ВІСНИК
КИЇВСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОГО УНІВЕРСИТЕТУ ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

ISSN 1728-2748

БІОЛОГІЯ 61/2012

Засновано 1958 року

Подано експериментальні дані про особливості будови, розвитку і функціонування рослинних і тваринних організмів, флору і фауну України, одержані на основі досліджень, що проводяться науковцями біологічного факультету в галузях фізіології рослин і тварин, генетики, ботаніки, зоології, мікробіології, вірусології. Викладено також нові дані стосовно біохімічних і біофізичних основ регуляції у клітинах і органах у нормі й після впливу різноманітних фізико-хімічних факторів, наведено результати нових методичних розробок.

Для наукових співробітників, викладачів, аспірантів і студентів.

Collection of articles written by the scientists of biological faculty contains data on research in molecular biology, physiology, genetics, microbiology, virology, botanics, zoology concerning the structure, development and function of the plant and animal organisms, flora and fauna of Ukraine. Results of newly developed biophysical methods of biological research, biochemical data regarding metabolic 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. Торгало, канд. біол. наук (відп. секр.).; Т.В. Берегова, д-р біол. наук, проф.; В.К. Рибальченко, д-р біол. наук, проф.; В.С. Мартинюк, д-р біол. наук, проф.; С.В. Демидов, д-р біол. наук, проф.; М.Е. Дзержинський, д-р біол. наук, проф.; М.С. Мірошниченко, д-р біол. наук, проф.; М.М. Мусієнко, д-р біол. наук, проф., чл.-кор. УААН; В.К. Позур, д-р біол. наук, проф.; І.Ю. Костіков, д-р біол. наук, доц.; В.В. Серебряков, д-р біол. наук, проф.; М.Ю. Макарчук, д-р біол. наук, проф.; В.П. Поліщук, д-р біол. наук, проф.**
Адреса редколегії	**03187, Київ-33, просп. акад. Глушкова, 2, корп. 12, ННЦ "Інститут біології"; ☎ (38044) 522 17 95**
Затверджено	**Вченою радою біологічного факультету 23.01.12 (протокол № 7)**
Атестовано	**Вищою атестаційною комісією України. Постанова Президії ВАК України № 1-05/7 від 09.06.99**
Зареєстровано	**Міністерством юстиції України. Свідоцтво про державну реєстрацію КВ № 16053-4525 ПР від 09.11.09**
Засновник та видавець	**Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет". Свідоцтво внесено до Державного реєстру ДК № 1103 від 31.10.02**
Адреса видавця	**01601, Київ-601, б-р Т.Шевченка, 14, кімн. 43 ☎ (38044) 239 31 72, 239 32 22; факс 239 31 28**

© Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет", 2012

ЗМІСТ

Варенюк І., Нужина Н., Янко Р., Дзержинський М.
Морфологічна характеристика гіпоталамо-тиреоїдної системи птахів
після однократного введення мелатоніну в різний час доби
при блокованих дофамінових *D2*-рецепторах 4

Цейслер Ю., Мартинюк В., Лук'яненко І.
Неорганічні поліфосфати як незамінні структурні компоненти живих організмів 6

Глотова Н., Куцоконь Ю., Подобайло А.
Розподіл дрібнорозмірного рибного населення на мілководдях річки Удай
в межах НПП "Пирятинський" 10

Щербакова Ю., Джаган В.
Ранньолітні гриби Свидовецького масиву Карпатського біосферного заповідника 12

Бурхан А., Ромашов С., Семчук Л.
Взаємовплив антагоністів фага *8573sm* та його хазяїна Pseudomonas *fluorescens 8573*
при їх експериментальній коеволюції 15

Пустовалов А., Матвієнко М., Дзержинський М.
Вплив стресу на морфометричні параметри функціональної активності астроцитів
і нейроцитів аркуатного ядра гіпоталамуса щурів на різних стадіях естрального циклу 17

Пусь А., Юрченко О., Скрипник Н.
Вивчення особливостей пухлинних клітин при набутті фенотипу лікарської резистентності 20

Білан О., Шевченко О., Поліщук В.
Розвиток вірусної інфекції в модельній системі
"NICOTIANA TABACUM CV. SAMSUN – вірус тютюнової мозаїки"
під впливом ультрафіолетового випромінювання 22

Бурлова-Васильева Н., Савчук О., Остапченко Л.
Застосування методу агрегометрії для вивчення впливу
на тромбоцити біологічно активних сполук 24

Серга С., Демидов С., Крамаренко С., Козерецька І.
Ендосимбіотичні бактерії роду *Wolbachia* та мутаційні процеси у *Drosophila melanogaster* 26

Турчик А., Серебряков В.
До орнітофауни тетіївського району Київської області 29

Охрей А., Куценко Т., Макарчук М.
Міжпівкульна взаємодія головного мозку у музикантів і не музикантів
при сприйнятті звукових стимулів і тестуванні оперативної пам'яті 31

