

18. Hofmann A. F. Bile acids: chemistry, pathochemistry, biology, pathobiology, and therapeutics / A. F. Hofmann, L. R. Hagey // *Cell Mol Life Sci.* – 2008. – Vol. 65 (16). – P. 2461–2483.
19. Haouzi P. Cardiogenic shock induced reduction in cellular O₂ delivery as a hallmark of acute H₂S intoxication / P. Haouzi, T. Sonobe // *Clinical toxicology (Philadelphia, Pa.)*. – 2015. – Vol. 53(4). – P. 416–417.
20. Abou-Hamdan A. Oxidation of H₂S in mammalian cells and mitochondria / A. Abou-Hamdan, H. Guedouari-Bounihi, V. Lenoir [et all.] // *Methods Enzymol.* – 2015. – Vol. 554. – P. 201–208.
21. Van Eldere J. Tauroconjugation of cholic acid stimulates 7 alpha-dehydroxylation by fecal bacteria / J. Van Eldere, P. Celis, G. De Pauw [et all.] // *Appl Environ Microbiol.* – 1996. – Vol. 62(2). – P. 656–661.

Левадянская Юлия, Решетник Евдокия, Весельский Станислав, Янчук Петр. Желчекислотный спектр желчи самцов крыс при воздействии L-цистеина. В острых опытах на лабораторных крысах-самцах показано, что при внутриортальном введении L-цистеина в дозе 20 мг/кг уменьшалось содержание гликоконъюгатов и свободных желчных кислот в желчи. При этом концентрация тауроконъюгатов в желчи крыс увеличивалась. На основании полученных результатов предполагается, что экзогенное поступление аминокислоты в организм животных создало условия для более эффективного синтеза таурина и, соответственно, его вовлечение в процесс конъюгации с желчными кислотами. Однако понижение концентраций остальных фракций холатов может свидетельствовать о H₂S-опосредованном угнетающем эффекте L-цистеина на кислородзависимые процессы при синтезе и транслокации отдельных фракций желчных кислот через мембраны гепатоцитов.

Ключевые слова: L-цистеин, тауроконъюгированные желчные кислоты, желчь, печень, сероводород.

Levadianska Yliya, Reshetnik Evdokiya, Veselsky Stanislav, Yanchuk Petro. Spectrum of Bile Acids in the Bile of Male rats After the Administration of L-cysteine. In acute experiments on laboratory male rats it was shown that after intraportal administration of L-cysteine in a dose of 20 mg per kg, the content of glycoconjugated bile acids and free bile acids in bile decreased. But the concentration of tauroconjugated bile acids in rat's bile increased. Based on the obtained results, it is assumed that the exogenous intake of the amino acid has created the conditions for more efficient synthesis of taurine and, accordingly, its involvement in the process of conjugation with bile acids. However, a drop in the concentrations of other fractions of the cholates may indicate an H₂S-mediated inhibitory effect of L-cysteine on oxygen-dependent processes such as the synthesis of bile acids and their conjugation with glycine.

Key words: L-cysteine, tauroconjugated bile acids, bile, liver, hydrogen sulphide.

Стаття надійшла до редколегії
28.03.2017 р.

УДК 537.8

Олександр Цибулін

Використання моделі раннього ембріонального розвитку перепела японського (*coturnix coturnix japonica*) для оцінки біологічної активності мікрохвильового випромінювання

У роботі на моделі перепелиного ембріона продемонстровано високу чутливість моделі раннього ембріогенезу перепелів до низькоінтенсивного мікрохвильового випромінювання, що проявляється в стимуляції або пригніченні сомітогенезу та зміні рівня ушкодження ДНК у клітинах 38-годинних ембріонів.

Ключові слова: мікрохвильове випромінювання, ембріогенез, сомітогенез, пошкодження ДНК.

