) тощо [24]. Активіація ММП у позаклітинному матриксі специфічно подавляється ендogenousними тканинними інгібіторами металопротеїнази (ТІМП) завдяки формуванню стійких і необоротних нековалентних зв'язків із метал-зв'язувальними ділянками активних ММП в еквімолярному співвідношенні. ТІМП формують стійкі комплекси як із активними формами ММП, так і з проензімами, регулюючи таким чином активність ММП [16].

Таблиця 5. Уміст ТІМП-1 у тканинах пухлин РСМ порівняно із тканинами здорових стінок сечового міхура згідно з TNM класифікації захворювання

Група	Вміст ТІМП-1 (у.о./мл)
Контроль	0.129±0.007
Стадія 1	0.143±0.028
Стадія 2	0.151±0.026
Стадія 3	0.218±0.054*
Стадія 4	0.391±0.071*

$M \pm m$, $n = 10$; * – $p < 0,01$ достовірно щодо значень контролю.

Попередні дослідження при РСМ указують на зниження вмісту ТІМП-1 у плазмі та підвищеному вмісті в сечі [13, 15]. Нами було досліджено вміст ТІМП-1 у зразках тканин пухлин сечового міхура. Уміст ТІМП-1 у зразках гомогенатів тканин пухлин був достовірно вищим в 1,7 ($p < 0,01$) та у 3 рази ($p < 0,01$) порівняно зі зразками гомогенатів здорових тканин сечового міхура (табл. 5).

Висновки. Еміст ММП-1, 2, 3, 8 та ТІМП-1 був вищий, ніж у зразках здорових стінок сечового міхура для 3-ої та 4-ої стадії РСМ, що вказує на участь досліджуваних показників на ріст та інвазію пухлин сечового міхура. Дані

нашого дослідження узгоджуються з даними попередніх досліджень, проведених при вивченні інших новоутворень, які вказують про взаємозв'язок досліджуваних показників із розвитком онкологічних захворювань.

Список використаних джерел:

1. Bergers G. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis / G. Bergers, R. Brekken, G. McMahon та ін. // Nature Cell Biology. – 2000. – № 2. – С. 737–744.
2. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / 1. Bradford // 1. – 1976. – № 72. – С. 248–254.

