

ЕКОЛОГІЧНІ, ФАРМАКОЛОГІЧНІ ТА БІОХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ВАНАДІЮ

Сушко О. О., Іскра Р. Я.

ВСТУП

Присутність забруднюючих речовин, у тому числі металів, у навколишньому середовищі становить загрозу як для здоров'я, так і для життя організмів. Ванадій (V) є багатовалентним окисно-відновним металом, який широко поширений та потрапляє в навколишнє середовище в основному через антропогенну діяльність, таку як промисловість, видобуток корисних копалин, спалювання вихлопного палива та внесення добрив, і створює серйозні проблеми для рослин, тварин і здоров'я людини¹.

Ванадій надходить в організм людини через шлунково-кишковий тракт або дихальну систему. Елемент транспортується з крові у тканини в основному трансферином, однак і інші білки сироватки, такі як альбумін, гемоглобін та імуноглобулін, а також низькомолекулярні ліганди – лактат і цитрат, також можуть брати участь у його транспортуванні кров'ю. З крові Ванадій переноситься до печінки, нирок, серця, селезінки, мозку і кісток². Остаточне виведення абсорбованого Ванадію відбувається через сечу. В організмі людини він перебуває в основному у ступені окислення +5 або +4. Поглинання елемента клітиною відбувається через опосередкований рецепторами ендоцитоз білків, які зв'язують Ванадій (трансферин, альбумін), фосфатні чи сульфатні йонні канали, або мембранні цитратні транспортери. Відновники, такі як глутатіон, аскорбінова кислота або NADH, перетворюють п'ятивалентний Ванадій у чотиривалентний (ванадил), що

¹ Altaf M. M., Diao X., Shakoor A., Imtiaz M., Atique-ur-Rehman, Altaf M. A., Latif L.U. Delineating Vanadium (V) Ecological Distribution, Its Toxicant Potential, and Effective Remediation Strategies from Contaminated Soils. *J. Plant. Nutr. Soil. Sci.* 2022. V 22. P. 121–139.

² Trevino S., Díaz A., Sánchez-Lara E., Sanchez-Gaytan B. L., Perez-Aguilar J. M., González-Vergara E. Vanadium in biological action: chemical, pharmacological aspects, and metabolic implications in diabetes mellitus. *Biol. Trace Elem. Res.* 2019. 188(1). P. 68–98. doi: 10.1007/s12011-018-1540-6.

вважається основним ступенем окислення цього елемента в клітині. Водночас такі окислювачі, як NAD^+ , O_2 і O_2^{2-} , можуть окислювати ванадил назад до ванадату.

Ванадій, будучи повсюдно поширеним у ґрунті, сирій нафті, воді та повітрі, він також відіграє певну роль у біологічних системах і є важливим елементом для більшості живих істот. Існує також кілька груп організмів, які накопичують Ванадій, використовуючи його у своїх біологічних процесах. Оскільки він є біологічно важливим елементом, не дивно, що багато терапевтичних препаратів на основі Ванадію були запропоновані для лікування деяких типів захворювань³.

Сполуки Ванадію, зокрема органічні похідні, були запропоновані для лікування цукрового діабету (ЦД), раку та захворювань, які викликані паразитами. У клітинах, частково завдяки подібності ванадату та фосфату, сполуки Ванадію активують численні сигнальні шляхи та фактори транскрипції; це посилює застосування терапевтичних засобів на основі Ванадію. Тим не менш, ця неспецифічна біологічна активність також може спричинити кілька шкідливих побічних ефектів, оскільки через реакції типу Фентона або реакції з атмосферним O_2 , також можуть генеруватися активні форми Оксигену (АФО), тим самим спричиняти окислювальний стрес із усіма його наслідками. Незважаючи на це, потенціал сполук Ванадію при лікуванні різних захворювань, зокрема пухлинних та паразитарних, залишається перспективним.

1. Вплив сполук Ванадію на навколишнє середовище

Забруднення навколишнього середовища Ванадієм є серйозною проблемою. Його токсичність значною мірою залежить від природи сполуки, в якій він перебуває. Елемент зустрічається у різних ступенях окиснення (переважно від -1 до +5), але найпоширенішими є тривалентна, чотиривалентна та п'ятивалентна форми.

Концентрація Ванадію у верхніх шарах земної кори в деяких областях є подібною до концентрації Цинку та Нікелю. Однак через нерівномірний розподіл Ванадію в земній корі, його вміст важко оцінити, зазвичай вважається, що він дорівнює приблизно 150 mg kg^{-1} (приблизно 0,019% земної кори). Ванадій є відносно поширеним у

³ CostaPessoa J., Etcheverry S., Gambino D. Vanadium compounds in medicine. *Coord. Chem. Rev.* 2015. V. 301. P. 24–48. doi: 10.1016/j.ccr.2014.12.002.

вихідних скельних породах ґрунтів, підземних водах, викопному паливі та живих організмах ⁴.

Антропогенні викиди від викопного палива, особливо в результаті тривалого спалювання кам'яного вугілля або сирової нафти, спричиняють підвищення рівня Ванадію у більшій мірі, ніж у випадку з будь-якими відомими природними джерелами. Крім того, під час спалювання вугілля підвищений рівень V_2O_5 викидається в атмосферу разом із дрібними частинками та стає токсичним для тварин і людей у концентраціях, що перевищують 1 мг/л⁵. Це призводить до патологічних змін в організмі, таких як вазоконстрикції судин, порушення серцевої діяльності, застійні явища та крововиливи у легенях і корі надниркових залоз, ожиріння печінки, діареї, зневоднення, зменшення споживання їжі або втрати ваги.

Ванадій присутній в підземних водах по всьому світу, наприклад, у Сполучених Штатах, Канаді, Китаї та в деяких європейських країнах (Німеччина, Італія), залежно від геологічних умов, особливо, у вулканічних породах, які є геогенним джерелом Ванадію ⁶.

Концентрації Ванадію в питній воді можуть коливатися від 0,2 до понад 100 мкг/л. Незважаючи на те, що підвищений рівень Ванадію може мати негативні наслідки для здоров'я, у більшості країн нормативно-правові акти не містять рекомендацій щодо його концентрацій у питній воді. Однак Німецьке федеральне агентство з охорони навколишнього середовища встановило орієнтовне оптимальне значення – 4 мкг/л на основі токсикологічних досліджень на людях⁷. Встановлено також максимальну концентрацію Ванадію в питній воді – 20 мкг/л, що вказує на необхідність запровадження

⁴ Aihemaiti A., Jiang J., Li D., Liu N., Yang N., Meng Y. The interactions of metal concentrations and soil properties on toxic metal accumulation of native plants in vanadium mining area. *J. Environ. Manag.* 2018. 222. P. 216–226. doi: 10.1016/j.jenvman.2018.05.081.

