

ВПЛИВ ГЕРМАТРАНОЛУ В ЛІПОСОМАЛЬНІЙ ЕМУЛЬСІЇ НА ПРОЦЕСИ ПЕРОКСИДНОГО ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ ТА СТАН АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ ОРГАНІЗМУ ЩУРІВ

Вплив герматранолу в ліпосомальній емульсії на процеси пероксидного окиснення ліпідів та стан антиоксидантної системи організму щурів

Я. С. Стравський¹, Л. Я. Федонюк¹, Р. М. Сачук²,
О. М. Ярема¹

Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України¹
Рівненський державний гуманітарний університет Міністерства освіти і науки України²

Резюме. Досліджено дію 0,1 % розчину герматранолу в ліпосомальній емульсії в організмі щурів на процеси пероксидного окиснення ліпідів та стан антиоксидантної системи. Встановлено, що германій у ліпосомальній емульсії має цитопротективну та антиоксидантну дію в організмі щурів на імунотетні клітини за умов ендотоксемії. Отримані дані можуть бути використані при конструюванні лікарської форми германію у ліпосомальній емульсії.

Мета дослідження – вивчити вплив герматранолу в ліпосомальній емульсії на процеси пероксидного окиснення ліпідів та стан антиоксидантної системи організму щурів.

Матеріали і методи. Дослід провели на двох групах статевозрілих нелінійних білих щурах масою тіла 120–130 г віком 2,3–3,0 місяці (по 5 тварин у групі) з однаковими умовами утримання. Тварини контрольної (першої) групи отримували стандартний раціон із згодовуванням гранульованого комбікорму впродовж усього періоду дослідження з вільним доступом до води. Тваринам дослідної (другої) групи вводили підшкірно 0,1 % розчин герматранолу в ліпосомальній емульсії у дозі 2,0 см³ 4 доби поспіль. Результати досліджень обробляли статистично з використанням програми Microsoft Excel 2003. Оцінку вірогідності здійснювали за критерієм Стьюдента, а результати середніх значень вважали статистично вірогідними при $p \leq 0,05$; $p \leq 0,01$ та $p \leq 0,001$.

Результати. За результатами дослідження встановлено, що після застосування ліпосомальної емульсії із герматранолом вміст гідропероксидів ліпідів в організмі відбувається вірогідне зниження ТБК-активних продуктів порівняно із показниками щурів контрольної групи. Також в організмі щурів відбувається активація антиоксидантної системи: ферментативна активність супероксиддисмутази та глутатіонпероксидази надала

The effect of germatranol in a liposomal emulsion on the processes of lipid peroxidation and the state of the antioxidant system of the rat body

Ya. S. Stravskyi¹, L. Ya. Fedoniuk¹, R. M. Sachuk²,
O. M. Yarema¹

I. Horbachevsky Ternopil National Medical University¹
Rivne State University of Humanities Ministry of Education and Science of Ukraine²

e-mail: stravskyi@tdmu.edu.ua

Summary. It was studied the effect of a 0.1 % solution of germatranol in a liposomal emulsion on the processes of lipid peroxidation and the state of the antioxidant system in the body of rats. It was established, that germanium in liposomal emulsion has a cytoprotective and antioxidant effect in the body of rats on immunocompetent cells under conditions of endotoxemia. The obtained data will be used in the design of a dosage form of germanium in a liposomal emulsion.

The aim of the study – to learn the effect of germatranol in a liposomal emulsion on the processes of lipid peroxidation and the state of the antioxidant system of the rat body.

Materials and Methods. The experiment was conducted on two groups of sexually mature non-linear white rats with body weight 120–130 g, aged 2.3–3.0 months, (5 animals in a group), with the same housing conditions. Animals of the control (first) group received a standard diet with feeding granulated compound feed throughout the entire period of the experiment with free access to water. The animals of the experimental (second) group were injected subcutaneously with a 0.1 % solution of germatranol in a liposomal emulsion, in a dose of 2.0 cm³, for four days in a row. The results of the research were processed statistically using the program Microsoft Excel 2003. The probability assessment was carried out according to the Student's criterion, and the results of average values were considered statistically probable $p \leq 0.05$; $p \leq 0.01$ and $p \leq 0.001$.