3. Deryugina E. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis / E. Deryugina, J. Quigley // *Cancer Metastasis Rev.* – 2006. – № 25. – С. 9–34.
4. Duffy M. Cancer invasion and metastasis: changing views / M. Duffy, P. McGowan, W. Gallagher // *J Pathol.* – 2008. – № 214. – С. 283–293.
5. Duffy M. J. Proteases as prognostic markers in cancer / M. J. Duffy // *Clin Cancer Res.* – 1996. – № 2. – С. 613–618.
6. Hegedus L. Additional MDA-MB-231 breast cancer cell matrix metalloproteinases promote invasiveness / L. Hegedus, H. Cho, X. Xie and others // *Journal of Cellular Physiology.* – 2008. – № 216. – С. 480–485.
7. Heljasvaara R. Generation of biologically active endostatin fragments from human collagen XVIII by distinct matrix metalloproteinases / R. Heljasvaara, P. Nyberg, J. Luostarinen and others // *Experimental Cell Research.* – 2005. – № 307. – С. 292–304.
8. Ishchuk T. V. Plasma levels of MMPs and TIMP-1 in urinary bladder cancer patients / T. V. Ishchuk, D. Glavachek, O. M. Savchuk and others // *Biomedical Research and Therapy.* – 2018. – № 5. – С. 1931–1940.
9. Koc M. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) elevated in serum but not in bronchial lavage fluid in patients with lung cancer / M. Koc, D. Ediger, F. Budak and others // *Tumori.* – 2006. – № 92. – С. 149–154.
10. Malemud C. J. Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview / C. J. Malemud // *Front Biosci.* – 2006. – № 11. – С. 1696–1701.
11. Mannello F. Multiple roles of matrix metalloproteinases during apoptosis / F. Mannello, F. Luchetti, E. Falcieri and others // *Apoptosis.* – 2005. – № 10. – С. 19–24.
12. McCawley L. A protective role for matrix metalloproteinase-3 in squamous cell carcinoma / L. McCawley, H. Crawford, L. King and others // *Cancer Research.* – 2004. – № 64. – С. 6965–6972.
13. Naruo S. Serum levels of a tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in bladder cancer patients / S. Naruo, H. Kanayama, H. Takigawa and others // *International Journal of Urology.* – 1994. – № 1. – С. 228–231.
14. Nelson A. Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications / A. Nelson, B. Fingleton, M. Rothenberg and others // *J Clin Oncol.* – 2000. – № 18. – С. 1135–1149.
15. Nutt J. Matrix metalloproteinase-1 is induced by epidermal growth factor in human bladder tumour cell lines and is detectable in urine of patients with bladder tumours / J. Nutt, J. Mellon, K. Qureshi et al. // *British Journal of Cancer.* – 1998. – № 78. – С. 215–220.
16. Ramnath N. Matrix metalloproteinase inhibitors / N. Ramnath, P. Creaven // *Curr Oncol Rep.* – 2004. – № 6. – С. 96–102.
17. Roy R. Tumor-specific urinary matrix metalloproteinase fingerprinting: Identification of high molecular weight urinary matrix metalloproteinase species / R. Roy, G. Louis, K. Loughlin and others // *An official journal of the American Association for Cancer Research.* – 2008. – № 14. – С. 6610–6617.
18. Stadlmann S. Cytokine-regulated expression of collagenase-2 (MMP-8) is involved in the progression of ovarian cancer / S. Stadlmann, J. Pollheimer, P. L. Moser and others // *Eur J Cancer.* – 2003. – № 39. – С. 2499–2505.
19. Thiery J. P. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression / J. P. Thiery // *Nature Reviews Cancer.* – 2002. – № 2. – С. 442–454.
20. Thirkettle S. Matrix metalloproteinase 8 (collagenase 2) induces the expression of interleukins 6 and 8 in breast cancer cells / S. Thirkettle, J. Decock, H. Arnold and others // *The Journal of biological chemistry.* – 2013. – № 288. – С. 16282–16294.
21. Visse R. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry / R. Visse, H. Nagase // *Circ Res.* – 2003. – № 92. – С. 827–839.
22. Westermarck J. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion / J. Westermarck, V. Kahari // *FASEB J.* – 1999. – № 13. – С. 781–792.
23. Zhang W. Perfluorooctanoic acid stimulates breast cancer cells invasion and up-regulates matrix metalloproteinase-2/-9 expression mediated by activating NF- κ B / W. Zhang, F. Wang, P. Xu and others // *Toxicol Lett.* – 2014. – № 229. – С. 118–125.
24. Zhang Y. Relationship between matrix metalloproteinases and the occurrence and development of ovarian cancer / Y. Zhang, Q. Chen // *Braz J Med Biol Res.* – 2017. – № 50. – С. e6104.
2. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72(1): 248-254.
3. Deryugina E.I., Quigley J.P. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 2006, 25(1): 9–34.
4. Duffy M.J., McGowan P.M., Gallagher W.M. Cancer invasion and metastasis: changing views. *J Pathol* 2008, 214(3):283–293.
5. Duffy M.J. Proteases as prognostic markers in cancer. *Clin Cancer Res* 1996, 2(4):613–618.
6. Hegedus L., Cho H., Xie X., Eliceiri G.L. (2008) Additional MDA-MB-231 breast cancer cell matrix metalloproteinases promote invasiveness. *Journal of Cellular Physiology* 216(2): 480-485.
7. Heljasvaara R., Nyberg P., Luostarinen J. et al. Generation of biologically active endostatin fragments from human collagen XVIII by distinct matrix metalloproteinases. *Experimental Cell Research.* 2005;307(2):292–304.
8. Ishchuk T., Glavachek D., Savchuk O., Yakovlev P., Falaleeva T., Beregova T., Ostapchenko L. (2018). Plasma levels of MMPs and TIMP-1 in urinary bladder cancer patients. *Biomedical Research and Therapy.* 5. 1931-1940. 10.15419/bmrat.v5i1.407.
9. Koc M., Ediger D., Budak F., Karadag M., Oral H.B., Uzaslan E., Ege E., Gozu R.O. (2006). Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) elevated in serum but not in bronchial lavage fluid in patients with lung cancer. *Tumori* 92(2): 149-154.
10. Malemud C. J. Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview. *Front Biosci.* 2006, 11: 1696–1701.
11. Mannello F., Luchetti F., Falcieri E., Papa S. Multiple roles of matrix metalloproteinases during apoptosis. *Apoptosis.* 2005;10(1):19–24.
12. McCawley L.J., Crawford H.C., King L.E., Jr., Mudgett J., Matrisian L.M. (2004). A protective role for matrix metalloproteinase-3 in squamous cell carcinoma. *Cancer Research* 64(19): 6965-6972.
13. Naruo S., Kanayama H., Takigawa H., Kagawa S., Yamashita K., Hayakawa T. Serum levels of a tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in bladder cancer patients. *International Journal of Urology.* 1994; 1(3): 228–231.
14. Nelson A.R., Fingleton B., Rothenberg M.L., Matrisian L.M. Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J Clin Oncol* 2000, 18(5):1135–1149.
15. Nutt J.E., Mellon J.K., Qureshi K., Lunec J. Matrix metalloproteinase-1 is induced by epidermal growth factor in human bladder tumour cell lines and is detectable in urine of patients with bladder tumours. *British Journal of Cancer.* 1998; 78(2): 215–220.
16. Ramnath N., Creaven P.J.: Matrix metalloproteinase inhibitors. *Curr Oncol Rep.* 2004, 6(2): 96–102.
17. Roy R., Louis G., Loughlin K.R., Wiederschain D., Kilroy S.M., Lamb C.C., Zurakowski D., Moses M.A. (2008) Tumor-specific urinary matrix metalloproteinase fingerprinting: Identification of high molecular weight urinary matrix metalloproteinase species. *Clinical cancer research: An official journal of the American Association for Cancer Research* 14(20): 6610-6617.
18. Stadlmann S., Pollheimer J., Moser P.L., Raggi A., Amberger A., Margreiter R. et al. Cytokine-regulated expression of collagenase-2 (MMP-8) is involved in the progression of ovarian cancer. *Eur J Cancer.* 2003; 39:2499–2505.
19. Thiery J.P. (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature Reviews Cancer* 2(6): 442-454.
20. Thirkettle S., Decock J., Arnold H., Pennington C. J., Jaworski D. M. & Edwards D. R. (2013). Matrix metalloproteinase 8 (collagenase 2) induces the expression of interleukins 6 and 8 in breast cancer cells. *The Journal of biological chemistry*, 288(23), 16282–16294. doi:10.1074/jbc.M113.464230.
21. Visse R., Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 2003, 92(8):827–839.
22. Westermarck J., Kahari V.M. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB J* 1999, 13(8): 781–792.
23. Zhang W., Wang F., Xu P., Miao C., Zeng X., Cui X., Lu C., Xie H., Yin H., Chen F., et al. Perfluorooctanoic acid stimulates breast cancer cells invasion and up-regulates matrix metalloproteinase-2/-9 expression mediated by activating NF- κ B. *Toxicol Lett.* 2014; 229:118–125.
24. Zhang Y., Chen Q. Relationship between matrix metalloproteinases and the occurrence and development of ovarian cancer. *Braz J Med Biol Res.* 2017 May 18; 50(6): e6104.

Reference (Scopus):

1. Bergers G., Brekken R., McMahon G., Vu T.H., Itoh T., Tamaki K., Tanzawa K., Thorpe P., Itohara S., Werb Z., Hanahan D. (2000) Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nature Cell Biology* 2(10): 737-744.