Постановка наукової проблеми та її значення. Епідеміологічні дослідження останніх років підтвердили, що довготривале та інтенсивне використання мобільного зв'язку може спричинити суттєві ризики для здоров'я людини внаслідок надмірного радіоопромінювання. Так, виявлено достовірне зростання ризиків розвитку гліом, менінгіом, невриноом слухового нерва, пухлин білявушних слинних залоз, головного болю, відчуття фізичного дискомфорту в користувачів мобільного зв'язку при багаторічному (5–10 років) інтенсивному користуванні мобільними телефонами.

Численні дослідження проведено на різноманітних біологічних об'єктах, таких як *Drosophila*, мурахи, курячі ембріони, сперматозоїди людини *invitro*, добровольці *invivo*, миші, щурі, свині, кролі

in vivo, клітини мишей лінії GC-2 *in vitro*, бджоли, найпростіші та очищені протеїни *in vitro*. У них указано на значний біологічний або клінічний ефект мікрохвильового випромінювання (МХВ), починаючи з порушення рухливості, орієнтації в просторі, погіршення самопочуття або зміни електроенцефалограми, закінчуючи пригніченням чоловічої та жіночої репродуктивної функції, змінами активності ензимів, рівнів ушкодження ДНК та загибелі клітин, а також гістопатологічними змінами в тканинах головного мозку.

Ембріон птиці, у певному розумінні, є класичним модельним об'єктом, який можна використувати для вивчення впливу різноманітних фізичних факторів на біологічні об'єкти. Це зумовлено тим, що ембріон птиці розвивається поза організмом матері, тому можливе вивчення безпосереднього впливу досліджуваного фактора на нього, виключаючи при цьому опосередкований вплив організму матері. Раніше [3] нами успішно використано перепелиний ембріон як експериментальну модель для вивчення біологічної ефективності електромагнітного випромінювання оптичного діапазону.

Мета роботи – з'ясувати можливість використання моделі перепелиного ембріона для оцінки біологічної активності МХВ.

Матеріали та методи дослідження. Під час дослідження сформовано групи свіжих інкубаційних яєць перепела японського (*Coturnix coturnix japonica*) (дослідні й контрольні, по 8–10 шт кожна), які інкубували *in ovo*. Інкубацію здійснювали за оптимальних умов для розвитку перепелиного ембріона: $38,3 \pm 0,2$ °C, відносна вологість – 60 %. Яйця розміщували в горизонтальних лотках і перевертали тричі на день. Перша група слугувала інтактним контролем, друга піддавалася дії мікрохвильового випромінювання (МХВ) стандарту GSM 900 МГц.

Ембріони першої дослідної групи піддавали 38-годинному опроміненню, починаючи від закладки в інкубатор. Для збільшення дози МХВ ембріони другої дослідної групи піддавали 158-годинному опроміненню. Цей час уключав 120 год (5 діб) опромінення ембріонів *in ovo* за кімнатної температури перед закладкою на інкубацію та 38 год від закладки в інкубатор. Дослідні й контрольні групи впродовж усього експерименту були екрановані кількома шарами алюмінієвої фольги й розміщені на відстані 10 сантиметрів одна від одної. Фонове радіовипромінювання в лабораторії становило $0,001$ мкВт/см², у зоні знаходження контрольних ембріонів – $0,002$ мкВт/см².

Джерелом МХВ використовували комерційну модель мобільного телефона Nokia 3120, який розміщували на відстані 3 см над поверхнею яєць та активізували комп'ютерною програмою автодозвону в режимі 48 секунд – «увімкнуто», 12 секунд – «вимкнуто». У стані «увімкнуто» система випромінювала МХВ стандарту GSM 900 МГц із щільністю потужності $0,21 \pm 0,014$ мВт/см² у зоні розміщення біологічного об'єкта (яєць). Інтенсивність МХВ оцінювали вимірником електромагнітного випромінювання радіочастотного діапазону (RFField Strength Meter, AlfabInc., USA).