⁵ Hanus-Fajerska E., Wiszniewska A., Kamińska I. A Dual Role of Vanadium in Environmental Systems – Beneficial and Detrimental Effects on Terrestrial Plants and Humans. *Plants (Basel)*. 2021. 10(6). 1110. doi: 10.3390/plants10061110.

⁶ Vasseghian, Y., Sadeghi Rad, S., Vilas-Boas, J. A., Khataee, A. A global systematic review, meta-analysis, and risk assessment of the concentration of vanadium in drinking water resources. *Chemosphere*. 2021. 267, 128904. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020>.

⁷ ATSDR. Toxicological Profile for Vanadium. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. U.S. Department of Health and Human Services. September 2012. <https://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp58.p>

заходів для зменшення його вмісту у питній воді. Рекомендації ВООЗ щодо якості питної води не містять гранично допустимих норм цього елементу⁸. Вміст сполук Ванадію не регулюється в Сполучених Штатах Америки, хоча він внесений до списку забруднюючих речовин.

Ванадій легко поглинається з ґрунту корінням рослин, де він і залишається, лише невелика частина переноситься до надземних органів. Цей елемент при нижчих концентраціях стимулює певні фізіологічні процеси та покращує ріст і врожайність рослин. І навпаки, перевищення порогової межі демонструє біоаккумуляцію Ванадію в тканинах рослин, що є причиною пригнічення росту окремих їх частин, вплив на вміст хлорофілу, процеси фотосинтезу, а також викликає окислювальні пошкодження, розриви хромосом і аберації, порушення мінерального гомеостазу та метаболічних процесів⁹.

2. Фармакологічні властивості та біохімічні механізми дії Ванадію

Тривалий час Ванадій не вважався корисним елементом для людини, оскільки їжа, яку ми споживаємо щодня, містить надзвичайно низьку кількість елемента. Нещодавно Ванадій був визнаний корисним ультрамікроелементом для тварин та людей¹⁰. Петрушка та листові овочі, такі як салат і шпинат, а також спаржа, деякі злакові продукти (наприклад, житнє борошно), чорний перець і гриби є хорошими джерелами Ванадію в раціоні.

Ванадій є важливим елементом для нормального функціонування та розвитку клітин. Він проявляє позитивні ефекти при лікуванні мишачої лейкемії, пухлини Ерліха, аденокарциноми молочної залози мишей та карциноми легень, молочної залози та шлунково-кишкового тракту людини¹¹. Ванадій регулює деякі внутрішньоклітинні сигнальні шляхи, при цьому, дуже низькі дози

⁸ WHO. Guidelines for drinking-water quality – fourth edition incorporating the first addendum. World Health Organization. 2017.

⁹ Roychoudhur A. Vanadium Uptake and Toxicity in Plants. *ScienceForecast. J. Agron. Crop. Sci.* 2020. V. 1. P. 1–5.

¹⁰ Gupta P.K., Vaswani S. Basic information about vanadium ‘ultra-trace-element or occasionally beneficial element’ and its various functions in animals: A review article. *J. Entomol. Zool. Stud.* 2020. V. 8. P. 645–653.

¹¹ Evangelou AM. Vanadium in cancer treatment. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2002. V. 42(3). P. 249–265.

спричиняють позитивні ефекти на клітинному і субклітинному рівнях, тоді як більш високі дози є токсичними. Та до цих пір сполуки Ванадію не схвалені як лікарські засоби для клінічного використання.

У 1899 році, за 22 роки до відкриття інсуліну Бантінгом і Бестом, французькі лікарі, повідомили, що метаванадат натрію (NaVO_3), зі ступенем окиснення ванадію +5 ефективно покращує стан пацієнтів з діабетом шляхом зниження екскреція глюкози з сечею¹². Неможливо встановити причину, що спонукало для проведення такого ризикованого експерименту наприкінці XIX століття; однак, це можна краще зрозуміти, виходячи з того факту, що в той час Ванадієм лікували всі види захворювань і його називали «панацеєю», «еліксиром». Клінічний ефект Ванадію щодо метаболізму ліпідів і глюкози відомий з 1979 року¹³. Інсуліноподібні ефекти Ванадію були вперше продемонстровані у дослідженнях *in vivo*¹⁴ шляхом простого додавання ортованадату натрію (Na_3VO_4) до питної води щурам із стрептозоциновим діабетом. Аналогічно було продемонстровано позитивний захисний вплив ванадилсульфату (VOSO_4) на підшлункову залозу щурів з індукованим діабетом¹⁵. І це було причиною до зростання кількості експериментів, у яких в основному використовували VOSO_4 , Na_3VO_4 та NaVO_3 як потенційні протидіабетичні препарати. Слід також підкреслити, що сполуки Ванадію погано абсорбуються і викликають побічні ефекти, тому наші експериментальні дослідження ґрунтуються на синтезі нових похідних органічного Ванадію з кращими фізико-хімічними, фізіологічними та терапевтичними параметрами.

Біологічні та фармакологічні властивості Ванадію включають інсулініміметичну дію, антигіперліпідемічні та антигіпертензивні ефекти. Цей елемент має позитивний вплив у боротьбі з ожирінням, підвищенням афінності гемоглобіну до кисню та діуретичну дію.

¹² Lyonnet B, Martz X, Martin E. L'emploi thérapeutique des dérivés du vanadium. *Presse Med.* 1899. V. 1. P. 191–192.

¹³ Dubyak G.R., Kleinzeller A. The insulin-mimetic effects of vanadate in isolated rat adipocytes. *J Biol Chem.* 1980. V. 255(11). P. 5306–5312.

¹⁴ Heyliger C.E., Tahiliani A.G., McNeill J.H. Effect of vanadate on elevated blood glucose and depressed cardiac performance of diabetic rats. *Science.* 1985. V. 227(4693). P. 1474–1477.

¹⁵ Bolkent S., Bolkent S., Yanardag R., Tunalı S. Protective effect of vanadyl sulfate on the pancreas of streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2005. V. 70(2). P. 103–109.