Надійшла до редколегії 07.03.2019
Отримано виправлений варіант 09.04.2019
Підписано до друку 09.04.2019

Received in the editorial 07.03.2019
Received a revised version on 09.04.2019
Signed in the press on 09.04.2019

В. Дмитрик, асп., А. Савчук, д-р биол. наук
Київського національного університету ім. Тараса Шевченка, Київ, Україна,
И. Андрійченко, студ.
ООО "Фармацевтический завод "Биофарма", Киев, Украина

СОДЕРЖАНИЕ МЕТАЛОМАТРИЧНЫХ ПРОТЕИНАЗ В ОПУХОЛЯХ ПРИ РАКЕ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ

Рак мочевого пузыря (РМП) является девятым по частоте онкологическим заболеванием, с наибольшим показателем количества больных в развитых странах. Заболевание чаще диагностируют у мужчин – около 75 %. Способность к инвазии окружающих тканей и метастазированию в отдельные органы является одним из фундаментальных свойств злокачественных опухолей. Согласно современным представлениям о механизмах метастазирования, для инвазивного роста клеткам опухоли необходимо преодолеть барьеры, которые представляют собой базальные мембраны, внеклеточный матрикс и тканевые структуры. Почти все компоненты внеклеточного матрикса могут быть разрушены с помощью металломатричных протеиназ (ММП), более того, субстратами ММП могут быть прекурсоры факторов роста и молекулы адгезии на поверхности клеток. ММП также участвуют в эпителиально-мезенхимальном преобразовании, чем и обеспечивается метастазирование. Предыдущие исследования других авторов указывают на увеличение биосинтеза различных ММП в очаге опухолей и в метастазах. Такие изменения ассоциированы со степенью дифференцировки опухоли, глубиной инвазии, а также их связывают с плохим дальнейшим прогнозом и низкой выживаемостью больных с различными онкологическими заболеваниями. Целью нашей работы было исследовать содержание ММП-1, 2, 3, 8 и ТИМП-1 в опухолях и стенках здорового мочевого пузыря у больных на РМП в зависимости от стадии по TNM классификации. Нами исследовано увеличение содержания ММП-1, 2, 3, 8 и ТИМП-1 в образцах здоровых стенок мочевого пузыря для 3-й и 4-й стадии РМП, что указывает на участие исследуемых показателей на рост и инвазию опухолей мочевого пузыря. Результаты нашего исследования согласуются с результатами предыдущих исследований, проведенных при изучении других новообразований, которые указывают на взаимосвязь исследуемых показателей с развитием онкологических заболеваний.

Ключевые слова: рак мочевого пузыря, ММП, ТИМП, иммуноферментный анализ.

V. Dmytryk, Ph.D stud., O. Savchuk, Dr.Sc.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine,
I. Andriychenko,
"Biopharma" Limited, Kyiv, Ukraine

THE CONTENT OF MATRIX METALLOPROTEINASES IN BLADDER CANCER TUMORS

Bladder cancer (BC) is the 9th in frequency oncologic disease, with the highest number of patients in developed countries. The disease is more commonly diagnosed in men – about 75%. The ability to invade surrounding tissues and metastasis to individual organs is one of the fundamental properties of malignant tumors. According to modern ideas about mechanisms of metastasis, basement membranes and extracellular matrix are the main barriers, and tissue structures are needed to overcome the invasive growth of tumor cells. Almost all of the extracellular matrix components can be destroyed by the use of metal-matrix proteinases (MMP), moreover, the precursors of growth factors and adhesion molecules on the cell surface may be the MMP substrates. MMPs also participate in epithelial-mesenchymal transformation, which provides metastasis. Previous studies by other authors point to an increase in the biosynthesis of various MMPs in the outbreak of tumors and in metastases, such changes associated with the degree of differentiation of the tumor, the depth of the invasion, as well as their association with poor further prognosis and low survival rates in patients with various cancers. The purpose of our work was to investigate the content of MMP-1, 2, 3, 8 and TIMP-1 in the tumors and walls of the healthy bladder in patients with BC, depending on the stage of TNM classification. We investigated the increase in the content of MMP-1, 2, 3, 8 and TIMP-1 in samples of healthy bladder walls for stage 3 and 4 of the BC, indicating the participation of the investigated parameters in the growth and invasion of bladder tumors. The results of our study are consistent with the results of previous studies conducted in the study of other neoplasms, which indicate the relationship between the studied parameters with the development of cancer.

Key words: bladder cancer, MMP, TIMP, ELISA.

УДК 616.72-002: 577.122.8

А. Вовк, асп.,
О. Короткий, канд. біол. наук,
Л. Кот, канд. біол. наук,
К. Дворченко, д-р біол. наук

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

ОКИСНА МОДИФІКАЦІЯ БІЛКІВ У СИРОВАТЦІ КРОВІ ЩУРІВ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОСТЕОАРТРОЗУ ТА ТРИВАЛОГО ВВЕДЕННЯ МУЛЬТИПРОБІОТИКА

Метою роботи було дослідити мультипробіотик на вміст продуктів окисної модифікації білків та рівень сульфгидрильних груп у сироватці крові щурів за умов моноіодацетат-індукованого остеоартрозу.

Дослідження проведені на білих нелінійних статевозрілих щурах-самцях масою 180–240 г із дотриманням загальних етичних принципів експериментів на тваринах. Усіх тварин розділяли на чотири експериментальні групи. Перша група – контроль: тваринам у перший день вводили в колінну зв'язку 0,0 мл 0,9-відсоткового розчину NaCl та щоденно протягом 14-ти діб із 8-ої до 22-ої доби вводили пергастрально 1 мл питної води в перерахунок на 1 кг маси тіла тварини. Друга група – мультипробіотик: тваринам у перший день вводили в колінну зв'язку 0,05 мл 0,9-відсоткового розчину NaCl та щоденно протягом 14-ти діб, із 8-ої по 22-гу добу вводили пергастрально мультипробіотик "Симбітер®" ("Пролісок", Україна) у дозі 140 мг/кг, розведений в 1 мл питної води на 1 кг маси тварини. Третя група – модель остеоартрозу: щурам у перший день вводили в колінну зв'язку 1 мг моноіодацетату натрію, розчиненого у 0,05 мл 0,9-відсоткового розчину NaCl та щоденно протягом 14-ти діб вводили пергастрально 1 мл питної води в перерахунок на 1 кг маси тварини. Четверта група – остеоартроз+мультипробіотик: тваринам вводили в перший день у колінну зв'язку 1 мг моноіодацетату натрію, розчиненого у 0,05 мл 0,9-відсоткового розчину NaCl, та пергастрально мультипробіотик у дозі 140 мг/кг, розведений в 1 мл питної води на 1 кг маси тварини. Тварин умертвляли на 30 добу після початку експерименту згідно з протоколом етичного комітету, після чого швидко робили забір крові. Уміст продуктів окисної модифікації білків (ОМБ) та олігопептидів визначали за рівнем карбонільних похідних, які виявляються в реакції із 2,4-динітрофенілгідрразином. Рівень загальних, білокзв'язаних та небілкових сульфгидрильних (SH)-груп вимірювали за методом Елмана.