Для оцінки впливу опромінення на ранній ембріональний розвиток перепела використовували морфометричний метод підрахунку диференційованих пар сомітів, що сформувалися на 38-му год інкубації. Цей показник вважається об'єктивним для оцінки інтенсивності раннього ембріонального розвитку птиці [2].

Аналіз рівня пошкоджень ДНК в ембріональних клітинах виконували за допомогою лужного гель-електрофорезу поодиноких клітин (метод «ДНК-комет») відповідно до методики із деякими модифікаціями. Для приготування суспензії ембріональних клітин перепелиний ембріон після 38 год інкубації знімали з поверхні жовтка за допомогою паперового кільця. Після цього ембріон обережно відмивали в холодному PBS та знімали з паперового кільця. Суспензію ембріональних клітин отримували шляхом обережного піпетування цілого ембріона, що на той період розвитку сягав маси 7 мг, у відповідному об'ємі фосфатного буфера для досягнення кінцевої концентрації клітин близько 5×10^6 /мл. Суспензію ембріональних клітин змішували з розпавленою 1-% легкоплавкою агарозою при 37 °C у співвідношенні 1:1 та наносили на предметне скло в об'ємі 75 мкл (концентрація клітин $1-2 \times 10^5$ /кл/мл). Після цього препарати охолоджували на льоду для затвердіння агарози. Надалі препарати промивали у фосфатному буфері та занурювали в лізуючий розчин (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Trisbase, 10 % DMSO, 1 % Triton X-100, pH 10) та залишали на 1 год при 4 °C. Після лізису препарати переносили в камеру для горизонтального електрофорезу, витримували в лужному розчині (300 mM NaOH й 1 mM EDTA, pH 13), 30 хв. Надалі проводили електрофорез у цьому ж розчині 20 хв при 0,8 В/см, 25 В, 300 мА. Препарати нейтралізували 0,4 M розчином TrisCl 10 хв, відмивали в дистилаті двічі по 5 хв, висушували при 37 °C та забарвлювали розчином SYBR Green I. Препарати аналізували за допо-

могою люмінісцентного мікроскопа (CarlZeissFluoval, Germany), що був обладнаний відеокамерою для мікроскопічного аналізу (DigitalCameraforMicroscope DCM 500, China).

Аналіз зображення проводили за допомогою пакету програм CometScore (TriTekCorp, USA). У кожному варіанті підраховували не менше 50 клітин. Рівень пошкодження ДНК визначали за відсотком ДНК у хвості комети або за параметром моменту хвоста, що є добутком довжини хвоста комети на відсотковий уміст ДНК у хвості.

Результати статистично опрацьовували за допомогою програмного забезпечення Statistika v. 6.0 (StatSoft, USA). Для визначення статистичної вірогідності використовували t-критерій Стьюдента. Отримані результати статистично вірогідні при $p < 0,05$.

Виклад основного матеріалу й обґрунтування отриманих результатів досліджень. На момент закладки в інкубатор пташиний ембріон перебуває на стадії ранньої гастрული. У перші години інкубації відбувається додаткове утворення ентодермальних клітин та кінцеве диференціювання ентодермального зародкового шару, тобто завершується стадія гастрულიції. Приблизно в добовому віці мезодерма ембріона починає диференціюватися на соміти, нефротомі та спланхнотомі. Кількість диференційованих пар сомітів є найбільш точним критерієм для оцінки раннього ембріонального розвитку птиці (до 50–53 год), що пов'язано з тим, що час утворення сомітів є постійним [1].

Використовуючи метод підрахунку диференційованих пар сомітів, що сформувалися на 38-му год інкубації, виявили (рис. 1, табл. 1), що опромінення перепелиних ембріонів *inovo* MXBGSM 900 МГц стандарту при середній інтенсивності $0,21 \mu\text{Вт}/\text{см}^2$ протягом 38 год достовірно прискорювало темпи ембріонального розвитку, про що свідчить вірогідне ($p < 0,001$) збільшення кількості диференційованих пар сомітів в опроміненіх ембріонів, порівняно з контролем, на 14,89 %.