Ванадій також покращує глюкозний і ліпідний гомеостаз шляхом зміни активності ключових ензимів гліколізу, глюконеогенезу і ліпогенезу. Також він здатний регулювати синтез глікогену, підвищувати поглинання та утилізацію глюкози. У дослідженні з моделюванням ЦД 1 типу за впливу Ванадію збільшувався вміст глікогену в скелетних м'язах і міокарді, що свідчить про поліпшення сигнального шляху інсуліну, пов'язаного з відновленням експресії GLUT-4, однак це залежало від підібраної терапевтичної дози¹⁶.

Ванадій проявляє високу спорідненість до ферумвмісних протеїнів і, отже, взаємодіє з внутрішньоклітинним феритином, який має високу здатність до зберігання Феруму.

Сполуки Ванадію імітують дію інсуліну за допомогою альтернативних сигнальних шляхів, які включають інгібування фосфотирозинфосфатаз, що призводить до збільшення фосфорилування субстрату інсулінового рецептора 1 (IRS-1), протеїнкінази B, кінази-3 глікогенсинтази, FOX-протеїнів FOXM1 та FOXO1 (англ. forkhead box protein) і взаємодії двох неінсулінових рецепторних тирозинкіназ¹⁷. Основною внутрішньоклітинною мішенню для Ванадію є фосфотирозинфосфатаза 1B, яка регулює процес фосфорилування між рецептором інсуліну та його субстратом IRS. Інгібування активності фосфотирозинфосфатази 1B дозволяє рецептору інсуліну залишатися активованим, тобто, зберігається фосфорилування тирозину IR- β ¹⁸. В даному випадку Ванадій може зменшувати активність інгібіторного протеїну тирозинкінази. У здорових осіб рецептор та його субстрати фосфорилуються після зв'язування з інсуліном, але при ЦД 1 або 2 типу виникає недостатня або аномальна реакція клітинних рецепторів інсуліну на гормон, а отже, і на каскади сигнальної трансдукції.

¹⁶ Hiromura M, Nakayama A, Adachi Y, Doi M, Sakurai H. Action mechanism of bis(allixinato)oxovanadium(IV) as a novel potent insulin-mimetic complex: regulation of GLUT4 translocation and FoxO1 transcription factor. *J. Biol. Inorg. Chem.* 2007. V. 12(8). P. 1275–1287. doi:10.1007/s00775-007-0295-x.

¹⁷ Skalny A.V., Klimenko L.L., Turna A.A., Budanova M.N., Baskakov I.S., Savostina M.S., et al. Serum trace elements are associated with hemostasis, lipid spectrum and inflammatory markers in men suffering from acute ischemic stroke. *Metab. Brain. Dis.* 2017. V. 32(3). P. 779–788. doi:10.1007/s11011-017-9967-6.

¹⁸ Petersen M.C., Shulman G.I. Mechanisms of insulin action and insulin resistance. *Physiol Rev.* 2018. V. 98(4). P. 2133–2223. doi:org/10.1152/physrev.00063.2017.

Ліпогенез природним шляхом контролює рівень глюкози, стимулює біосинтез триацилгліцеролів в печінці, що залежить від правильної сигналізації інсуліну. Однак, при гіперглікемії виникає резистентність до інсуліну, цукровий діабет, ожиріння, стан дисліпідемії, гіпертригліцеролемія та порушення балансу між ліпогенезом та ліполізом. Однак, у тварин, які отримували лікування ванадил сульфатом, відзначено нормалізацію ліполізу в ізольованій жировій тканині¹⁹. Крім того, метаванадат натрію і ванадил сульфат знижували рівень холестеролу в плазмі крові людей без зміни фракцій вільних жирних кислот та триацилгліцеролів²⁰. Показано, що ванадат знижує рівень загального і вільного холестеролу в осіб, що може бути обумовлено інгібуванням етапів біосинтезу холестеролу. У виділених гепатоцитах і адипоцитах метаванадат натрію модулював ліпідний обмін, стимулюючи ліпогенез і пригнічуючи ліполітичну активність²¹.

В основі механізмів дії Ванадію запропоновані шляхи регулювання мітоген-активованих протеїнкіназ (МАРК) (англ. mitogen-activated protein kinase). МАРКs – це збірна група протеїнів, яка містить три родини протеїнкіназ: p38, JNK/SAPK (c-Jun-N-terminal kinase/Stress activated protein kinase, протеїнкіназа, що активується за умов стресу) та ERK (англ. extracellular signal regulated kinase, кіназа, що регулюється позаклітинними сигналами). МАРК індують клітинні реакції, включаючи проліферацію, диференціацію, зупинку клітинного циклу та апоптоз²².

¹⁹ Esbak H., Enyedy E.A., Kiss T., Yoshikawa Y., Sakurai H., Garribba E., et al. Aminoacid-derivatised picolinatooxidovanadium (IV) complexes: characterization, speciation, and ex vivo insulin-mimetic potential. *J. Inorg. Biochem.* 2009. V. 103(4). P. 590–600. doi:10.1016/j.jinorgbio.2008.11.001.

²⁰ Ahmadi-Eslamloo H., Moosavi S.M.S, Dehghani G.A. Cerebral ischemia-reperfusion injuries in vanadyl-treated diabetic rats. *Iran J. Med. Sci.* 2017. V. 42(6). P. 544–552.

²¹ Zarqami A., Ganjkanlou M., Zali A., Rezayazdi K., Jolazadeh A.R. Effects of vanadium supplementation on performance, some plasma metabolites and glucose metabolism in Mahabadi goat kids. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.)* 2018. V. 102(2). P. 972–977. doi:10.1111/jpn.12833.

²² Raman M., Chen W., Cobb M.H. Differential regulation and properties of МАРКs. *Oncogene.* 2007. V. 26(22). P. 3100–3112.

Також є свідчення про позитивну регулюючу роль ERK1/2 у глюкозо стимулюючій секреції інсуліну та виживанні β -клітин²³.

Найважливішу свою роль JNK відіграють у патогенезі станів, які супроводжуються порушеннями вуглеводного та ліпідного обміну, зокрема стану ожиріння, метаболічного синдрому, інсуліно-резистентності, діабету та його ускладнень. Лікування Ванадієм суттєво пригнічує фосфорилування JNK, що відіграє ключову роль у резистентності до інсуліну при ЦД 2 типу. Тобто, посилення механізму дії інсуліну передбачає взаємодію сполук Ванадію з JNK²⁴.