Тимошенко М., Гайда Л., Кравченко О., Остапченко Л.
Вміст різних форм глутатіону та активність глутатіонредуктази
в клітинах слизової оболонки шлунка за умов експериментального гастроканцерогенезу 34

Афіцька К., Кухарський В., Толстанова Г.
Активація *ERK1/2* та *p-38 MAP*- кіназних шляхів у товстій кишці щурів за дії стресу 37

Лисенко Я., Кравченко В.
Порівняльний аналіз психофізіологічних функцій студентів,
що навчаються за освітньо-кваліфікаційними рівнями "спеціаліст" та "магістр" 39

Дворщенко К., Вакал С., Гайда Л., Остапченко Л.
Антиоксидантні ефекти мультипробіотику Симбітер у підшлунковій залозі щурів
за умов гіпоацидного стану 42

Кубайчук К., Мінченко Д., Ратушна О., Мінченко О.
Вплив гіпоксії та ішемії на експресію проангіогенних генів у клітинах гліоми *U87*
з пригніченною функцією гена *ERN1* 46

Пашук К., Насирова Г.
Вплив соєвого ізоляту на протеоліз у сирному тісті 50

Лисенко О.
Вплив концентрації CO2 і O2 на структуру дихальної реакції
за умов фізичних навантажень різного ґенезу 52

CONTENTS

Varenyuk I. Nuzhuna N., R. Janko, Dzerzhinsky M.
Morphological characteristics of the hypothalamic-thyroid system of birds
after a single dose of melatonin at different times of day when blocked dopamine D2 receptors 4

Tseysler Yu, Martyniuk W., Luk'yanenko I.
Inorganic polyphosphates as essential structural components of living organisms 6

Glotova N., Kutsokon' Y., Podobaylo A.
Distribution of fine-sized fish populations in shallow waters
of the river Uday within the NNP "Pyryatyn" 10

Shcherbakov Yu, Dzagan V.
Rannolitni mushrooms Svydovets array Carpathian Biosphere Reserve 12

Burhan A., Romashov S., Semchuk L.
Mutual interference antagonists 8573sm phage and its host Pseudomonas fluorescens 8573
when their experimental coevolution 15

Pustovalov A., Matvienko M., Dzerzhinsky M.
Effect of stress on the morphometric parameters of functional activity of astrocytes
and neyrotsytiv arkuatnoho nucleus of the hypothalamus of rats at different stages of oestrous cycle 17

Pus' A., Urchenko O., Skrypnyk N.
Study characteristics of tumor cells in acquiring drug resistance phenotype 20

Bilan A., Shevchenko O., Polishchuk V.
Development of viral infection in a model system "NICOTIANA TABACUM CV. SAMSUN –
tobacco mosaic virus "under the influence of ultraviolet radiation 22

Burlova-Vasilieva N., Savchuk O., Ostapchenko L.
Application of the method ahrehometriyi to study effects
on platelets of biologically active compounds 24

Serga S., Demidov S., Kramarenko S., Kozeretska I.
Endosymbiotychni bacteria genus Wolbachia and mutational processes
in Drosophila melanogaster 26

Turchik A., Serebryakov V.
By avifauna Tetiivskyi region 29

Ohrey A. Kutsenko T., Makarchuk M.
'Interhemispheric interaction of the brain in musicians and artists
in the perception of sound stimuli and test RAM memory 31

Tymoshenko M., Gajda L., Kravchenko O., Ostapchenko L.
The content of various forms of glutathione and hlutationreduktazy activity
in cells of gastric mucosa under the experimental hastrokantserohenezu 34

Afits'ka K., Kuharskij V., Tolstanova G.
Activation of ERK1 / 2 and p-38 MAP-kinaznyh paths in the colon of rats with stress 37

Lusenko Ya., Kravchenko V.
Comparative analysis of the physiological functions of students enrolled
in educational and skill levels of "specialist" and "master" 39

Dvorshchenko K. Vakal S., Gayda L., Ostapchenko L.
Antioxidant effects multiprobiotics Symbiter in the pancreas of rats under conditions of hipoatsydnoho 42

Kubaichuk K., Minchenko D., Ratushna O., Minchenko O.
Effect of hypoxia and ischemia on the expression of pro-angiogenic genes
in U87 glioma cells with suppressed function of ERN1 gene 46

Pashuk K., Nasurova G.
Effect on soy isolate proteolysisin cheese daugh 50

Lysenko O.
Influence of CO2 and O2 on the structure of the respiratory response
under physical stress of various origins 52

УДК 591.147; 612.4

І. Варенюк, канд. біол. наук, Н. Нужина, канд. біол. наук,
Р. Янко, канд. біол. наук, М. Дзержинський, д-р біол. наук

МОРФОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ГІПОТАЛАМО-ТИРЕОЇДНОЇ СИСТЕМИ ПТАХІВ ПІСЛЯ ОДНОКРАТНОГО ВВЕДЕННЯ МЕЛАТОНІНУ В РІЗНИЙ ЧАС ДОБИ ПРИ БЛОКОВАНИХ ГАЛОПЕРИДОЛОМ ДОФАМІНОВИХ D2-РЕЦЕПТОРАХ

Показано, що частина ефектів мелатоніну на гіпоталамо-тиреоїдну та циркадну системи птахів у різний час доби може бути опосередкована дофамінергічною системою головного мозку через дофамінові D2-рецептори. Проте в більшості випадків дофамінові D2-рецептори не задіяні в опосередкуванні ефектів мелатоніну на ці системи.