158-годинне опромінення перепелиних ембріонів випромінюванням GSM 900 МГц стандарту призводило до вірогідного ($p < 0,05$) пригнічення інтенсивності розвитку перепелиних ембріонів, про що свідчить суттєве зменшення на 20,97 % кількості диференційованих пар сомітів у 38-годинних ембріонів дослідних груп, порівняно з відповідним контролем. Дослідні групи були значно варіативніші за контрольні за темпами розвитку.

Таблиця 1

Вплив мікрохвильового випромінювання GSM 900 МГц на стандарту на кількість диференційованих пар сомітів, що сформувалися на 38 год інкубації, та рівень ушкоджень ДНК у клітинах 38-годинних перепелиних ембріонів ($n=8-10$; $M \pm m$)

Показник	Дослід I	Контроль I	Дослід II	Контроль II
Час опромінення, год	38	-	158	-
Інтенсивність випромінювання, $\mu\text{Вт}/\text{см}^2$	0,21		0,21	
Доза опромінення, $\text{мДж}/\text{см}^2$	28,73	-	119,45	-
Кількість пар диференційованих сомітів, шт.	$13,11 \pm 0,3^{***}$	$11,41 \pm 0,3$	$8,82 \pm 0,9^*$	$11,16 \pm 0,28$
Довжина хвоста, мкм	$5,38 \pm 0,35^{***}$	$11,69 \pm 0,87$	$21,20 \pm 0,60^{***}$	$12,13 \pm 0,57$
ДНК у хвості, %	$19,16 \pm 0,88^{***}$	$25,38 \pm 1,35$	$29,24 \pm 0,68^{***}$	$22,32 \pm 0,76$
Момент хвоста	$1,90 \pm 0,27^{***}$	$5,55 \pm 0,69$	$8,55 \pm 0,39^{***}$	$4,52 \pm 0,38$

Примітка. * – $p < 0,05$ порівняно з контролем; *** – $p < 0,001$, порівняно з відповідним контролем.

Потрібно відзначити однакову кількість диференційованих пар сомітів у 38-годинних ембріонів обох контрольних груп, де першу сформовано зі свіжих інкубаційних яєць, а другу перед інкубацією зберігали за кімнатної температури протягом п'ять діб. Це вказує на те, що 5-денне зберігання перепелиних яєць перед інкубацією не вплинуло на життєдіяльність ембріонів, що відповідає стандартам інкубації. Отже, зменшення кількості диференційованих пар сомітів в опроміненіх ембріонів другої дослідної групи зумовлено дією МХВ.

Таким чином, отримані дані демонструють високу чутливість моделі раннього ембріогенезу (сомітогенезу) до низькоінтенсивного МХВ. При цьому напрям ефекту опромінення залежить від його дози, яку змінювали збільшенням часу опромінення.