Results. According to the results of the study, it was found that after the use of liposomal emulsion with germatranol, the content of lipid hydroperoxides in the body is likely to decrease with TBA-active products compared to the indicators of rats in the control group. Also, the antioxidant system is activation in the body of rats: the enzymatic activity of superoxide dismutase and glutathione

поштовх антиоксидантній системі організму щурів для боротьби з окиснювальним стресом і зменшила перебіг запального процесу в ушкоджених клітинах. Беручи до уваги те, що каталаза локалізується в пероксисомах, то герматранол у ліпосомальній емульсії активізував реакцію розщеплення надлишку пероксиду водню в організмі щурів. Таким чином, відбулась утилізація пероксиду в мітохондріях, мікросомах і пероксисомах.

Висновки. Застосування щурам 0,1 % розчину герматранолу в ліпосомальній емульсії сприяло вірогідному зниженню ТБК-активних продуктів на 18,0 % в їх організмі проти показників контрольної групи та активність антиоксидантного захисту організму, про що свідчить вірогідне підвищення активності супероксиддисмутази на 12,0 %, глутатіонпероксидази – на 30,0 % та каталази – на 22,0 %.

Ключові слова: германій; ліпосоми; щури; пероксидне окиснення ліпідів; антиоксидантна система.

ВСТУП

Германій – мікроелемент, який часто використовують для корекції імунобіологічної реактивності та антиоксидантної системи організму людини при різних захворюваннях [1, 2]. Результати досліджень [3, 4] показали цитопротективну дію нанопрепарату германію на імунотропні клітини за умов ендотоксемії.

Органогерманій знижує рівень пероксидного окиснення ліпідів у плазмі, тканинах печінки, мозку та захищає клітинну мембрану від ушкоджень, суттєво збільшує активність гідропероксидів (ГП) і супероксиддисмутази (СОД) та зменшує кількість вільних радикалів у печінці та нирках [4].

Необхідно відмітити, що нині дуже важливим є питання пошуку технологічних методів доставки препаратів германію з метою покращання ефективності їх дії та підвищення безпеки.

Особливе місце в сучасних системах доставки ліків займають ліпосомальні наночастинки, які мають низку безсумнівних переваг порівняно з наночастинками іншої природи [5].

Ліпосоми є продуктами нанобіотехнологій у формі наносфери водної субстанції у ліпідній оболонці [6–8]. Відомо, що фосфоліпіди, які є основними компонентами клітинних мембран, здатні утворювати у воді замкнуті мембранні оболонки. Ці оболонки захоплюють у себе частину водного розчину, а фосфоліпідна мембрана, яка їх формує, має властивості напівпроникного бар'єра [9].

Застосування ліпосом, які містять всередині водний розчин препаратів германію, забезпечує підвищення ефективності композиції, що в результаті призводить до можливості зниження концентрації діючих речовин через високе засвоєння [10–12].

Вільнорадикальне пероксидне окиснення практично на усіх етапах свого перебігу утворює ряд продуктів, що є результатом взаємодії вільних радикалів

peroxidase boosted the antioxidant system of the body of rats to combat oxidative stress and reduced the course of the inflammatory process in damaged cells. Taking into account the fact that catalase is localized in peroxisomes, germatranol in liposomal emulsion activated the reaction of splitting excess hydrogen peroxide in the body of rats. In this way, peroxide was utilized in mitochondria, microsomes, and peroxisomes.

Conclusions. The use of 0.1 % germatranol solution in a liposomal emulsion to rats contributed to a probable reduction of TBA-active products by 18.0 % in their body compared to the indicators of the control group and the activity of the body's antioxidant protection, as evidenced by a probable increase in the activity of superoxide dismutase by 12.0 %, glutathione peroxidase by 30.0 %, and catalase by 22.0 %.

Key words: germanium; liposomes; rats; lipid peroxidation; antioxidant system.

між собою та біологічними макромолекулами. Отже, за рівнем даних продуктів можна судити про інтенсивність ВРПО в різних біологічних системах і тканинах організму, тобто вони можуть бути своєрідними біомаркерами ушкодження тканин [13]. На утворення в організмі продуктів пероксидного окиснення ліпідів активізує свою роботу антиоксидантна система.