Невелика генерація АФО пов'язана з трансдукцією інсулінового сигналу. Таким чином, сполуки Ванадію могли стимулювати вироблення невеликих кількостей АФО і посилювати інсулінову сигналізацію. Інсулін-міметична активність спостерігалась у сполуках оксованадію через генерування АФО. Однак, якщо генерація АФО є занадто високою, може відбутися зниження інсулінової сигналізації і може бути втрачена активність гормону. Проте сам Ванадій може викликати оксидативний стрес на клітинному рівні, зазвичай через надмірно високі дози введення елемента (вище 5,0 мг/кг)²⁵.

3. Вплив цитрату ванадію на антиоксидантний захист в організмі

Мікроелементи, які присутні в організмі у невеликих кількостях є необхідними для виконання конкретних функцій. Вони найчастіше функціонують як важливі кофактори ензимів і таким чином допомагають підтримувати основні метаболічні реакції (гліколіз, цикл лимонної кислоти, обмін ліпідів і амінокислот), необхідні для підтримки виробництва енергії та життя. Слід відмітити, що навіть помірний дефіцит мікроелементів може призвести до серйозних хворобливих станів.

²³ Kalwat M.A., Thurmond D.C. Signaling mechanisms of glucose-induced F-actin remodeling in pancreatic islet beta cells. *Exp. Mol. Med.* 2013. 45:e37. doi:10.1038/emm.2013.73.

²⁴ Huang M., Wu Y., Wang N., Wang Z., Zhao P., Yang X. Is the hypoglycemic action of vanadium compounds related to the suppression of feeding? *Biol. Trace Elem. Res.* 2014. V. 157(3). P. 242–248. doi:10.1007/s12011-013-9882-6.

²⁵ Matsugo S., Sugiyama H., Nishimoto Y., Misu H., Takamura T., Kaneko S., et al. Cytotoxicity and enhancement of the insulin signaling pathway induced by peroxidovanadium(V) complexes. *Inorg. Chim. Acta.* 2014. V. 420. P. 53–59. doi:10.1016/j.ica.2014.01.035.

З 1980-х років Ванадій та його сполуки почали інтенсивно досліджуватися як складовий елемент медичних засобів. Ванадій має здатність змінювати окисно-відновний потенціал в живому організмі і може проявляти позитивний або негативний вплив на загальний антиоксидантний захист. Цей механізм дуже мінливий і залежить від ступеня окиснення, дози, типу лігандів, присутності вітаміну С, токоферолу та інших. Оскільки оксидативний стрес виникає за розвитку багатьох захворювань, застосування антиоксидантів є важливим в їх терапії. Взаємодії Ванадію з антиоксидантами, такими як відновлений глутатіон або супероксиддисмутаза, відбувається за чітко визначеним механізмом, що може відобразити окисно-відновні властивості Ванадію.

У наших дослідженнях використовували цитрат ванадію, отриманого за допомогою методу аквананотехнології на базі ТОВ «Наноматеріали і нанотехнології» (Україна, Київ). Цитратна сполука Ванадію є найбільш перспективною органічною формою щодо збагачення харчових продуктів для людей та тварин. Альтернативною хімічного методу синтезу сполук металів з органічними кислотами (зокрема, лимонною кислотою) запропоновано метод їх отримання за допомогою аквананотехнології^{26 27}.

Дослідження проведені на білих лабораторних щурах, які перебували в умовах віварію Інституту біології тварин НААН, масою тіла від 100 до 120 г. Щурі розділені на 5 груп (одна контрольна і 4 дослідні групи) по 8 тварин в кожній. У тварин усіх дослідних груп на тлі 24-ох годинного голодування була викликана експериментальна гіперглікемія (ГГ) шляхом внутрішньоочеревинного введення 5% розчину моногідрат алоксану («Синбіас») у кількості 150 мг/кг маси тіла. Крім цього, дослідним щурам II групи давали пити чисту воду без добавок, а тваринам III, IV і V груп протягом місяця до питної води додавали розчин цитрату ванадію в кількостях 0,125, 0,5 і 2,0 мкг V/мл води.

²⁶ Косінов М.В., Каплуненко В.Г., винахідники; Косінов М.В., Каплуненко В.Г., патентовласники. Спосіб отримання карбоксилатів металів “Нанотехнологія отримання карбоксилатів металів”. Патент України № 38391. 2009 січ. 12.

²⁷ Косінов М.В., Каплуненко В.Г., винахідники; Косінов М.В., Каплуненко В.Г., патентовласники. Спосіб отримання аквахелатів нанометалів “Ерозійно-вибухова нанотехнологія отримання аквахелатів нанометалів”. Патент України № 29856. 2008 січ. 25.

На 40 добу досліджень тварин виводили з експерименту шляхом декапітації за введення тіопенталу натрію. Експерименти на тваринах проводилися відповідно до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 1985), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001). Матеріалом для дослідження була кров щурів, де визначали активність ензимів антиоксидантного захисту.

Під час дослідження у тварин I групи (контроль) показник глюкози коливався в межах 6,0–6,9 ммоль/л. Концентрація глюкози у щурів II групи зростала з $6,7 \pm 0,2$ на початку досліду до $15,1 \pm 0,6$ ммоль/л на 40-у добу досліду. Порівняно до показників у тварин контрольної групи концентрація глюкози зростала на 32-у добу на 112,6 %, 36-у добу – на 148,9 % та 40-у добу – на 149,0 % ($P < 0,05$) (рис. 1).

Підвищений показник глюкози в крові дослідних щурів знижувався за вipoювання розчину цитрату ванадію. На 36-у добу концентрація глюкози знижувалася на 8,8 % порівняно до показника у тварин II групи ($P < 0,05$) за використання цитрату ванадію в дозі 0,125 мг V/мл. На 40-у добу за впливу сполуки Ванадію в дозі 0,5 мг V/мл показник глюкози знижувався на 12,4 % порівняно до показника II групи ($P < 0,05$). За дії цитрату ванадію в дозі 2,0 мг V/мл води концентрація глюкози знижувалась відносно показника у тварин II групи, однак дані невірогідні. Такі результати ймовірно пов'язані з можливим впливом Ванадію на посилення синтезу інсуліну, покращення його зв'язування з рецепторами на поверхні клітин та відновлення поглинання глюкози клітинами. Це підтверджує, що сполуки Ванадію впливають на вміст глюкози в крові тварин з гіперглікемією, що може бути пов'язаний з тим, що Ванадій імітує дію інсуліну. Ванадій впливає на клітинну регуляцію глюкози через ряд механізмів: підвищення глікогенезу печінки, інгібування виходу глюкози та активацію транспорту глюкози в клітини жирової тканини та скелетних м'язів²⁸.