It was shown that dopamine via D2-receptors partially mediate the influence of melatonin on hypothalamic-pituitary-thyroid and circadian systems in bird. But in most cases dopaminergic D2-receptors do not mediate the influence of melatonin on these systems.

Вступ. Ендокринні залози, однією з яких є щитоподібна залоза, відіграють значну роль в онтогенезі тваринного організму. Так, гормони щитоподібної залози посилюють енергетичний обмін, активізують окислювальні процеси, збільшують основний обмін, посилюють використання організмом вуглеводів, жирів та білків [2]. Відомо, що активність щитоподібної залози перебуває під контролем гіпофіза та гіпоталамуса, а вони, в свою чергу, під контролем позагіпоталамічних структур мозку [2]. До таких структур відноситься й епіфіз, гормон якого мелатонін вважають координатором добових та сезонних ритмів активності цих залоз. Існує тісна взаємодія між мелатоніном і дофаміном [5, 6, 8, 9]. Крім того, є думка, що частина ефектів мелатоніну на систему: гіпоталамус-гіпофіз-периферичні ендокринні залози може бути реалізована через дофамінергічну систему головного мозку; зокрема, така дія показана для гіпоталамо-гонадної системи [7, 10]. Для з'ясування можливості такої дії мелатоніну на гіпоталамо-тиреоїдну систему та дослідження ролі в цьому процесі дофамінових D2-рецепторів і проведено дане дослідження. Вибір птахів в якості об'єкта досліджень обумовлений значно гіршим порівняно із ссавцями станом вивчення цієї проблеми.

Об'єкт, матеріали та методи досліджень. Дослідження було проведено на самцях японських перепелів (*Coturnix japonica*) 5-тижневого віку. Птахів утримували в умовах одного віварію на стандартному раціоні (їжа – комбікорм пташиний виробництва Київського комбікормового заводу, вода – ad libitum), температура – +22-23 ºС. Світловий режим: 14 годин – світло (з 7 до 21 години), 10 годин – темрява (з 21 до 7 години).

Було сформовано 16 експериментальних груп по 5 птахів у кожній групі. Їм у відповідний час доби одноразово давали: 1.) фізіологічний розчин перитонеально о 7:00 в кількості 0,2 мл на птаха; 2.) галоперидол (блокатор дофамінових D2-рецепторів) перитонеально о 6:00 в дозі 30 мкг (тут і далі всі дози вказані з розрахунку на 100 г маси тіла); 3.) мелатонін перорально о 7:00 в дозі 10 мкг; 4.) галоперидол перитонеально о 6:00 в дозі 30 мкг і мелатонін перорально о 7:00 в дозі 10 мкг; 5.) фізіологічний розчин перитонеально о 13:00 в кількості 0,2 мл на птаха; 6.) галоперидол перитонеально о 12:00 в дозі 30 мкг; 7.) мелатонін перорально о 13:00 в дозі 10 мкг; 8.) галоперидол перитонеально о 12:00 в дозі 30 мкг і мелатонін перорально о 13:00 в дозі 10 мкг; 9.) фізіологічний розчин перитонеально о 19:00 в кількості 0,2 мл на птаха; 10.) галоперидол перитонеально о 18:00 в дозі 30 мкг; 11.) мелатонін перорально о 19:00 в дозі 10 мкг; 12.) галоперидол перитонеально о 18:00 в дозі 30 мкг і мелатонін перорально о 19:00 в дозі 10 мкг; 13.) фізіологічний розчин перитонеально о 1:00 в кількості 0,2 мл на птаха; 14.) галоперидол перитонеально в 0:00 в дозі 30 мкг; 15.) мелатонін перорально о 1:00 в дозі 10 мкг; 16.) галоперидол перитонеально в 0:00 в дозі 30 мкг і мелатонін перорально о 1:00 в дозі 10 мкг. Галоперидол розчиняли у фізіологічному розчині, а мелатонін замішували у борошняні кульки.

Через 2 години після введення відповідного препарату птахів декапітували (групи 1-4 – о 9:00, групи 5-8 – о 15:00, групи 9-12 – о 21:00, групи 13-16 – о 3:00).