Нині надзвичайно важливими є питання підбору препаратів з антиоксидантними властивостями та способів їх доставки у місце патології.

Метою дослідження було вивчити вплив герматранолу в ліпосомальній емульсії на процеси пероксидного окиснення ліпідів та стан антиоксидантної системи організму щурів.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Ліпосоми отримували на ультразвуковому диспергаторі УЗДН-А за робочої частоти 22 кГц. У початкову ліпідну суміш вводили холестерол (до 40 %), що надає мембранам підвищеної міцності. Внутрішній водний об'єму ліпосом сформований із 0,1 % розчину герматранолу.

Дослід провели на двох групах статевозрілих нелінійних білих щурах масою тіла 120–130 г віком 2,3–3,0 місяці (по 5 тварин у групі) з однаковими умовами утримання. Тварини контрольної (першої) групи отримували стандартний раціон із згодовуванням гранульованого комбікорму впродовж усього періоду дослідження з вільним доступом до води. Тваринам дослідної (другої) групи вводили підшкірно 0,1% розчин герматранолу в ліпосомальній емульсії у дозі 2,0 см³ 4 доби поспіль.

Вміст гідропероксидів ліпідів визначали шляхом осадження білків розчином трихлороцтової кислоти та екстракцією ліпідів етанолом із наступною взаємодією досліджуваних екстрактів з тіоціанатом амонію, а концентрацію вторинних продуктів

пероксидації (ТБК-активні продукти) – в реакції з тіобарбітуровою кислотою [14].

Активність глутатіонпероксидази визначали за швидкістю окиснення відновленого глутатіону до і після інкубації із гідропероксидом третинного бутілу за допомогою кольорової реакції з 5,5-дитіобіс-2-нітробензойною кислотою, унаслідок чого утворюється забарвлений продукт – тіонітрофенільний аніон [15]. Активність каталази визначали за методом, який базується на здатності пероксиду водню утворювати з молібдатом амонію стійкий забарвлений комплекс із максимумом поглинання за довжини хвилі 410 нм. Активність супероксиддисмутази визначали методом, який базується на її здатності сповільнювати відновлення безколірної тетразолієвої солі супероксидними аніонрадикалами, в присутності яких відбувається їх перетворення в забарвлені сполуки (формазани) [15].

Інтерпретацію отриманих результатів досліджень проведено з урахуванням даних літератури. Результати досліджень обробляли статистично [28] з використанням програми Microsoft Excel 2003. Оцінку вірогідності здійснювали за критерієм Стьюдента, а результати середніх значень вважали статистично вірогідними при $p \leq 0,05$; $p \leq 0,01$ та $p \leq 0,001$.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ

З даних, наведених у таблиці, видно, що після застосування ліпосомальної емульсії із герматранолом вміст гідропероксидів ліпідів в організмі щурів невірогідно підвищився на фоні вірогідного зниження ТБК-активних продуктів на 18,0 % ($p < 0,05$) проти показників контрольної групи. Отримані дані свідчать, що до застосування герматранолу в ліпосомальній емульсії вміст ТБК-активних продуктів в організмі щурів був підвищеним, а германол у ліпосомальній емульсії сприяв зниженню ТБК-активних продуктів.

Необхідно зазначити, що захист організму від ушкоджень продуктами вільнорадикальних реакцій здійснюється за участю багатокомпонентної антиоксидантної системи, яка є потужним механізмом, що запобігає розвитку лавиноподібних вільнорадикальних та пероксидних реакцій в організмі [14]. Антиоксиданти можуть знешкоджувати вільні радикали ще до моменту реалізації їх руйнівної дії.

Супероксиддисмутаза – антиоксидантний фермент, який виробляє кожна клітина в організмі, що зменшує потенційно шкідливі вільні радикали кисню, клітини, які утворюються під час нормальної метаболічної активності. Так, після застосування герматранолу в ліпосомальній емульсії активність супероксиддисмутази як показника зросла з $(1,77 \pm 0,02)$ до $(1,99 \pm 0,01)$ ум. од./мг протеїну, що становить 12,0 % ($p < 0,05$). Беручи до уваги те, що супероксиддисмутаза каталізує дисмутацію супероксиду в кисень та пероксид водню, то в організмі щурів відбулась активація антиоксидантної системи, що призвело до антиоксидантного захисту практично усіх клітин, які так чи інакше знаходилися в контакті з киснем. Отже, ферментативна активність супероксиддисмутази дала поштовх антиоксидантній системі організму щурів боротися з окиснювальним стресом і зменшила перебіг запального процесу (табл.).