Установлено, що при моноіодацетат-індукованому остеоартрозі у сироватці крові щурів зростає вміст продуктів окисної модифікації білків та знижується вміст сульфгидрильних груп. Показано, що при тривалому введенні мультипробіотика тваринам із моноіодацетат-індукованого остеоартрозу вищезазначені показники відновлювались.

Ключові слова: моноіодацетат-індукований остеоартроз, мультипробіотик, окисна модифікація білків, сироватка крові.

Вступ. Провідне місце серед захворювань займають патології опорно-рухової системи, серед яких найбільш розповсюдженими є хвороби суглобів, які призводять до деградації хрящової тканини та розвитку за-

палення. Наслідком цих змін є системні ускладнення, прогресуюча інвалідність, що в цілому спричинює високі соціально-економічні витрати [1].

Захворювання суглобів, зокрема остеоартрози та остеоартрити, мають поліетіологічну природу. Їхнє виникнення та розвиток може відбуватись унаслідок інфекційних захворювань, надмірних фізичних навантажень, метаболічних порушень, генетичних факторів, автоімунних процесів, хронічного стресу тощо [2].

Дослідження останніх років показали, що ключовим елементом у виникненні та розвитку багатьох захворювань (ожиріння, діабет, артрит тощо) є порушення мікробіому мікробіоми організму. Крім того, ученими було показано, що при використанні пробіотиків спостерігається зниження вияву симптомів захворювань [3]. Таким чином, склад, структура та функціональні можливості кишкової мікробіоти прямо пов'язані із виникненням та розвитком багатьох захворювань. Тому актуальним є проведення досліджень у даному напрямі для встановлення зв'язків і шляхів бактеріальних взаємодій із системами організму хазяїна за різних патологічних станів.

Аналітичний огляд літератури та отримані нами результати свідчать, що мультипробіотичний препарат "Симбітер[®]" здатен підтримувати й відновлювати нормобіоз шлунково-кишкового тракту (ШКТ) на різних експериментальних моделях [4, 5]. Здатність мультипробіотика ліквідувати колонізацію ШКТ умовно-патогенною мікрофлорою запобігає утворенню джерел запалення. Відповідно цікавим є дослідження дії цього пробіотика на розвиток остеоартрозу, формування якого безпосередньо пов'язано із запаленням.

Метою нашої роботи було дослідити дію мультипробіотика на вміст продуктів окисної модифікації білків та рівень сульфгідрильних груп у сироватці крові щурів за умов моноіодацетат-індукованого остеоартрозу.

Об'єкт та методи досліджень. Усіх тварин розділяли на чотири експериментальні групи. Перша група – контроль: тваринам у перший день вводили в колінну зв'язку 0,05 мл 0,9 % розчину NaCl та щоденно протягом 14 днів із 8-ої до 22-гої доби вводили пергастрально 1 мл питної води в перерахунку на 1 кг маси тіла тварини. Друга група – мультипробіотик: тваринам у перший день вводили в колінну зв'язку 0,05 мл 0,9 % розчину NaCl та щоденно протягом 14-ти днів із 8-ої до 22-гої доби вводили пергастрально мультипробіотик "Симбітер[®]" ("Пролісок", Україна) у дозі 140 мг/кг, розведений в 1 мл питної води на 1 кг маси тварини. Третя група – модель остеоартрозу: щурам у перший день вводили в колінну зв'язку 1 мг моноіодацетату натрію (МІА), розчиненого у 0,05 мл 0,9% розчину NaCl [6] та щоденно протягом 14 днів вводили пергастрально 1 мл питної води в перерахунку на 1 кг маси тварини. Четверта група – остеоартроз+мультипробіотик: тваринам вводили в перший день у колінну зв'язку 1 мг моноіодацетату натрію, розчиненого у 0,05 мл 0,9 % розчину NaCl та пергастрально мультипробіотик у дозі 140 мг/кг, розведений в 1 мл питної води на 1 кг маси тварини. Тварин умертвляли на 30 добу після початку експерименту згідно з протоколом етичного комітету, після чого швидко робили забір крові. Кров інкубували в термостаті за температури 37° С протягом 30 хв, після чого центрифугували 1000 г протягом 15 хв. Сироватку відбирали у пластикові мікропробірки та зберігали при -71° С не більше трьох місяців до початку подальших досліджень. Загальна кількість тварин, залучених до експериментальних досліджень, становила 20 особин.

Уміст продуктів окисної модифікації білків (ОМБ) та олігопептидів визначали за рівнем карбонільних похідних, які виявляються в реакції із 2,4-динітрофенілгідразином [7]. Рівень загальних, білокзв'язаних та небілкових сульфгідрильних (SH)-груп вимірювали за методом Елмана [8]. Статистичну обробку результатів дослідження проводили загальноприйнятими методами варіаційної статистики.

Результати та їх обговорення. Надмірне утворення різних активних форм окислювачів сприяє розвитку окисного стресу, що призводить до значних біологічних наслідків. В останні роки з'явилися докази того, що окисний стрес відіграє вирішальну роль у розвитку та збереженні запалення і, таким чином, сприяє патофізіології багатьох захворювань, включаючи хвороби суглобів. Зокрема, при розвитку та прогресуванні запалення у суглобах розвивається оксидативний стрес, який виникає внаслідок постійної генерації вільних радикалів активованими фагоцитами та за рахунок гіпоксичних процесів при роботі суглобів, що призводить до пошкодження всіх структурних елементів суглобу (хрящової, кісткової, присуглобової тканини, синовіальної рідини). Крім того, при надмірному утворенні вільних радикалів спостерігається виснаження антиоксидантної системи, що додатково сприяє інтенсифікації вільнорадикальних процесів [9, 10].