Для досліджень брали гіпоталамічну область мозку, епіфіз та щитоподібну залозу, які фіксували в рідині Буена. Потім отриманий матеріал заливали в парафін і виготовляли парафінові зрізи товщиною 5-6 мкм. Зрізи гіпоталамуса фарбували за методикою Ніссля, зрізи епіфіза – гематоксиліном Бемера, зрізи щитоподібної залози – гематоксиліном Бемера й еозином [4].

Гістологічні препарати аналізували на світловому мікроскопі за допомогою окуляр-мікрометра МОВ-1-15х і морфометричної установки з використанням комп'ютерної програми Promorph-Paradise for Windows. На зрізах гіпоталамуса вимірювали діаметр ядер нейронів аркуатного, супрахіазматичного, паравентрикулярного, супраоптичного, вентромедіального і дорсомедіального ядер, на зрізах епіфіза – площу перетину ядер пінеалоцитів, на зрізах щитоподібної залози – висоту тиреоїдного епітелію та зовнішній діаметр фолікулів. Зростання діаметра чи площі перетину клітинних ядер нейроцитів гіпоталамічних ядер та пінеалоцитів епіфіза вважали свідченням зростання функціональної активності клітин відповідного гіпоталамічного ядра чи епіфіза, а зменшення діаметра чи площі перетину клітинного ядра вважали свідченням зниження функціональної активності клітин даної структури [3 – стор. 138]. Зростання висоти тироцитів та зменшення діаметра фолікулів щитоподібної залози є, як відомо, свідченням зростання гормонпродукуючої функції даної залози; зменшення висоти тироцитів свідчить про зниження утворення тиреоїдних гормонів, а зростання діаметра фолікулів – про застій та зниження виділення цих гормонів [1 – стор. 501].

Статистичну обробку здійснювали методами варіаційної статистики за допомогою програмного забезпечення STATISTICA 5,0. Визначали достовірність різниці між контрольною та іншими групами у той самий час доби. Крім того, додатково порівнювали групу, яка отримувала мелатонін разом з галоперидолом, з групою, яка отримувала тільки мелатонін. Вірогідність різниці між порівнюваними групами оцінювали за t-критерієм Стьюдента. Вірогідною вважали різницю між порівнюваними показниками при $P<0,05$.

Результати досліджень та їх обговорення. Перш за все слід зазначити, що введення екзогенного мелатоніну справляє різний вплив на досліджені гіпоталамічні ядра, пінеалоцити епіфіза та структури щитоподібної залози залежно від часу доби, коли він був уведений. Так, вранці під впливом мелатоніну зростає діаметр нейронів супрахіазматичного й супраоптичного

© Варенюк І., Нужина Н., Янко Р., Дзержинський М., 2012

ядер гіпоталамуса і відсутні достовірні зміни решти морфометричних показників (табл. 1). Вдень спостерігається зростання площі перетину ядер пінеалоцитів, зростання діаметра ядер нейронів супрахіазматичного ядра і зниження діаметра ядер нейронів аркуатного ядра (табл. 1). Ввечері також зростає площа перетину ядер пінеалоцитів, а також – діаметр ядер нейронів супрахіазматичного, аркуатного і паравентрикулярного ядер гіпоталамуса (табл. 1). Вночі введення мелатоніну веде до зниження діаметра ядер нейроцитів супраоптичного, паравентрикулярного і вентромедіального гіпоталамічних ядер; проте має місце зростання діаметра ядер нейронів аркуатного ядра, площі перетину ядер пінеалоцитів і висоти тироцитів у щитоподібній залозі (табл. 1).

Блокада дофамінових D2-рецепторів галоперидолом або не впливає, або веде до зростання вимірюваних морфометричних параметрів активності гіпоталамо-тиреоїдної та циркадної систем (табл. 1). З цього можна зробити висновок, що в одних випадках через D2-рецептори передається гальмівний вплив дофаміну на ці системи, а в інших випадках D2-рецептори не задіяні в реалізації ефектів дофаміну.

***Таблиця* 1. Морфометричні показники епіфіза, гіпоталамічних ядер та щитоподібної залози після введення мелатоніну та галоперидолу в різний час доби**