Крім цього, підвищення активності супероксиддисмутази, після застосування герматранолу створило підґрунтя та сприяло активації антиоксидантних ферментів, таких, як каталаза та глутатіонпероксидаза, які необхідні для нейтралізації активних форм кисню, що дозволяє запобігати розвитку окиснювального стресу і призводить до зменшення запального процесу.

Ліпосомальна емульсія з герматранолом сприяла підвищенню активності глутатіонпероксидази зросла з $(47,13 \pm 1,11)$ до $(61,22 \pm 0,12)$ нмоль/хв/мг протеїну, що склало 30,0 % ($p < 0,05$). Це свідчить про інактивацію активних форм кисню в їх організмі. Підвищення активності даного ферменту в організмі щурів створює підґрунтя для відновлення пероксиду водню до води та ліпідних гідропероксидів у відповідні спирти за допомогою глутатіону (гамма-глутамілцистеїнілгліцину або GSH). Сульфгідрильна група GSH окиснюється до дисульфідної форми, віддаючи електрони пероксиду водню або гідропероксиду ліпиду. Підвищення активності глутатіонтрансферази в організмі щурів запобігало деструктивному впливу оксидативного стресу щодо продуктів пероксидного окиснення ДНК та ліпідів. Крім цього, глутатіонтрансфераза, каталізуючи реакції зв'язування GSH з різними токсичними речовинами екзогенного та ендогенного походження, ініціювала активацію антиоксидантної системи організму щурів.

Таблиця. Вміст продуктів пероксидного окиснення ліпідів та антиоксидантна активність крові щурів після застосування герматранолу в ліпосомальній емульсії ($M \pm m$, $n=5$)

Група	Показник крові				
	гідропероксиди ліпідів, од.Е 480/мл	ТБК-активні продукти, нмоль/мл	супероксиддисмутаза, ум. од./мг протеїну	глутатіонпероксидаза, нмоль/хв/мг протеїну	активність каталази, ммоль/мг протеїну/хв
Контрольна	$0,86 \pm 0,02$	$5,28 \pm 0,04$	$1,77 \pm 0,02$	$47,13 \pm 1,11$	$4,45 \pm 0,01$
Дослідна	$0,92 \pm 0,02$	$4,47 \pm 0,03^*$	$1,99 \pm 0,01^*$	$61,22 \pm 0,12^{***}$	$5,42 \pm 0,03^{**}$

Примітка. * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ порівняно з контрольною групою.

Після застосування ліпосомальної емульсії із герматранолом в організмі щурів дослідної групи відбулось підвищення активності каталази на 22,0 % ($p < 0,01$). Активація каталази свідчить про те, що в організмі щурів пероксид водню швидко перетворюється в інші, менш небезпечні речовини (воду та кисень). Таким чином відбувається процес запобігання руйнування клітин і тканин за перебігу процесу пероксидного окиснення ліпідів. Саме з цим завданням справляється фермент каталаза – він розкладає молекули пероксиду до двох молекул води і молекули кисню. Молекулярний механізм розщеплення пероксиду водню ферментом каталазою поки точно не вивчений. Однак передбачається, що реакція проходить у два етапи на першому етапі ферум у складі протетичної групи каталази зв'язується з атомом кисню пероксиду, при цьому виділяється одна молекула води. На другому етапі окиснений гем взаємодіє з іншою молекулою пероксиду водню, у результаті чого утворюється ще одна молекула води й одна молекула кисню.

Беручи до уваги те, що каталаза локалізується в пероксисомах [14], то герматранол у ліпосомальній емульсії активізував реакцію розщеплення над-

лишку пероксиду водню в організмі щурів. Якщо генерація та каталітичне розщеплення H_2O_2 в клітині є процесами цілеспрямованими і жорстко детермінованими, а каталаза здійснює каталітичне розщеплення H_2O_2 , то відбулась утилізація пероксиду в мітохондріях, мікросомах і пероксисомах.