Білки є основними мішенями для радикалів та двох електронних окислювачів у біологічних системах [11–12]. Вільні радикали атакують білки по всій довжині поліпептидного ланцюга, порушуючи не тільки первинну, але і вторинну та третинну їх структуру, що призводить до агрегації або фрагментації білкової молекули. Інтенсивність окисної модифікації білків визначається особливостями їх амінокислотного складу. Акцепторними групами, що здатні перехоплювати електрони, взаємодіючи з активними формами кисню та утворювати аніон-радикали, можуть бути дисульфідні, сульфгідрильні, карбонільні, карбоксильні та аміногрупи білків. Модифікація білків може призвести до підвищення гідрофільності бічного ланцюга, фрагментації бічного та основного ланцюга, агрегації за рахунок ковалентних поперечних зв'язків або гідрофобних взаємодій, розгортанню білка та зміни конформації, зміненим взаємодіям з біологічними партнерами та зміненому оберту. Утворення й накопичення таких модифікованих білків порушує їхнє функціонування, що призводить до розвитку різних патологічних станів та формуванню захворювань [13].

У ході проведених експериментальних досліджень встановлено, що у щурів при моноіодацетат-індукованому остеоартрозі у сироватці крові вміст продуктів окисної модифікації білків зростає (табл. 1). Зокрема, збільшується рівень нейтральних альдегідних продуктів (макс. абсорбції при 356 нм) – у 2,4 рази та нейтральних кетонних продуктів ($E_{max} = 370$ нм) відповідно – у 2,2 рази порівняно з контролем. За тих самих умов експерименту в сироватці крові кількість основних альдегідних продуктів (максимум поглинання при 430 нм) збільшується в 1,6 рази стосовно контрольної групи тварин, при цьому вміст основних кетонних продуктів ($E_{max} = 530$ нм) зростає в 1,5 рази порівняно з показниками контрольної групи тварин (табл. 1).

Таблиця 1. Уміст продуктів окисної модифікації білків у сироватці крові щурів за умов остеоартрозу та введення мультипробіотика, ум. од. × мг білка⁻¹ (M ± m, n = 5)

Групи тварин	Показник	Продукти нейтрального характеру		Продукти основного характеру	
		356 нм, альдопохідні	370 нм, кетопохідні	430 нм, альдопохідні	530 нм, кетопохідні
Контроль		0,138 ± 0,012	0,102 ± 0,009	0,079 ± 0,008	0,038 ± 0,003
Мультипробіотик		0,132 ± 0,013	0,108 ± 0,011	0,075 ± 0,007	0,035 ± 0,004
Остеоартроз		0,329 ± 0,031*	0,235 ± 0,019*	0,129 ± 0,011*	0,057 ± 0,005
Остеоартроз + мультипробіотик		0,215 ± 0,019#*	0,143 ± 0,012#*	0,095 ± 0,009#	0,042 ± 0,004#

* – p < 0,05 стосовно контролю; # – p < 0,05 щодо групи тварин із остеоартрозом

За тривалого введення мультипробіотика тваринам із експериментальним остеоартрозом у сироватці крові спостерігається зниження ступеня окиснення білкових молекул (табл. 1). Установлено зниження вмісту нейтральних альдегідних продуктів – в 1,5 рази, нейтральних кетонних продуктів – в 1,6 рази, основних альдегідних та кетонних продуктів – в 1,4 рази стосовно групи тварин із моделлю остеоартрозу (табл. 1).

Виявлено, що введення щурам мультипробіотика не впливає на вміст продуктів окисної модифікації білків у сироватці крові контрольної групи щурів (табл. 1).

Рівень білкової модифікації оцінюють за ступенем окиснення сульфгідрильних груп білків. Сульфгідрильні групи входять до складу як високомолекулярних білків (білокзв'язані SH-групи), так і низькомолекулярних пептидів (небілкові SH-групи), переважно у складі цистеїно-

вих залишків. Процеси окисної модифікації білків можуть відбуватись як прямим, так і ферментативним шляхом за участі ферменту глутатіонпероксидази та гідроперекисей ліпідів [14–15]. У першу чергу, окисненню піддаються саме сульфгідрильні групи білків, що оберігає від окиснення інші функціональні групи та молекули.

Виявлено, що у щурів при моноіодацетат-індукованому остеоартрозі у сироватці крові вміст сульфгідрильних груп знижується: небілкових SH-груп – в 1,4 рази, білкових та загальних SH-груп – в 1,7 рази щодо контролю (табл. 2). Установлене зниження вмісту сульфгідрильних груп у сироватці крові щурів за умов експериментального остеоартрозу свідчить про накопичення ковалентних зв'язків за участі цистеїну та метіоніну, а також про окисненні SH-груп.

Таблиця 2. Уміст сульфгідрильних (SH-) груп у сироватці крові щурів за умов остеоартрозу та введення мультипробіотика, мкмоль × мг білка⁻¹ (M ± m, n = 5)

Групи тварин	Показник	небілкові SH-групи	білкові SH-групи	загальні SH-групи
Контроль		0,23 ± 0,02	4,26 ± 0,41	4,49 ± 0,43
Мультипробіотик		0,29 ± 0,03*	4,19 ± 0,38	4,48 ± 0,42
Остеоартроз		0,16 ± 0,01*	2,48 ± 0,22*	2,64 ± 0,23*
Остеоартроз + мультипробіотик		0,21 ± 0,02#	3,31 ± 0,29#	3,52 ± 0,34#

* – p < 0,05 стосовно контролю; # – p < 0,05 щодо групи тварин із остеоартрозом

За тривалого введення мультипробіотика тваринам із експериментальним остеоартрозом у сироватці крові спостерігається часткове відновлення рівня сульфгідрильних груп: зростає вміст небілкових, білкових та загальних SH-груп – в 1,3 рази щодо групи щурів із патологією (табл. 2).

Виявлено, що введення щурам мультипробіотика призводить до зростання у сироватці крові вмісту небілкових сульфгідрильних груп в 1,3 рази порівняно з даним показником контрольної групи тварин (табл. 2).