Умови експерименту	Площа перетину ядер пінеало-цитів епіфіза, мкм^2	Діаметри ядер нейронів гіпоталамічних ядер, мкм						Висота тиро-цитів щито-подібної залози, мкм	Внутрішній діаметр фолікулів щито-подібної залози, мкм
		Супрахіаз-матичне ядро	Аркуатне ядро	Вентро-медіальне ядро	Дорсо-медіальне ядро	Паравен-трикулярне ядро	Супра-оптичне ядро		
ранкове введення препаратів									
фізіологічний розчин	19,8±0,7	7,2±0,2	7,7±0,1	6,5±0,1	6,7±0,1	10,7±0,1	10,0±0,1	5,2±0,2	42,0±0,7
мелатонін	19,1±0,2	8,0±0,1*	7,9±0,2	6,6±0,1	6,5±0,1	10,8±0,1	10,6±0,2*	5,0±0,1	38,0±1,0*
галоперидол	19,0±0,6	9,2±0,1*	7,8±0,1	6,7±0,1	6,6±0,1	10,8±0,1	10,4±0,1*	6,2±0,1*	40,0±1,1
галоперидол + мелатонін	19,2±0,5	8,2±0,1*	9,1±0,1*^	6,8±0,1	6,7±0,1	10,9±0,1	9,7±0,1	4,7±0,2*	39,3±0,7*
денне введення препаратів									
фізіологічний розчин	18,8±0,3	7,7±0,1	7,9±0,1	6,8±0,1	6,7±0,1	10,9±0,2	10,7±0,1	5,3±0,2	41,2±1,0
мелатонін	20,3±0,4*	8,6±0,1*	7,4±0,1*	6,6±0,1	6,8±0,1	11,2±0,1	11,0±0,1	4,9±0,1	39,8±1,0
галоперидол	19,5±0,5	9,0±0,1*	7,7±0,1	6,6±0,1	6,5±0,1	10,7±0,2	10,6±0,1	5,2±0,1	36,1±0,9*
галоперидол + мелатонін	19,7±0,4	9,4±0,1*^	9,8±0,2*^	7,2±0,2*^	6,5±0,1	10,8±0,1^	10,4±0,2	5,5±0,1^	35,7±0,8*^
вечірнє введення препаратів									
фізіологічний розчин	20,3±0,4	8,7±0,1	7,8±0,1	7,0±0,1	6,9±0,1	10,2±0,1	10,7±0,2	5,1±0,2	37,3±0,9
мелатонін	23,6±0,4*	9,5±0,1*	8,8±0,1*	6,8±0,1	6,9±0,1	11,0±0,1*	10,3±0,1	5,5±0,2	38,2±1,0
галоперидол	19,1±0,5	9,6±0,1*	8,2±0,1*	7,0±0,1	7,0±0,1	11,1±0,2*	11,4±0,1*	5,8±0,2*	33,9±1,2*
галоперидол + мелатонін	19,1±0,5^	8,3±0,1*^	9,1±0,2*	7,4±0,1*^	6,8±0,1	9,9±0,1^	11,0±0,2	5,3±0,1	38,7±1,0
нічне введення препаратів									
фізіологічний розчин	18,7±0,4	8,5±0,1	7,2±0,1	6,9±0,1	6,7±0,1	11,0±0,1	11,0±0,2	5,7±0,1	35,3±0,7
мелатонін	23,2±0,4*	8,5±0,2	7,6±0,1*	6,4±0,1*	6,5±0,1	10,4±0,2*	10,2±0,1*	6,3±0,2*	34,7±0,8
галоперидол	20,3±0,4*	8,9±0,1*	8,6±0,2*	7,0±0,2	7,2±0,1*	10,5±0,2*	11,3±0,1	5,5±0,1	36,2±0,9
галоперидол + мелатонін	19,2±0,5^	8,8±0,1*	9,2±0,1*^	6,7±0,1^	6,7±0,1	11,0±0,2^	10,3±0,1*	5,2±0,1*^	35,6±0,8

* – P<0,05 (порівняно з відповідним параметром у контрольній групі в той же час доби).

^ – P<0,05 (порівняно з відповідним параметром у групі, якій вводили лише мелатонін в той же час доби).

Введення мелатоніну після блокади дофамінових D2-рецепторів галоперидолом в більшості випадків не веде до достовірних змін вимірюваних морфометричних параметрів порівняно з тваринами, що отримували лише мелатонін без блокади D2-рецепторів (табл. 1). Ще в частині випадків існування достовірних відмінностей між впливом мелатоніну та впливом мелатоніну разом з галоперидолом може бути пояснене ефектом сумації або ж впливом самого галоперидолу. Наприклад, вдень достовірне зростання діаметра ядер нейронів супрахіазматичного ядра у перепелів, що отримували мелатонін разом з галоперидолом, порівняно з перепелами, що отримували тільки мелатонін може бути пояснене додатковим стимулюючим ефектом галоперидолу, адже у цей час доби даний морфометричний параметр зростає під впливом галоперидолу (табл. 1). Так само, кумулятивним стимулюючим ефектом можна пояснити і додаткове зростання діаметра ядер нейронів аркуатного ядра після нічного введення мелатоніну разом з галоперидолом порівняно з введенням самого мелатоніну (табл. 1).