²⁸ Soveid M., Dehghani G.A., Omrani G.R. Long-term efficacy and safety of vanadium in the treatment of type 1 diabetes. *Arch. Iran. Med.* 2013. V. 16(7). P. 408–411. doi:013167/AIM.009.

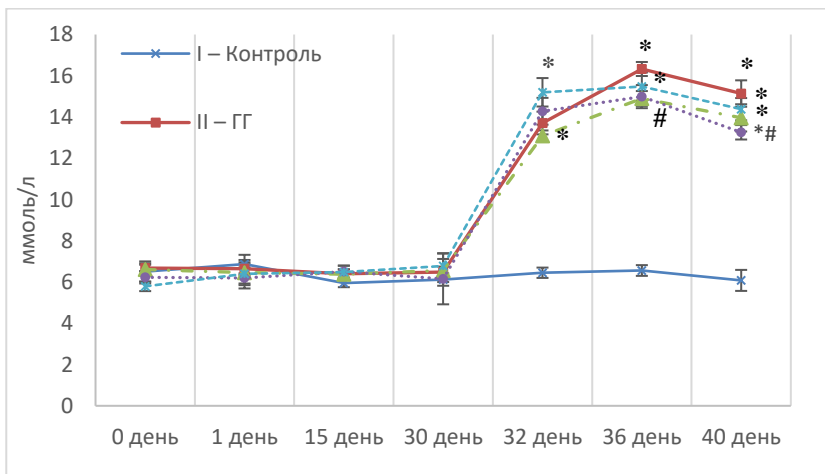


Рис. 1. Зміни концентрації глюкози у крові щурів з гіперглікемією та за впливу цитрату ванадію ($M \pm m$, $n = 7-8$)

Примітка тут і далі: * – різниця вірогідна, порівняно з I групою (контроль), $P < 0,05$; # – різниця вірогідна, порівняно з II групою, $P < 0,05$.

Гіперглікемія викликає оксидативний стрес в основному за рахунок посиленої продукції мітохондріальних АФО, неензиматичного глікозилювання протеїнів і автоокислення глюкози²⁹. Було відзначено, що за гіперглікемії разом з підвищеною генерацією АФО, порушується утворення ендогенних антиоксидантів, а саме супероксиддисмутази, глутатіонпероксидази, каталази, відновленого глутатіону, аскорбінової кислоти та вітаміну Е. Оксидативний стрес при гіперглікемії співіснує зі зниженням функціонування антиоксидантної системи, що може збільшити шкідливий вплив вільних радикалів. Скоординована ж дія ензимів антиоксидантного захисту підтримує рівень АФО в межах фізіологічної норми.

Супероксиддисмутаза (СОД) є першим ензимом антиоксидантного захисту, ліквідує супероксидний радикал шляхом перетворення його в H_2O_2 і молекулярний кисень. СОД існує в декількох формах, одна з яких містить Манган і знаходиться в мітохондріальній матриці, а інша, що містить Купрум і Цинк – у цитоплазмі. Встановлено, що СОД активність у крові та тканинах

²⁹ Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001. V. 414. P. 813–820. doi:10.1038/414813a.

щурів з гіперглікемією вірогідно знижувалась. Таке зниження активності може бути результатом інактивації H_2O_2 або глікації ензиму, що трапляється за гіперглікемії. Зниження СОД активності може призвести не тільки до збільшення радикалів супероксиду, але й до підвищення інших АФО та інтенсифікації процесів пероксидного окиснення ліпідів при ЦД. Початкова стадія даного захворювання призводить до збільшення утворення АФО та виснаження АТФ внаслідок його підвищеної конверсії в аденозинмонофосфат, аденозин, інозин, гіпоксантин. Ксантиноксидаза в присутності Оксигену перетворює гіпоксантин в ксантин і сечову кислоту, що супроводжується формуванням супероксиду. Також гіперглікемія сприяє оксидативному стресу в силу того, що моносахариди і проміжні продукти гліколізу можуть генерувати окиснювальні субстрати. Глюкоза може енолізувати і тим самим знижувати рівень молекулярного Оксигену у фізіологічних умовах за присутності перехідних металів³⁰.

СОД активність в еритроцитах тварин зменшувалась в усіх дослідних групах відносно І групи та дещо зростала відносно показника ІІ групи, однак зміни були невірогідні. Зниження СОД активності в еритроцитах тварин із гіперглікемією очевидно зумовлено накопиченням H_2O_2 , який викликає інактивацію ензиму (таб. 1).

Таблиця 1

Супероксиддисмутази та каталазна активність в еритроцитах крові щурів з гіперглікемією та за впливу цитрату ванадію ($M \pm m, n = 7$)

| Групи тварин | Супероксиддисмутаза, ум. од./мг протеїну | Каталаза, ммоль H_2O_2 /хв×мг протеїну |
|--------------------------------|--|--|
| I – Контроль | 45,41±2,31 | 6,84±0,24 |
| II – ГГ | 31,17±1,13 | 7,29±0,28 |
| III – ГГ + 0,125 мкг V/мл води | 40,89±1,81 | 8,15±0,49 |
| IV – ГГ + 0,5 мкг V/мл води | 40,92±2,47 | 8,03±0,88 |
| V – ГГ + 2,0 мкг V/мл води | 37,57±2,71 | 8,22±0,32 |

Примітка: * – різниця вірогідна, порівняно з І групою (контроль), $P < 0,05$; # – різниця вірогідна, порівняно з ІІ групою, $P < 0,05$.

³⁰ Hisalkar P.J., Patne A.B., Fawade M.M., Karnik A.C. Evaluation of plasma superoxide dismutase and glutathione peroxidase in type 2 diabetic patients. *Biology and Medicine*. 2012. V. 4(2). P. 65–72.

Каталаза є ензимом, який каталізує відновлення пероксиду гідрогену і захищає тканини від високореакційних гідроксильних радикалів. Високий рівень пероксиду гідрогену має шкідливий вплив на протеїни, ДНК і ліпіди, а його накопичення призводить до ускладнень у перебігу ряду захворювань. Каталазна активність підвищувалась у тварин II–IV груп стосовно контрольної групи, однак зміни також були невірорідними.