Згідно з отриманими нами результатами встановлено, що при моноіодацетат-індукованому остеоартрозі у сироватці крові щурів активуються вільнорадикальні процеси. Оскільки білки є високочутливими до вільнорадикального окиснення, тому рівень їх окиснення відображає про-антиоксидантний баланс в організмі. Відповідно виявлене нами зростання вмісту продуктів окисної модифікації білків може призвести до цілої низки негативних наслідків: порушення структурної організації білків, зміни заряду білкової молекули, трансформації чутливості до протеолізу, що може призвести до порушення або втрати функціональної активності білкових молекул (структурної, каталітичної, регуляторної, транспортної, сигнальної, рецепторної тощо). Крім того, утворений пул модифікованих білків робить їх більш чутливими до протеолізу, що сприяє подальшій інтенсифікації деструктивних процесів. Окиснені білки здатні виступати як джерела вільних радикалів, виснажувати запаси клітинних анти-

оксидантів (глутатіон, аскорбінова кислота). У молекулярних механізмах вільнорадикальних процесів окиснення білків може спричинити деструкцію інших молекул (ліпіди, ДНК), що сприятиме прогресуванню патологічних станів та розвитку захворювань [16–17].

Виявлене зниження утворення окиснених білкових молекул у сироватці крові за тривалого введення мультипробіотика щурам при експериментальному остеоартрозі пов'язано із широким спектром біологічної активності досліджуваного препарату. Механізм дії мультипробіотика "Симбітер[®]" базується на його здатності ефективно ліквідувати мікроекологічні порушення та зменшувати запальні процеси на локальному й системному рівнях організму. Крім того, бактеріальні штами у складі мультипробіотика "Симбітер[®]" є активними продуцентами фізіологічно активних метаболітів: вітамінів, коротколанцюгових жирних кислот, антиоксидантів та імуномодуляторів, що розширює спектр біологічної активності даного препарату [4–5, 18, 19].

Висновки. Установлено, що при моноіодацетат-індукованому остеоартрозі у сироватці крові щурів зростає рівень окисно-модифікованих білків та знижується вміст сульфгідрильних груп, що свідчить про загальний зсув окисно-антиоксидантного балансу крові у прооксидантний бік. Тривале введення мультипробіотика щурам із експериментальною моделлю остеоартрозу призводить до часткового зниження вмісту продуктів окиснення білкових молекул у сироватці крові.

Список використаних джерел:

- O'Neill T. W. Update on the epidemiology, risk factors and disease outcomes of osteoarthritis / T. W. O'Neill, P. S. McCabe, J. McBeth // Best Pract Res Clin Rheumatol. – 2018 Apr; 32(2):312-326. doi: 10.1016/j.berh.2018.10.007.
- Hunter D.J. Osteoarthritis / D. J. Hunter, S. Bierma-Zeinstra // Lancet. – 2019 Apr; 27; 393(10182):1745-1759. doi: 10.1016/S0140-6736(19)30417-9.
- Vitetta L. The gastrointestinal microbiome and musculoskeletal diseases: a beneficial role for probiotics and prebiotics / L. Vitetta, S. Coulson, A. W. Linnane and others // Pathogens. 2013. Nov 14; 2(4): 606-26. doi: 10.3390/pathogens2040606.
- Baragi V. M. A new class of potent matrix metalloproteinase 13 inhibitors for potential treatment of osteoarthritis: Evidence of histologic and clinical efficacy without musculoskeletal toxicity in rat models / V. M. Baragi, G. Becher, A. M. Bendele and others // Arthritis. Rheum. – 2009. – Vol. 60(7). – P. 2008–2018.
- Дубинина Е. Е. Окислительные модификации белков сыворотки крови человека, метод ее определения / Е. Е. Дубинина, С. О. Бурмистров, Д. А. Ходов и др. // Вопросы медицинской химии. – 1995. – № 1. – С. 24–26. Available from: <http://pbmc.ibmc.msk.ru/index.php/ru/article/PBMC-1995-41-1-24-ru>.
- Ellman G. Tissue sulfhydryl groups / G. Ellman // Arch. Biochem. Biophys. – 1959. – Vol. 82, №1. – P. 70–77. Available from: <http://aufsi.auburn.edu/recommendedmethods/01B06.pdf>.
- Lugrin J. The role of oxidative stress during inflammatory processes / J. Lugrin, N. Rosenblatt-Velin, R. Parapanov and others // Biol Chem. – 2014 Feb; 395(2):203-30. doi: 10.1515/hsz-2013-0241.
- Drevet S. Reactive oxygen species and NADPH oxidase 4 involvement in osteoarthritis / S. Drevet, G. Gavazzi, L. Grange and others // Exp. Gerontol. – 2018. – Vol. 111. – P. 107–117. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
- Dahl J. U. Protein quality control under oxidative stress conditions / J. U. Dahl, M. J. Gray, U. Jakob // J. Mol. Biol. – 2015. – Vol. 427, № 7. – P. 1549–1563. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Pajares M. Redox control of protein degradation / M. Pajares, N. Jiménez-Moreno, I. H. Dias and others // Redox. Biol. – 2015. – Vol. 6. – P. 409-420. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
- Breusing N. Biomarkers of protein oxidation from a chemical, biological and medical point of view / N. Breusing, T. Grune // Exp. Gerontol. – 2010. – Vol. 45, № 10. – P. 733–737. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
- Vázquez-Torres A. Redox active thiol sensors of oxidative and nitrosative stress / A. Vázquez-Torres // Antioxid. Redox. Signal. – 2012. – Vol. 17, № 9. – P. 1201–1214. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
- Meyer A. Glutathione homeostasis and redox-regulation by sulfhydryl groups / A. Meyer, R. Hell // Photosynth. Res. – 2005. – Vol. 86. – P. 435–457. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
- Davies M.J. Protein oxidation and peroxidation / M. J. Davies // Biochem. J. – 2016 Apr 1; 473 (Pt 7): 805–825. doi: 10.1042/BJ20151227.
- Domingues R. M. Lipoxidation adducts with peptides and proteins: deleterious modifications or signaling mechanisms? / R. M. Domingues, P. Domingues, T. Melo and others // J. Proteomics. – 2013. – Vol. 92. – P. 110–131. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- Дворченко К. О. Влияние окислительного стресса на уровень экспресии генов *TGF-β* и *HGF* у печенки шурив в умовах тривалої шлункової гіпохлоридії та за введення мультипробиотику Симбітер / К. О. Дворченко та ін. // Укр. біохім. журн. – 2013. – Т. 85, № 5. – С. 114–123.
- Azad M. A.K. Immunomodulatory effects of probiotics on cytokine profiles / M. A. K. Azad, M. Sarker, D. Wan // Biomed. Res. Int. – 2018: 8063647. doi: 10.1155/2018/8063647.
- Lutgendorff F. Probiotics prevent intestinal barrier dysfunction in acute pancreatitis in rats via induction of ileal mucosal glutathione biosynthesis / F. Lutgendorff and others // PLoS ONE. – 2009. – Vol. 4, № 2. – P. e4512.