Проте в ряді випадків різницю між введенням мелатоніну та введенням мелатоніну на фоні заблокованих галоперидолом дофамінових D2-рецепторів неможливо пояснити ефектом сумації чи впливом галоперидолу. Зокрема, в аркуатному ядрі гіпоталамуса введення мелатоніну вдень на фоні заблокованих галоперидолом дофамінових D2-рецепторів веде до зростання діаметра ядер нейронів цього ядра, на відміну від введення тільки мелатоніну, яке призвело до зниження вищезазначеного показника, і цю різницю ми не можемо пояснити впливом галоперидолу, оскільки його введення в цей час доби не веде до зміни діаметра ядер нейроцитів аркуатного ядра (табл. 1). А тому можна припустити існування взаємодії між дофаміном та галоперидолом в даному випадку. Схожою є ситуація для даного ядра і після ранкового введення мелатоніну на фоні блокади D2-рецепторів. Аналогічно у вентромедіальному ядрі зростання діаметра ядер нейронів цього ядра після денного та вечірнього введення мелатоніну при блокованих галоперидолом дофамінових D2-рецепторах також не може бути пояснене сумацією ефектів цих двох біологічно активних речовин, оскільки введення окремо

кожної з них не змінювало вищезазначений показник (табл. 1). В паравентрикулярному ядрі вечірнє введення мелатоніну і вечірнє введення галоперидолу веде до зростання діаметра нейросекреторних клітин цього ядра, а при їх сумарному введенні даний морфометричний параметр знижується (табл. 1). Подібним чином, нічне введення мелатоніну, як і нічне введення галоперидолу веде до зниження діаметра нейросекреторних клітин паравентрикулярного ядра, а при їх сумісній дії даний параметр не змінюється порівняно з контрольною групою, і є достовірно вищим порівняно з тваринами, які отримували тільки мелатонін (табл. 1). Також існуванням взаємодії між введенням екзогенного мелатоніну та блокадою дофамінових D2-рецепторів мабуть слід пояснювати і достовірне зниження площі перетину ядер пінеалоцитів та висоти тироцитів після введення мелатоніну разом з галоперидолом порівняно з введенням лише мелатоніну у нічний час доби.

Висновки: Таким чином, в більшості випадків ефекти мелатоніну на пінеалоцити епіфіза, гіпоталамічні ядра та щитоподібну залозу реалізовуються без залучення дофамінових D2-рецепторів. Проте частина ефектів мелатоніну на гіпоталамо-тиреоїдну та циркадну системи все ж може бути опосередкована дофамінергічною системою головного мозку, а дофамінові D2-рецептори можуть бути задіяними в реалізації цих ефектів.

1. Гистология, цитология и эмбриология. / Под. ред. Ю.И. Афанасьева, С.Л. Кузнецова, Н.А. Юриной. – М., 2004. 2. Балаболкин М.И. Эндокринология. – М., 1998. 3. Дзержинський М.Е., Скрипник Н.В., Островська Г.В., Гарматіна С.М., Пазюк Л.М., Бузинська Н.О., Варенюк І.М., Пустовалов А.С., Вороніна О.К.. Загальна цитологія та гістологія. – К., 2010. 4. Микроскопическая техника. / Под ред. Д.С. Саркисова, Ю.Л. Перова. – М., 1996. 5. Bartell P.A., Miranda-Anaya M., McIvor W., Menaker M. Interactions between dopamine and melatonin organize circadian rhythmicity in the retina of the green iguana // J. Biol. Rhythms.– 2007.– Vol. 22, № 6.– P. 515-523. 6. Kang S.W., Leclerc B., Mauro L.J., El Halawani M.E. Serotonergic and catecholaminergic interactions with co-localised dopamine-melatonin neurones in the hypothalamus of the female turkey // J. Neuroendocrinol. – 2009. – Vol. 21, № 1. – P. 10-19. 7. Kumar P., Pati A.K., Mohan J., Sastry K.V., Tyagi J.S., Chaturvedi C.M. Effects of simulated hypo- and hyper-reproductive conditions on the characteristics of circadian rhythm in hypothalamic concentration of serotonin and dopamine and in plasma levels of thyroxine, triiodothyronine, and testosterone in Japanese quail, Coturnix coturnix japonica // Chronobiol. Int. – 2009. – Vol. 26, № 1. – P. 28-46. 8. Nowak J.Z., Kazula A., Gołembiowska K. Melatonin increases serotonin N-acetyltransferase activity and decreases dopamine synthesis in light-exposed chick retina: in vivo evidence supporting melatonin-dopamine interaction in retina // J. Neurochem. – 1992. – Vol. 59, № 4. – P. 1499-1505. 9. Rudolf G., Vivien-Roels B., Pevet P., Kempf E., Wioland N. Dopamine and melatonin interactions in the intact chicken eye. Electrooculographic and biochemical study // Brain Res. – 1992. – Vol. 584, № 1-2. – P. 64-70. 10. Zisapel N. Melatonin-dopamine interactions: from basic neurochemistry to a clinical setting // Cell. Mol. Neurobiol. – 2001. – Vol. 21, № 6. – P. 605-616.

Надійшла до редколегії 10.11.11

УДК 577.1

Ю. Цейслєр, канд. біол. наук, В. Мартинюк, д-р біол. наук, І. Лук'яненко, асп.