Глутатіонова система є універсальною та однією з найважливіших систем, яка забезпечує відновними еквівалентами реакції окиснення та знешкодження продуктів перекисного окислення ліпідів (ПОЛ). Глутатіонредуктаза (ГР) є ензимом, залежним від NADPH, активність якого пригнічується у разі накопичення окисненої форми нуклеотиду. Тому причиною зменшення ГР активності в еритроцитах тварин II групи на 68,3 % може бути зниження вмісту NADPH, утвореного в Г-6-ФДГ-ній реакції. Причиною інактивації ензимів за гіперглікемії може бути також глікозилювання їхніх молекул. Нормальне функціонування у клітині NADPH-залежної ГР залежить від інтенсивності відновлення ензимом окисненого глутатіону та його надходження з цитозолу. Збільшення ГР активності в еритроцитах тварин III (на 155,8 %), IV (на 185,5 %) і V (на 72,5 %) груп порівняно з показником II групи ($P < 0,05$). Таке зростання активності за дії цитрату ванадію очевидно зумовлено достатньою кількістю внутрішньоклітинних запасів NADPH, що свідчить про збільшення в умовах окислативного стресу за гіперглікемії активності NADPH-генерувальних ензимів (табл. 2).

Крім КАТ і СОД, у захисті тканин від АФО бере участь ще один ензим – глутатіонпероксидаза (ГПО), що відновлює пероксид гідрогену та органічні гідропероксида до нетоксичних продуктів.

Результати проведених досліджень показали, що ГПО активність в еритроцитах тварин II і III груп зростала порівняно з контрольним показником на 30,6 і 26,9 % відповідно. За впливу цитрату ванадію ГПО активність знижувалася в еритроцитах тварин IV і V груп, відповідно на 31 і 32 %, стосовно показників у тварин II групи ($P < 0,05$). Ймовірно, сполука Ванадію може відновити активність ензимів поліолового шляху та мати прооксидантний вплив.

Гіперглікемія сприяє активації сорбітолового шляху обміну глюкози, що, поряд з активацією NADPH-оксидази, призводить до виснаження цитозольного рівня NADPH і внаслідок цього –

зниження рівня відновленого глутатіону (ВГ)³¹. Глутатіон є трипептидом, який зазвичай присутній внутрішньоклітинно у високих концентраціях і становить основну редукційну здатність цитоплазми. Як відомо, він захищає клітинну систему від токсичних ефектів ПОЛ.

Таблиця 2

Активність ензимів глутатіонової ланки та вміст відновленого глутатіону в еритроцитах крові щурів з гіперглікемією та за впливу цитрату ванадію (M±m, n = 7–8)

| Групи тварин | Глутатіон-редуктаза, мкмоль NADPH/хв×мг протеїну | Глутатіон-пероксидаза, мкмоль GSH/хв×мг протеїну | Відновлений глутатіон, мкмоль/мл |
|--------------------------------|--|--|----------------------------------|
| I – Контроль | 4,36±0,48 | 65,95±3,18 | 0,36±0,03 |
| II – ГГ | 1,38±0,28* | 86,13±7,07* | 0,33±0,04 |
| III – ГГ + 0,125 мкг V/мл води | 3,53±0,46# | 83,68±4,93* | 0,32±0,02 |
| IV – ГГ + 0,5 мкг V/мл води | 3,94±0,50# | 59,47±6,37# | 0,38±0,04 |
| V – ГГ + 2,0 мкг V/мл води | 2,38±0,23*# | 58,59±1,09*# | 0,45±0,03# |

Примітка: * – різниця вірогідна, порівняно з I групою (контроль), P<0,05; # – різниця вірогідна, порівняно з II групою, P<0,05.

Варто зазначити, що ВГ є основним антиоксидантом еритроцитів; він відіграє роль коензиму при відновленні метгемоглобіну у функціонально активний гемоглобін. Крім того, за його участю здійснюється детоксикація цілої низки токсичних сполук, ксенобіотиків, а також H₂O₂ і гідропероксидів ліпідів, які утворюються в реакціях взаємодії АФО з ненасиченими жирними кислотами мембран еритроцитів³². Таким чином, ВГ відіграє важливу роль у збереженні функціональних характеристик мембран еритроцитів.

³¹ Sozmen E.Y., Sozmen B., Delen Y., Onat T. Catalase/superoxide dismutase (SOD) and catalase/paraoxonase (PON) ratios may implicate poor glycemic control. *Arch. Med. Res.* 2001. V. 32(4). P. 283–287.

³² Феденко Г.Д., Просоленко К.О. Атрофічний гастрит: механізми виникнення, окремі питання діагностики та оборотності розвитку. *Сучасна гастроентерологія*. 2007. В. 43(2). С. 7–13.

Нами виявлене незначне зниження вмісту ВГ в еритроцитах тварин II і III груп стосовно контрольної, що, очевидно, свідчить про його інтенсивне використання у реакціях детоксикації активних форм Оксигену за гіперглікемії. Крім цього, підвищена секреція ФНО- α , яка виникає за гіперглікемії, може зумовлювати пригнічення синтезу відновленого глутатіону³³. Зниження ГР активності та вмісту ВГ за гіперглікемії зумовлює накопичення (GSSG) окисненого глутатіону, що може призвести до дисбалансу антиоксидантної системи. GSSG утворює змішані дисульфіди з тіолвмісними ензимами, що порушує їхню активність³⁴.

У V групі тварин за дії цитрату ванадію вміст ВГ зростав на 36,4 % порівняно до показника у тварин II групи ($P < 0,05$), що може свідчити про інтенсивність його синтезу за рахунок збільшення ГР активності.