Reference (Scopus):

- O'Neill T. W., McCabe P. S., McBeth J. Update on the epidemiology, risk factors and disease outcomes of osteoarthritis // Best Pract Res Clin Rheumatol. 2018 Apr; 32(2):312-326. doi: 10.1016/j.berh.2018.10.007.
- Hunter D.J., Bierma-Zeinstra S. Osteoarthritis // Lancet. 2019 Apr 27;393(10182):1745-1759. doi: 10.1016/S0140-6736(19)30417-9.
- Vitetta L., Coulson S., Linnane A.W., Butt H. The gastrointestinal microbiome and musculoskeletal diseases: a beneficial role for probiotics and prebiotics // Pathogens. 2013 Nov 14;2(4):606-26. doi: 10.3390/pathogens2040606.
- Baragi V.M., Becher G., Bendele A.M., et al. A new class of potent matrix metalloproteinase 13 inhibitors for potential treatment of osteoarthritis: Evidence of histologic and clinical efficacy without musculoskeletal toxicity in rat models // Arthritis. Rheum. – 2009. – Vol. 60(7). – P. 2008-2018.
- Dubinina E. E., Burmistrov S.O., Hodov D.A., Porotov I.G. Okislitelnyye modifikatsii belkov syvorotki krovi cheloveka, metod ee opredeleniya // Voprosy meditsinskoy khimii. – 1995. – № 1. – С. 24–26. Available from: <http://pbmc.ibmc.msk.ru/index.php/ru/article/PBMC-1995-41-1-24-ru>
- Ellman G. Tissue sulfhydryl groups / G. Ellman // Arch. Biochem. Biophys. – 1959. – Vol. 82, №1. – P. 70–77. Available from: <http://aufsi.auburn.edu/recommendedmethods/01B06.pdf/>
- Lugrin J., Rosenblatt-Velin N., Parapanov R., Liaudet L. The role of oxidative stress during inflammatory processes // Biol Chem. 2014 Feb; 395(2): 203-30. doi: 10.1515/hsz-2013-0241.
- Drevet S., Gavazzi G., Grange L. et al. Reactive oxygen species and NADPH oxidase 4 involvement in osteoarthritis // Exp. Gerontol. – 2018. – Vol. 111. – P. 107-117. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- Dahl J.U., Gray M.J., Jakob U. Protein quality control under oxidative stress conditions // J. Mol. Biol. 2015. – Vol. 427, №7. – P. 1549-1563. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- Pajares M., Jiménez-Moreno N., Dias I.H. et al. Redox control of protein degradation // Redox. Biol. – 2015. – Vol. 6. – P. 409-420. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Breusing N., Grune T. Biomarkers of protein oxidation from a chemical, biological and medical point of view // Exp. Gerontol. – 2010. – Vol. 45, № 10. – P. 733–737. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Vázquez-Torres A. Redox active thiol sensors of oxidative and nitrosative stress // Antioxid. Redox. Signal. – 2012. – Vol. 17, № 9. – P. 1201–1214. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
- Meyer A. Glutathione homeostasis and redox-regulation by sulfhydryl groups / A. Meyer, R. Hell // Photosynth. Res. – 2005. – Vol. 86. – P. 435–457. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
- Davies M. J. Protein oxidation and peroxidation // Biochem. J. 2016 Apr 1; 473(Pt 7): 805–825. doi: 10.1042/BJ20151227.
- Domingues R. M., Domingues P., Melo T. et al. Lipoxidation adducts with peptides and proteins: deleterious modifications or signaling mechanisms? // J. Proteomics. – 2013. – Vol. 92. – P. 110-131. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
- Vplyv oksydnogo stresu na riven ekspresii henuv TGF-β i HGF u pechintsi shchuriv v umovakh trivaloi shlunkovoi hipokhlordidii ta za vvedennia multyprobiotyka Cymbiter / K. O. Dvorschenko [et al.] // Ukr. biokhim. zhurn. – 2013. – T. 85, № 5. – С. 114–123.
- Azad M.A.K., Sarker M., Wan D. Immunomodulatory effects of probiotics on cytokine profiles // Biomed. Res. Int. – 2018:8063647. doi: 10.1155/2018/8063647.
- Probiotics prevent intestinal barrier dysfunction in acute pancreatitis in rats via induction of ileal mucosal glutathione biosynthesis / F. Lutgendorff [et al.] // PLoS ONE. – 2009. – Vol. 4, № 2. – P. e4512.

Надійшла до редколегії 06.03.2019

Отримано виправлений варіант 08.04.2019

Підписано до друку 08.04.2019

Received in the editorial 06.03.2019

Received a revised version on 08.04.2019

Signed in the press on 08.04.2019

A. Vovk, asp., A. Korotkiy, kand. biol. nauk, L. Kot, kand. biol. nauk, K. Dvorschenko, d-r biol. nauk
 Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

ОКИСЛИТЕЛЬНАЯ МОДИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ КРЫС В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОСТЕОАРТРОЗА И ДЛИТЕЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ МУЛЬТИПРОБИОТИКА

Целью работы было исследовать действие мультипробиотику на содержание продуктов окислительной модификации белков и уровень сульфидрильных групп в сыворотке крови крыс при моноиодацетат-индуцированном остеоартрозе.