Дані, які ми отримали, дають можливість стверджувати, що глутатіонпероксидазна і каталазна функції ферменту взаємопов'язані, й активація глутатіонпероксидазної активності завжди супроводжується незначним зниженням каталазної функції.

ВИСНОВКИ

1. Застосування щурам 0,1 % розчину герматранолу в ліпосомальній емульсії сприяло вірогідному зниженню ТБК-активних продуктів на 18,0 % в їх організмі проти показників контрольної групи.

2. Застосування щурам 0,1 % розчину герматранолу в ліпосомальній емульсії активує антиоксидантний захист організму, про що свідчить вірогідне підвищення активності супероксиддисмутази на 12,0 %, глутатіонпероксидази – на 30,0 % та каталази – на 22,0 %.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Haematological and biochemical parameters of the F2 rats' organism in a period of prolonged watering of nano-Ge citrate / R. S. Fedoruk, U. I. Tesarivska, M. I. Khrabko [et al.] // *Animal Biol.* – 2017. – Vol. 19 (3). – P. 115–121.
2. Ruan T. Advances in effect of germanium or germanium compounds on animals – A review / T. Ruan, Y. Lyu, B. Wu // *Biosci. and Med.* 2017. – Vol. 5 (7). – P. 56–73.
3. Протективна дія цитрату германію на функціональний стан імункомпетентних клітин та активність нейтрофілів при запаленні, індукованому ліпополісахаридом / Н. Г. Грушка, С. І. Павлович, О. А. Кондрацька [та ін.] // *Фізіологічний журнал.* – 2019. – Т. 65, № 6. – С 43–50.
4. Вивчення антиоксидантних властивостей комплексу германію з ніотиновою кислотою (МІГУ-1) за умов експериментальної хронічної серцевої недостатності / І. В. Ніженковська, В. П. Сейфулліна, О. Е. Нароха [та ін.] // *Фармакологія та лікарська токсикологія.* – 2016. – № 2 (48). – С 74–76.
5. Effect of different drying techniques on bioactive components, fatty acid composition, and volatile profile of robusta coffee beans / D. Wenjiang, H. Rongsuo, C. Zhong, Z. Jianping // *Food Chemistry.* – 2017. – P. 234.
6. Стадніченко О. В. Дослідження складу ліпідної мембрани при створенні ліпосом із іринотеканом / Ю. М. Краснопольський, Т. Г. Ярних // *Фармацевтичний часопис.* – 2017. – № 1. – С. 22–27.
7. Косінов М. В. Ліпосомна композиція мікроелементів / М. В. Косінов, В. Г. Каплуненко. Патент України на корисну модель № 54721. МПК (2009): А61К 9/127, А61К 9/28, А23Л 1/30. Опубл. 25.11.2010. – Бюл. № 22/2010.
8. Косінов М. В. Надчистий водний розчин карбоксилату металу / М. В. Косінов, В. Г. Каплуненко. Патент

України на корисну модель № 52531. МПК (2009): С07С 51/41, С07F 5/00, С07F 15/00, С07С 53/126 (2006.01), С07С 53/10 (2006.01), А23Л 1/00, В82В 3/00. Опубл. 25.08.2010. – Бюл. № 16 /2010.

9. Косінов М. В. Дезінфектант на ліпосомальній основі / М. В. Косінов, В. Г. Каплуненко. Патент України на корисну модель № 53991. о МПК (2009): С09D 5/14, С02F 1/50, А61L 2/16, А61К 31/155, А61К 8/14, А61R 31/04 (2006.01). Опубл. 25.10.2010. – Бюл. № 20/2010.

10. Наноматериали и нанотехнологии в ветеринарной практике / В. Г. Каплуненко, Н. В. Косінов, К. Н. Васильевич [и др.]. – К. : ВД «Авіцена», 2012. – 512 с.

11. Левченко В. І. Дослідження крові тварин та клінічна інтерпретація отриманих результатів / В. І. Левченко, В. М. Соколюк, В. М. Безух. – К. : Біла Церква, 2002. – 54 с.