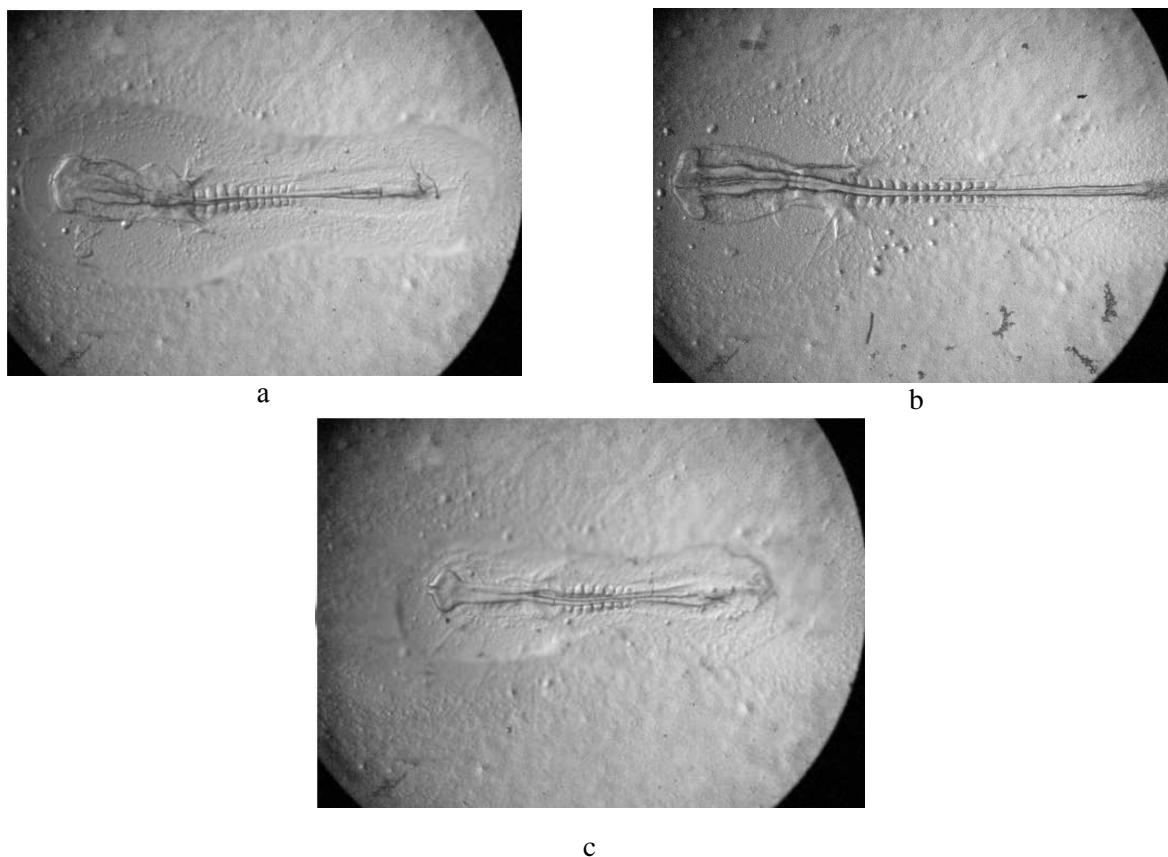


Рис. 1. Мікрофото (збільшення $\times 24$) перепелиного ембріона на 38-му год інкубації:
a – контроль; *b* – 38-годинне опромінення *inovo* мікрохвильовим випромінюванням GSM 900 МГц стандарту; *c* – 158-годинне опромінення *inovo* мікрохвильовим випромінюванням GSM 900 МГц стандарту

Нами також проведено оцінку можливих мутагенних ефектів при різній тривалості опромінення ембріональних клітин МХВ. Опромінення перепелиних ембріонів МХВ GSM 900 МГц стандарту протягом перших 38 год інкубації середньою інтенсивністю $0,21 \mu\text{Вт}/\text{см}^2$ приводило до статистично вірогідного ($p < 0,001$) зниження одно- та дwonиткових розривів ДНК у клітинах 38-годинних ембріонів, що виявлено методом «ДНК-комет». Довжина хвоста та момент хвоста були удвічі меншими в дослідній групі, порівняно з контрольною (рис. 2, табл. 1).

Натомість, опромінення перепелиних ембріонів *inovo* протягом п'яти діб до початку та протягом перших 38 год інкубації, усього впродовж 158 год мікрохвильовим випромінюванням GSM 900 МГц стандарту, призводило до вірогідного ($p < 0,001$) зростання одно- та дwonиткових розривів ДНК у клітинах 38-годинних ембріонів.

Показники довжини та моменту хвоста комет у клітинах дослідної групи ембріонів були майже вдвічі вищі за відповідні показники контрольної групи. Відсоток ДНК у хвості комет ембріональних клітин дослідної групи був на 31,2 % вищим, порівняно з контрольною групою ембріонів.