ВИСНОВКИ

За результатами нашого дослідження були встановлені основні екологічні, фармакологічні та біохімічні властивості Ванадію. Цьому хімічному елементу приділяють багато уваги через його токсичність та активне використання у промисловості. Вже сьогодні людська діяльність сильно впливає на глобальний біогеохімічний цикл Ванадію, і цей вплив, ймовірно, посилюватиметься. Однак, Ванадій є також мікроелементом, який задіяний у запобіганні патогенезу деяких захворювань. Однією із причин багатьох захворювань є виникнення оксидативного стресу на тлі порушень метаболізму, зокрема вуглеводного обміну та виявлення гіперглікемії. Профілактика та лікування цих станів потребують нових засобів з різними механізмами дії. В останні роки було встановлено, що ряд неорганічних сполук Ванадію імітують ефекти інсуліну. Однак особливий інтерес викликає застосування карбоксилатів, що синтезовані методом нанотехнології, адже вони мають низку переваг. Ці сполуки мають високу біологічну активність, нетоксичні, посилюють функції травлення, активність низки ензимів, вітамінів, тому добре засвоюються організмом і використовуються в обмінних

³³ Хаврона О.П. Порушення функціонування глутатіонової ланки антиоксидантного захисту в слизовій оболонці шлунка, печінці та еритроцитах щурів при експериментальній виразковій хворобі. *Експерим. та клініч. фізіологія і біохімія*. 2015. В. 1. С. 26–31.

³⁴ Лановець І.І., Тимченко А.С., Цугорка Т.М. Глутатіон і оксидативний стрес. *Гематологія і переливання крові*. 2012. В. 36(1). С. 168–77.

процесах. Тому дослідження біохімічних механізмів дії карбоксилатів Ванадію необхідні для того, щоб оцінити їхню функціональну роль за умов запобігання розвитку захворювань, в т.ч. гіперглікемії.

Встановлено, що застосування сполук Ванадію впливає на функціонування антиоксидантної системи у тварин з гіперглікемією. Зокрема, було виявлено, що за впливу цитрату ванадію в еритроцитах тварин з гіперглікемією знижувалася СОД активність та зростала КАТ активність. Також встановлено, що дія цитрату ванадію зумовлювала зниження ГПО в еритроцитах та, очевидно, може відновлювати активність ензимів поліолового шляху. Однак ГР активність та вміст ВГ в еритроцитах тварин з гіперглікемією за дії цитрату ванадію – зростали. Очевидно, Ванадій як можливий інсулін-міметик й антиоксидант має здатність виступати акцептором вільних радикалів і, відповідно, зменшувати оксидативний стрес в еритроцитах за гіперглікемії, що супроводжується стабілізацією активності ензимів антиоксидантного захисту.

Ці результати досліджень щодо використання цитратів ванадію у встановлених дозах можуть знайти застосування при розробці нових підходів у створенні терапевтичних засобів для профілактики та лікування гіперглікемічного стану. Оскільки цей мікроелемент може сприяти репарації β -клітин підшлункової залози, які зазнають суттєвих змін, тим самим підвищуючи рівень інсуліну, а також посилюючи його дію.

АНОТАЦІЯ

Ванадій як елемент зі змінною валентністю може по-різному впливати на стадії окиснення в живому організмі, змінюючи при цьому загальний оксидативний захист. Механізм його дії залежить від ступеня окиснення, дози, яку застосовують, типу ліганда й інших факторів. З'ясовано, що вплив цитрату ванадію на метаболічні процеси в організмі щурів із гіперглікемією залежить від досліджуваних доз і реалізується через безпосередню дію на конкретні мішені, якими є окремі ланки вуглеводного обміну, а також антиоксидантна система в еритроцитах щурів. Доведено, що вплив цитрату ванадію призводив до зниження концентрації глюкози в крові тварин із гіперглікемією. Також встановлено виражену антиоксидантну дію цитрату ванадію, про що свідчить нормалізації СОД, КАТ, ГР та ГПО активності та вмісту ВГ в еритроцитах дослідних тварин. Результати досліджень щодо використання

цитратів ванадію у встановлених дозах можуть знайти застосування при розробці нових підходів у створенні терапевтичних засобів для профілактики та лікування гіперглікемії.

Література

1. Altaf M. M., Diao X., Shakoор A., Imtiaz M., Atique-ur-Rehman, Altaf M. A., Latif L.U. Delineating Vanadium (V) Ecological Distribution, Its Toxicant Potential, and Effective Remediation Strategies from Contaminated Soils. *J. Plant. Nutr. Soil. Sci.* 2022. V 22. P. 121–139.
2. Trevino S., Díaz A., Sánchez-Lara E., Sanchez-Gaytan B. L., Perez-Aguilar J. M., González-Vergara E. Vanadium in biological action: chemical, pharmacological aspects, and metabolic implications in diabetes mellitus. *Biol. Trace Elem. Res.* 2019. 188(1). P. 68–98. doi: 10.1007/s12011-018-1540-6.
3. CostaPessoa J., Etcheverry S., Gambino D. Vanadium compounds in medicine. *Coord. Chem. Rev.* 2015. V. 301. P. 24–48. doi: 10.1016/j.ccr.2014.12.002.
4. Aihemaiti A., Jiang J., Li D., Liu N., Yang N., Meng Y. The interactions of metal concentrations and soil properties on toxic metal accumulation of native plants in vanadium mining area. *J. Environ. Manag.* 2018. 222. P. 216–226. doi: 10.1016/j.jenvman.2018.05.081.
5. Hanus-Fajerska E., Wiszniewska A., Kamińska I. A Dual Role of Vanadium in Environmental Systems – Beneficial and Detrimental Effects on Terrestrial Plants and Humans. *Plants (Basel)*. 2021. 10(6). 1110. doi: 10.3390/plants10061110.
6. Vasseghian, Y., Sadeghi Rad, S., Vilas-Boas, J. A., Khataee, A. A. global systematic review, meta-analysis, and risk assessment of the concentration of vanadium in drinking water resources. *Chemosphere*. 2021. 267, 128904. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020>.
7. ATSDR. Toxicological Profile for Vanadium. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. U.S. Department of Health and Human Services. September 2012. <https://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp58.p>
8. WHO. Guidelines for drinking-water quality – fourth edition incorporating the first addendum. World Health Organization. 2017.
9. Roychoudhur A. Vanadium Uptake and Toxicity in Plants. *ScienceForecast. J. Agron. Crop. Sci.* 2020. V. 1. P. 1–5.
10. Gupta P.K., Vaswani S. Basic information about vanadium ‘ultra-trace-element or occasionally beneficial element’ and its various functions

in animals: A review article. *J. Entomol. Zool. Stud.* 2020. V. 8. P. 645–653.

11. Evangelou AM. Vanadium in cancer treatment. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2002. V. 42(3). P. 249–265.