12. Шербан Н. Г. Лабораторные методики для изучения состояния антиоксидантной системы организма и уровня перекисного окисления липидов. *Organizma* : метод. реком. для докторантов, аспирантов, магистров, исполнителей НИР / Н. Г. Шербан, Т. В. Горбач, Н. Р. Гусева. – Харьков, ХГМУ, 2004. – 36 с.

13. Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in sturgeon *Acipenser naccarii* and trout *Oncorhynchus mykiss*. [Electronic resource] // *A comparative study.* – P.169–174. <http://oaji.net/articles/2015/2115-1434956789.pdf>.

14. Левченко В. І. Ветеринарна клінічна біохімія / В. І. Левченко, В. В. Влізло, І. П. Кондрахін. – К. : Біла Церква, 2002. – 399 с.

15. Влізло В. В. Лабораторні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині: довідник / В. В. Влізло, Р. С. Федорук, І. Б. Ратич. – Львів : СПОЛОМ, 2012. – 764 с.

REFERENCES

1. Fedoruk RS, Tesarivska UI, Khrabko MI, Tsap MM, Dolaychuk OP, Kropyvka SI. [Haematological and biochemical parameters of the F2 rats' body in a period of prolonged watering of nano-Ge citrate]. *Animal Biol* 2017; 19(3): 115-21.
2. Ruan T, Lyu YU, Vu B. Advances in effect of germanium or germanium compounds on animals – A review. *Biosci and Med*. 2017;5(7): 56-73.
3. Hrushka NH, Pavlovych SI, Kondratska OA, Pilkevych NO, Yanchiy RI. [The protective effect of germanium citrate on the functional state of immunocompetent cells and the activity of neutrophils in a coated, induced lipopolysaccharide]. *Fiziolohichniy zhurnal*. 2019; 65(6):43-50. Ukrainian.
4. Nizhenkovska IV, Seyfullina VP, Narokha OE, Martsynko OE, Chebanenko OA. [Study of antioxidant properties of germanium complex with nicotinic acid (MIGU-1) under conditions of experimental chronic heart failure]. *Farmakolohiia ta likarska toksykolohiia*. 2016;2(48): 74-6. Ukrainian.
5. Wenjiang D, RongsuoH, Zhong C, Jianping Z. [Effect of different drying techniques on bioactive components, fatty acid composition, and volatile profile of robusta coffee beans]. *Food Chemistry*. 2017; 234.
6. Stadnichenko OV, Krasnopol's'kyu YuM, Yarnykh TH. [Study of the composition of the lipid membrane during the creation of liposomes with irinotecan]. *Farmatsevychnyi chasopys*. 2017;1: 22-7. Ukrainian.
7. Kosinov MV, Kaplunenko VH. [Liposomal composition of trace elements]. UA 54721. 2010 Nov 25. Ukrainian.
8. Kosinov MV, Kaplunenko VH. [Ultrapure aqueous solution of metal carboxylate]. UA52531. 2010. Ukrainian.
9. Kosinov MV, Kaplunenko VH. [Disinfectant on a liposomal basis]. UA 53991. 2010 Aug 25. Ukrainian.
10. Borysevych VV, Kaplunenko VH, Kosynov NV. [Nanomaterials and nanotechnologies in veterinary practice]. 2012. Ukrainian.
11. Levchenko VI, Sokolyuk VM, Bezukh VM. [Examination of animal blood and clinical interpretation of the obtained results]. 2002. Ukrainian.
12. Sherban NG, Gorbach TV, Guseva NR. [Laboratory methods for studying the state of the antioxidant system of the body and the level of lipid peroxidation. organizma: Guidelines for doctoral students, graduate students, masters, R&D performers]. 2004. Ukrainian.
13. Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in sturgeon *Acipenser naccarii* and trout. *Oncorhynchus mykiss*. <http://oaji.net/articles/2015/2115-1434956789.pdf>
14. Levchenko VI, Vlizlo VV, Kondrakhin IP. [Veterinary clinical biochemistry]. 2002;399. Ukrainian.
15. Vlizlo VV, Fedoruk RS, Ratykh IB. [Laboratory research methods in biology, animal husbandry and veterinary medicine: a handbook]. 2012. Ukrainian.