Отже, виявлено різноспрямований дозозалежний ефект опромінення перепелиних ембріонів *inovo* мікрохвильовим випромінюванням GSM 900 МГц стандарту на рівень ушкодження ДНК ембріональних клітин.

Пошкодження ДНК неіонізуючим випромінюванням тривалий час піддавалося сумніву. У низці робіт указується на відсутність генотоксичних ефектів МХВ. Проте існують більш ніж переконливі дані щодо генотоксичних ефектів МХВ, серед яких – зростання рівня одно- та дwonиткових розривів ДНК, формування мікроядер, хромосомні аберації тощо. Прояв біологічної активності МХВ залежить від багатьох факторів, починаючи від режиму та дози опромінення, закінчуючи вибором застосованої біологічної моделі. Проаналізувавши близько 100 робіт щодо генотоксичних ефектів МХВ, відзначено більш високий рівень позитивних ефектів при проведенні експериментів *invivo* (58 %) проти 38 % *invitro*. Також важливе значення має й використаний метод для оцінки генотоксичних ефектів МХВ, наприклад

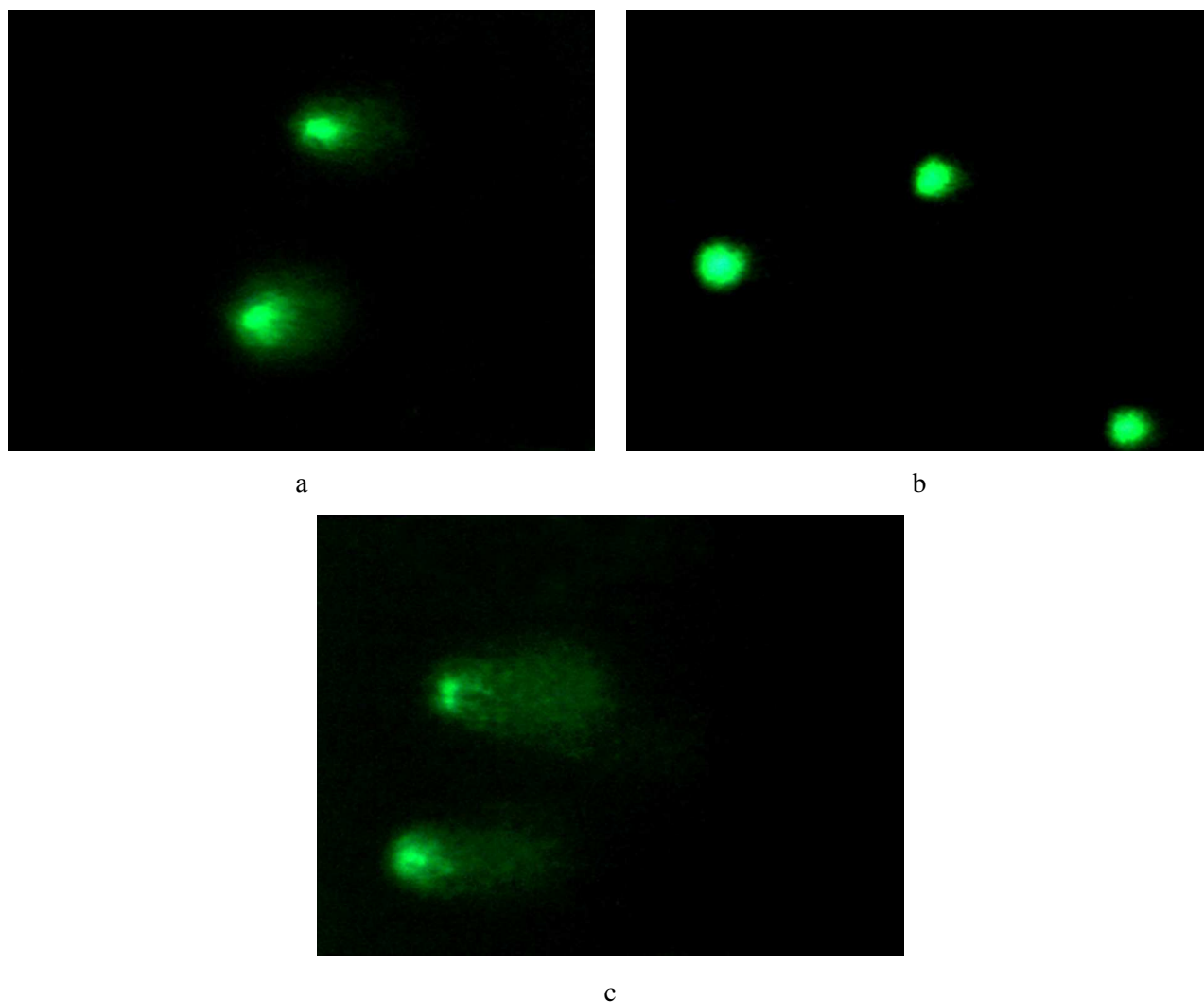


Рис. 2. Мікрофото (x 40) ДНК комет 38-годинних перепелиних ембріонів:
a – контроль; *b* – 38-годинне опромінення іпоно мікрохвильовим випромінюванням GSM 900 МГц стандарту;
c – 158-годинне опромінення іпоно мікрохвильовим випромінюванням GSM 900 МГц стандарту

хромосомний аналіз, метод «ДНК-комет» та вивчення сестринських хроматидних обмінів частіше давали негативний результат, а підрахунок мікроядер частіше виявляв позитивний результат. Використання клітин кришталика людини, буккального епітелію, головного мозку гризунів та клітин крові щурів у більшості дослідів засвідчило позитивний ефект, а 100 % негативні генотоксичні ефекти виявлені за використання в експериментах у якості біологічної моделі постійних клітинних ліній мишей або лімфобластних клітин різного походження. Аналогічна залежність прояву біологічного ефекту виявлена під час вивчення дії МХВ на активність орнитин декарбоксилази, коли зміну активності ензиму спостерігали в первинній, але не у вторинній культурі нервових клітин.