НЕОРГАНІЧНІ ПОЛІФОСФАТИ ЯК НЕЗАМІННІ СТРУКТУРНІ КОМПОНЕНТИ ЖИВИХ ОРГАНІЗМІВ

Розглянуто питання про роль високомолекулярних неорганічних поліфосфатів в життєдіяльності організмів в залежності від рівня організації. Показано, що у більшості сучасних прокаріот та нижчих еукаріот поліфосфати виконують роль резерву фосфату та енергії. Високоорганізовані організми залучають поліфосфати до функції метаболічного, генетичного і структурного регулювання багатьох фізіологічних процесів: мембранного транспорту, експресії генів, активації ферментів, коагуляції крові.

The role of inorganic polyphosphates in the living organisms depending on their level of the organization is discussed. It is shown that polyphosphates are used as a reserve phosphate and energy in most prokaryotes and primitive eukaryotes. High organisms use polyphosphates for metabolic, genetic and structural regulation of many physiological processes: membrane transport, gene expression, activation of enzymes, blood coagulation.

Вступ. Клітини всіх живих організмів здатні в тій чи іншій мірі накопичувати найрізноманітніші запасні речовини, які є резервом і використовуються на певних етапах розвитку і функціонування організму. Так, наприклад, клітини мікроорганізмів у значній мірі залежні від постійно мінливих умов існування, отже без резервів життєво необхідних метаболітів неможливий розвиток їх наступних генерацій [37]. Давно відомо, що в клітинах мікроорганізмів часто, особливо в стаціонарну фазу розвитку (тобто після припинення або ослаблення активного росту і розвитку), накопичуються гранули, в склад яких входять різноманітні біополімери, у тому числі фосфорної кислоти, що відіграє найважливішу роль в біоенергетиці клітини. Гранули, що містять поліфосфати і відомі під назвою "тільця Ернеста-Бабеша", називаються *волютином*, або *метахроматином*. Вони були виявлені в клітинах бактерій ще в XIX столітті. Вперше вони описані у бактерії *Spirillum votutans.* Приблизно тоді ж (1890 рік) німецький біохімік Л. Ліберман виявив їх у дріжджів. Проте вивчення структури, функцій і біохімічних перетворень цих сполук почалося тільки в кінці 40-х і на початку 50-х років минулого століття [7]. Більшість досліджень була проведена на прокаріотах та нижчих еукаріотах. На сьогоднішній день завдяки роботам багатьох дослідницьких колективів [15, 28, 31, 38, 41] відомо, що високомолекулярні поліфосфати є важливими компонентами не виключно мікроорганізмів, а майже всіх живих істот, які знаходяться на різних стадіях біологічної еволюції. Їх кількість накопичення і значення визначаються особливостями самого організму, але їх роль у багатьох процесах особливо вищих еукаріот залишається все ще невідомою, тому дослідження останніх часів направлені на розкриття участі цих сполук у складних біохімічних механізмах організму людини і тварин.

Особливості будови та кількісний вміст неорганічних поліфосфатів. Поліфосфати є лінійними полімерами ортофосфорної кислоти, в яких фосфорні залишки зв'язані між собою фосфоангідридними зв'язками, які здатні до делокалізації енергії та виділенню великої її кількості при гідролізі цих зв'язків (~36,8 кДж при pH 5). Отже поліфосфати є макроергічними сполуками, які відіграють важливу роль в біоенергетиці живих клітин. Тому поліфосфати, подібно нуклеозидфосфатам, можуть бути як донором, так і акцептором фосфатних груп. Кількість фосфатних залишків в молекулах поліфосфатів, які присутні в живих клітинах, може змінюватися від 3 до 1000 [1]. Довжина ланцюгів поліфосфатів значно варіює у одного і того ж організму в залежності від умов навколишнього середовища та стадії онтогенетичного розвитку [2, 3, 6].

В організмах живих істот поліфосфати знаходяться у вигляді солей різних іонів металів (Ca^{2+}, Mg^{2+}, K^{+} і

© Цейслєр Ю., Мартинюк В., Лук'яненко І., 2012

т.д.), тобто вони є резервом цих іонів і регулюють їх рівень у клітинах [18].

Поліфосфати мають чітко виражену здатність до утворення комплексів з різними речовинами, наприклад, з білками. Комплекси поліфосфатів з деякими білками мають важливе регуляторне значення.

При фарбуванні поліфосфатів основними барвниками, такими як метиленовий синій або тулуїдиновий синій, для їх розчинів спостерігається явище метахромазії. На підставі цього поліфосфати називають метахроматиновими гранулами. Появу метахромазії обумовлює також зміна довжини ланцюга поліфосфату [27]. В окремих дослідженнях показано, що різне забарвлення в першу чергу залежить від концентрації поліфосфатів. Водночас з цим однією з причин метахромазії є також нелінійні зміни утворення моно-, ди- і тримерної форм барвника, асоційованого з поліфосфатами, при цьому в розчинах з низькою концентрацією полімеру і з відносно малою довжиною ланцюга домінують тримерні комплекси [9].