12. Lyonnet B, Martz X, Martin E. L'emploi thérapeutique des dérivés du vanadium. *Presse Med.* 1899. V. 1. P. 191–192.

13. Dubyak G.R., Kleinzeller A. The insulin-mimetic effects of vanadate in isolated rat adipocytes. *J Biol Chem.* 1980. V. 255(11). P. 5306–5312.

14. Heyliger C.E., Tahiliani A.G., McNeill J.H. Effect of vanadate on elevated blood glucose and depressed cardiac performance of diabetic rats. *Science.* 1985. V. 227(4693). P. 1474–1477.

15. Bolkent S., Bolkent S., Yanardag R., Tunali S. Protective effect of vanadyl sulfate on the pancreas of streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2005. V. 70(2). P. 103–109.

16. Hiromura M, Nakayama A, Adachi Y, Doi M, Sakurai H. Action mechanism of bis(allixinato)oxovanadium(IV) as a novel potent insulin-mimetic complex: regulation of GLUT4 translocation and FoxO1 transcription factor. *J. Biol. Inorg. Chem.* 2007. V. 12(8). P. 1275–1287. doi:10.1007/s00775-007-0295-x.

17. Skalny A.V., Klimentko L.L., Turna A.A., Budanova M.N., Baskakov I.S., Savostina M.S., et al. Serum trace elements are associated with hemostasis, lipid spectrum and inflammatory markers in men suffering from acute ischemic stroke. *Metab. Brain. Dis.* 2017. V. 32(3). P. 779–788. doi:10.1007/s11011-017-9967-6.

18. Petersen M.C., Shulman G.I. Mechanisms of insulin action and insulin resistance. *Physiol Rev.* 2018. V. 98(4). P. 2133–2223. doi:org/10.1152/physrev.00063.2017.

19. Esbak H., Enyedy E.A., Kiss T., Yoshikawa Y., Sakurai H., Garribba E., et al. Aminoacid-derivatised picolinato-oxidovanadium(IV) complexes: characterization, speciation, and ex vivo insulin-mimetic potential. *J. Inorg. Biochem.* 2009. V. 103(4). P. 590–600. doi:10.1016/j.jinorgbio.2008.11.001.

20. Ahmadi-Eslamloo H., Moosavi S.M.S., Dehghani G.A. Cerebral ischemia-reperfusion injuries in vanadyl-treated diabetic rats. *Iran J. Med. Sci.* 2017. V. 42(6). P. 544–552.

21. Zarqami A., Ganjkhanelou M., Zali A., Rezayazdi K., Jolazadeh A.R. Effects of vanadium supplementation on performance, some plasma metabolites and glucose metabolism in Mahabadi goat kids. *J. Anim.*

Physiol. Anim. Nutr. (Berl). 2018. V. 102(2). P. 972–977. doi:10.1111/jpn.12833.

22. Raman M., Chen W., Cobb M.H. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene*. 2007. V. 26(22). P. 3100–3112.

23. Kalwat M.A., Thurmond D.C. Signaling mechanisms of glucose-induced F-actin remodeling in pancreatic islet beta cells. *Exp. Mol. Med.* 2013. 45:e37. doi:10.1038/emm.2013.73.

24. Huang M., Wu Y., Wang N., Wang Z., Zhao P., Yang X. Is the hypoglycemic action of vanadium compounds related to the suppression of feeding? *Biol. Trace. Elem. Res.* 2014. V. 157(3). P. 242–248. doi:10.1007/s12011-013-9882-6.

25. Matsugo S., Sugiyama H., Nishimoto Y., Misu H., Takamura T., Kaneko S., et al. Cytotoxicity and enhancement of the insulin signaling pathway induced by peroxidovanadium(V) complexes. *Inorg. Chim. Acta*. 2014. V. 420. P. 53–59. doi:10.1016/j.ica.2014.01.035.

26. Косінов М.В., Каплуненко В.Г., винахідники; Косінов М.В., Каплуненко В.Г., патентовласники. Спосіб отримання карбоксилатів металів “Нанотехнологія отримання карбоксилатів металів”. Патент України № 38391. 2009 січ. 12.

27. Косінов М.В., Каплуненко В.Г., винахідники; Косінов М.В., Каплуненко В.Г., патентовласники. Спосіб отримання аквахелатів нанометалів “Ерозійно-вибухова нанотехнологія отримання аквахелатів нанометалів”. Патент України № 29856. 2008 січ. 25.

28. Soveid M., Dehghani G.A., Omrani G.R. Long-term efficacy and safety of vanadium in the treatment of type 1 diabetes. *Arch. Iran. Med.* 2013. V. 16(7). P. 408–411. doi:013167/AIM.009.

29. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001. V. 414. P. 813–820. doi:10.1038/414813a.

30. Hisalkar P.J., Patne A.B., Fawade M.M., Karnik A.C. Evaluation of plasma superoxide dismutase and glutathione peroxidase in type 2 diabetic patients. *Biology and Medicine*. 2012. V. 4(2). P. 65–72.

31. Sozmen E.Y., Sozmen B., Delen Y., Onat T. Catalase/superoxide dismutase (SOD) and catalase/paraoxonase (PON) ratios may implicate poor glycemic control. *Arch. Med. Res.* 2001. V. 32(4). P. 283–287.

32. Федеєнко Г.Д., Просоленко К.О. Атрофічний гастрит: механізми виникнення, окремі питання діагностики та оборотності розвитку. *Сучасна гастроентерологія*. 2007. В. 43(2). С. 7–13.

33. Хаврона О.П. Порушення функціонування глутатіонової ланки антиоксидантного захисту в слизовій оболонці шлунка, печінці та

еритроцитах щурів при експериментальній виразковій хворобі. *Експерим. та клініч. фізіологія і біохімія*. 2015. В. 1. С. 26–31.

34. Лановець І.І., Тимченко А.С., Цугорка Т.М. Глутатіон і оксидативний стрес. Гематологія і переливання крові. 2012. В. 36(1). С. 168–77.

Information about the authors:

Sushko Olha Oleksandrivna,

Candidate of Biological Sciences,

Lecturer at the Department of Fundamental Discipline

Communal Institution of Higher Education of Lviv Regional Council

"Andrei Krupynskyi Lviv Medical Academy"

70, Doroshenko str., Lviv, 79000, Ukraine

Iskra Ruslana Yaroslavivna,

Doctor of Biological Sciences, Professor,

Professor at the Department of Human and Animal Physiology

Ivan Franko National University of Lviv

4, Hrushevskoho st., Lviv, 79005, Ukraine