Стимуляційні ефекти низькоінтенсивного МХВ, виявлені в нашому дослідженні, можна пояснити явищем гормезису. Дійсно, якщо рівень потенційно небезпечних метаболічних змін у живих клітинах контролюється захисними системами (в тому числі антиоксидантною та детоксикуючою), то дія МХВ може привести до їх активації, у результаті чого й виникає певний стимуляційний ефект опромінення. Наприклад, ця концепція може бути залучена до пояснення зменшення ДНК-ушкоджень, виявлених у нашому дослідженні при меншій дозі мікрохвильового опромінення перепелиних ембріонів. Потрібно підкреслити, що раніше подібний ефект виявлено на ДНК лімфобластів, однак доза опромінення в дослідженні варіювалась інтенсивністю випромінювання.

Щодо експериментальної моделі, використаної нами, то ембріони птахів, у певному розумінні, є класичним модельним об'єктом багатьох досліджень, що мають на меті провести оцінку дії того або іншого фактора на розвиток тваринного організму. Інтенсивна проліферація та активний метаболізм ембріональних клітин на ранніх етапах ембріогенезу робить їх надзвичайно чутливими до зовнішніх факторів різної природи, уключаючи й мікрохвильове випромінювання. Активна проліферація ембріональних клітин, очевидно, також була причиною високого рівня ДНК-пошкоджень контрольних неопромінених ембріонів.

Висновки й перспективи подальших досліджень. Отримані дані демонструють високу чутливість моделі раннього ембріогенезу перепелів до низькоінтенсивного мікрохвильового випромінювання, що проявляється в стимуляції або пригніченні сомітогенезу та зміні рівня ушкодження ДНК у клітинах 38-годинних ембріонів.