Исследования проведены на белых нелинейных половозрелых крысах-самцах массой 180–240 г с соблюдением общих этических принципов экспериментов на животных. Всех животных разделяли на четыре экспериментальные группы. Первая группа – контроль: животным в первый день вводили в колленную связку 0,05 мл 0,9-процентного раствора NaCl и ежедневно на протяжении 14-ти суток с 8-го по 22-й день вводили пергастрально 1 мл питьевой воды в пересчете на 1 кг массы тела животного. Вторая группа – мультипробиотик: животным в первый день вводили в колленную связку 0,05 мл 0,9-процентного раствора NaCl и ежедневно на протяжении 14-ти суток с 8-го по 22-й день вводили пергастрально мультипробиотик "СимбітерSM" ("Пролисок", Украина) в дозе 140 мг/кг, разведенный в 1 мл питьевой воды на 1 кг массы животного. Третья группа – модель остеоартроза: крысам в первый день вводили в колленную связку 1 мг моноиодацетата натрия, разведенного в 0,05 мл 0,9-процентного раствора NaCl и ежедневно на протяжении 14-ти суток вводили пергастрально 1 мл питьевой воды в пересчете на 1 кг массы животного. Четвертая группа – остеоартроз + мультипробиотик: животным в первый день вводили в колленную связку 1 мг моноиодацетата натрия, разведенного в 0,05 мл 0,9-процентного раствора NaCl и пергастрально мультипробиотик в дозе 140 мг/кг, разведенный в 1 мл питьевой воды на 1 кг массы животного. Животных умерт-

ляли на 30 сутки после начала эксперимента согласно протокола этического комитета, после чего быстро делали забор крови. Содержание продуктов окислительной модификации белков (ОМБ) и олигопептидов определяли по уровню карбонильных производных, которые проявляются в реакции с 2,4-динитрофенилгидразином. Уровень общих, белок-связанных и небелковых сульфгидрильных (SH)-групп измеряли по методу Элмана.

Установлено, что при моноиодацетат-индуцированном остеоартрозе в сыворотке крови возрастает содержание продуктов окислительной модификации белков и снижается содержание сульфгидрильных групп. Показано, что при длительном введении мультипробиотика животным с моноиодацетат-индуцированным остеоартрозом вышеуказанные показатели восстанавливались.

Ключевые слова: моноиодацетат-индуцированный остеоартроз, мультипробиотик, окислительная модификация белков, сыворотка крови.

A. Vovk Ph. D stud., O. Korotkyi Ph. D., L. Kot Ph. D., K. Dvorshchenko Dr. Sc.
Taras Shevchenko National University, Kiev, Ukraine

OXIDATIVE MODIFICATION OF PROTEINS IN RAT SERUM UNDER EXPERIMENTAL OSTEOARTHRISIS AND LONG-TERM ADMINISTRATION OF MULTIPROBIOTIC

The aim of the study was to investigate the effect of multiprobiotics on the content of products of oxidative modification of proteins and the level of sulfhydryl groups in blood serum of rats during monoiodoacetate-induced osteoarthritis.

The study was carried out on white non-linear, sexually mature male rats (weight 180-240 g), according to general ethical principles of experiments on animals. All animals were divided into four experimental groups. The first group - Control: animals got injection into knee ligament 0.05 ml of 0.9% NaCl solution on the first day of the experiment and then got intragastric administration 1 ml of drinking water per 1 kg of the animal weight daily for 14 days from the 8th to 22nd days. The second group – Multiprobiotic: animals got injection into knee ligament 0.05 ml of 0.9% NaCl solution on the first day of the experiment and then got intragastric administration 140 mg/kg of multiprobiotic Symbiter® (Prolisok™, Ukraine) diluted in 1 ml of drinking water per 1 kg of animal weight. The third group, MIA-induced OA: animals got injection into knee ligament 1 mg of sodium monoiodoacetate, dissolved in 0.05 ml of 0.9% NaCl on the first day of the experiment and then got intragastric administration 1 ml of drinking water per 1 kg of the animal weight daily for 14 days from the 8th to 22nd days. The fourth group – MIA-induced OA + Multiprobiotic: animals got injection into knee ligament 0.05 ml of 1 mg of sodium monoiodoacetate, dissolved in 0.05 ml of 0.9% NaCl on the first day of the experiment and then got intragastric administration 140 mg/kg of multiprobiotic diluted in 1 ml of drinking water per 1 kg of animal weight. All animals were killed on day 30 of the experiment, according to the protocol of the ethics committee with rapid blood sampling. The content of the products of oxidative modification of proteins (OMP) and oligopeptides was determined by the level of carbonyl derivatives that were detected in reaction with 2,4-dinitrophenylhydrazine. The level of total, protein-bound and non-protein sulfhydryl (SH) -groups was measured by the Elman method.

It has been established that MIA-induced OA disturbed oxidative-antioxidant balance of the rat serum: the content of the products of oxidative modification of proteins increases and the content of sulfhydryl groups decreases in the serum. It was shown that with the long-term administration of multiprobiotics in animals with MIA-induced OA, the above indicators were restored.

Key words: monoiodoacetate-induced osteoarthritis, multiprobiotic, oxidative modification of proteins, blood serum.

Наукове видання



ВІСНИК

КИЇВСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОГО УНІВЕРСИТЕТУ ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

**ПРОБЛЕМИ РЕГУЛЯЦІЇ
ФІЗІОЛОГІЧНИХ ФУНКЦІЙ**

Випуск 1(26)

Оригінал-макет виготовлено Видавничо-поліграфічним центром "Київський університет"

Автори опублікованих матеріалів несуть повну відповідальність за підбір, точність наведених фактів, цитат, статистичних даних, відповідної галузевої термінології, імен власних та інших відомостей. Редколегія залишає за собою право скорочувати та редагувати подані матеріали.



Формат 60x84^{1/8}. Ум. друк. арк. 6,5. Наклад 300. Зам. № 218-9008.
Гарнітура Arial. Папір офсетний. Друк офсетний. Вид. № Б5.
Підписано до друку 29.11.18

Видавець і виготовлювач
Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет"
01601, Київ, б-р Т. Шевченка, 14, кімн. 43
☎ (38044) 239 3222; (38044) 239 3172; тел./факс (38044) 239 3128
e-mail: vpc_div.chief@univ.net.ua; redaktor@univ.net.ua
http: vpc.univ.kiev.ua

Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 1103 від 31.10.02