Джерела та література

1. Рольник В. В. Биология эмбрионального развития птиц / В. В. Рольник. – Ленинград : Наука, 1968. – 425 с.
2. Якименко И. Л. Влияние электромагнитного излучения мобильного телефона на сомитогенез птицы / И. Л. Якименко, Д. Хеншель, Е. П. Сидорик, А. С. Цыбулин, В. Т. Розумнюк // Доповіді НАН України. – 2011. – № 1. – С. 146–52.
3. Якименко И. Л. Регуляторна дія низькоінтенсивного видимого світла на сомітогенез птиці / І. Л. Якименко, О. С. Цибулін // Доповіді НАН України. – 2007. – № 2. – С. 163–168.

Цыбулин Александр. Использование модели раннего эмбрионального развития перепела японского (*Coturnix coturnix japonica*) для оценки биологической активности микроволнового излучения. Установлено, что микроволновое излучение стандарта GSM 900 МГц при средней интенсивности 0,21 мВт/см² проявляет регуляторное действие на раннее эмбриональное развитие перепелиного эмбриона. При облучении на протяжении 38 ч отмечен стимулирующий эффект на сомитогенез. Увеличение времени облучения до 158 ч (при дополнительном 5-суточном облучении до начала инкубации) вызывает угнетение развития перепелиных эмбрионов, о чём свидетельствует уменьшение числа дифференцированных пар сомитов, которые сформировались на 38 ч инкубации. Кроме этого, облучение перепелиных эмбрионов микроволновым излучением стандарта GSM 900 МГц на протяжении первых 38 ч инкубации приводит к статистически достоверному ($p < 0,001$) снижению одно- и двухниточных разрывов ДНК в клетках 38-часовых эмбрионов, которое было выявлено методом «ДНК-комет». Облучение перепелиных эмбрионов *in ovo* на протяжении 5 суток до начала и 38 ч после начала инкубации микроволновым излучением стандарта GSM 900 МГц приводит к достоверному ($p < 0,001$) увеличению одно- и двухниточных разрывов ДНК в клетках 38-часовых эмбрионов.

Ключевые слова: микроволновое излучение, эмбриогенез, сомитогенез, повреждение ДНК.

Tsybulin Olexandr. Use Models of Early Developing Embryo Japanese Quail (*Coturnix Coturnix Japonica*) For Assessment of Biological Activity of Microwave. During the last few decades, worldwide intensive implementation of GSM mobile communication systems has occurred. Recent epidemiological studies raised concerns about potential hazards of long-term microwave exposure for human health. We aimed at assessment of biological effects of microwave emitted by commercial cell phone using developing bird embryo as a model. Embryos of Japanese Quails were exposed *in ovo* to GSM 900 MHz cellular phone radiation during initial 38 h of brooding or alternatively during 158 h (120 h before brooding plus initial 38 h of brooding) discontinuously with 48 sec ON followed by 12 sec OFF intervals. Maximum intensity of incident radiation on the egg's surface was 0,2 μW/cm². A number of differentiated somites were assessed microscopically. Possible DNA damage evoked by irradiation was assessed by an alkaline comet assay. Exposure to radiation from GSM 900 MHz cellular phone led to a significantly altered number of differentiated somites. In embryos irradiated during 38 h the number of differentiated somites increased ($p < 0,001$), while in embryos irradiated during 158 h this number decreased ($p < 0,05$). The lower duration of exposure led to significant ($p < 0,001$) decrease in a level of DNA stand breaks in cells of 38-h embryos, while the higher duration of exposure resulted in a significant ($p < 0,001$) increase in DNA damage as compared to the control.

Key words: electromagnetic field, microwave radiation, embryo, somitogenesis, DNA damage.

Стаття надійшла до редколегії
19.03.2017 р.