Поліфосфати зустрічаються в усіх групах організмів [14], однак найбільшим їх вмістом характеризуються бактерії, складаючи у деяких видів до 36% сухої маси. З підвищенням рівня організації вміст цих сполук різко знижується, так у нижчих еукаріот (дріжджів-сахароміцетів) їх вміст становить біля 20 % сухої маси, а у вищих рослин та вищих тварин – лише десяті або навіть соті долі проценту сухої маси їх клітин [7].

Поліфосфати бактерій. У бактерій, які належать до прокаріот, існує декілька різних шляхів використання поліфосфатів в життєдіяльності клітини. У групи еволюційно древніх бактерій (пропіонові бактерії, мікрококи, тетракоки, мікобактерії) відбувається використання високомолекулярних поліфосфатів замість АТФ для фосфорилювання глюкози у процесі гліколізу. У іншої групи пропіонових бактерій участь поліфосфатів знайдено в реакції на перших етапів окислення та розпаду глюкози, де вони утворюються замість АТФ, як у переважної більшості сучасних прокаріот. Але такі специфічні реакції зустрічаються лише в обмеженої кількості видів бактерій і вважаються еволюційно древніми, що з часом модифікувались у біохімічні реакції сучасних бактерій.

Отже, більшість нині існуючих прокаріот накопичують у волютинових гранулах осмотично інертні поліфосфати у комплексі з калієм, кальцієм та магнієм, які в першу чергу приймають участь в енергетичному метаболізмі клітини. Завдяки наявності таких ферментів, як поліфосфаткіназа і поліфосфат-АМФ-фосфотрансфераза поліфосфати залучені в регуляцію внутрішньоклітинної концентрації АТФ та інших нуклеозидфосфатів, а поліфосфатглюкокіназа використовує поліфосфати замість АТФ в реакціях трансфосфорилювання.

З іншого боку поліфосфати розглядаються як резерв фосфату, який завжди необхідний бактеріальній клітині для переживання стрес-умов, коли в середовищі існування може спостерігатися дефіцит фосфату. Перетворення резервних поліфосфатів у необхідні форми ортофосфату, які потім використовуються як будівельний матеріал для різних клітинних структур, головним чином – нуклеїнових кислот, здійснюється за допомогою ферменту екзополіфосфотази. Ще однією функцією поліфосфатів в бактеріальних клітинах є участь у мембранному транспорті, завдяки тому, що вони залучені до формування своєрідних каналоподібних мембранних структур, через які відбувається транспорт іонів та окремих фрагментів ДНК (плазмід) при передаванні певної інформації від однієї бактеріальної клітини іншій для придбання нових властивостей та підвищення резистентності, вірулентності та життєвої стійкості в цілому [7].

Крім перерахованих функцій у бактерій поліфосфати причетні до експресії генів [17], зокрема залучені в регуляцію синтезу РНК-полімерази [25], відповідальної за транскрипцію більш ніж 50 генів, продукти яких забезпечують стійкість до голодування, теплових впливів, окиснювальних, осмотичних та інших стресових умов, а також адаптацію в стаціонарній стадії росту [20, 24].

Певні бактерії здатні майже необмежено накопичувати в своїх клітинах поліфосфати з ортофосфатів навколишнього середовища. Такі їх можливості широко використовуються для очищення водоймищ та міських господарсько-побутових стоків від сполук, що містять фосфат, наприклад, миючих засобів. Вперше бактеріальна очистка стічних вод була запропонована ще в 1865 р. А. Мюлером [1]. На сьогоднішній день даний спосіб є загальноприйнятим.

Отже поліфосфати прокаріот приймають участь у метаболічних процесах, структурній регуляції їх обміну речовин, транспорті іонів і генетичних елементів через клітинну мембрану, в цілому підвищуючи життєздатність організму.

Поліфосфати нижчих еукаріот. Клітини еукаріот у порівнянні з прокаріотами мають більш складну структуру. Велика кількість досліджень з ролі поліфосфатів була проведена на дріжджах. Спочатку вважалось, що більшість цих полімерів розташована у вакуолях [13, 30], однак стало відомо, що вони локалізовані і в інших клітинних компартментах: в ядрі [19, 28], мітохондріях [21, 23], плазматичних мембранах [39], лізосомах [36]. В роботах Кулаєва І.С. та співав. [7, 8] показано, що в кожній органелі дріжджів та інших грибів присутня своя фракція поліфосфатів з певною довжиною ланцюга. При цьому в кожній органелі нижчих еукаріот існує свій набір ферментів, що зв'язує обмін поліфосфатів в першу чергу з процесами, характерними саме для даної органели. Наприклад, в ядрі біосинтез поліфосфатів пов'язаний із біосинтезом РНК, в мітохондріях він залежить від біосинтезу АТФ, в клітинній оболонці – пов'язаний із синтезом одного з головних її полісахаридних компонентів – манану [12]. В мембранах деяких органел, у тому числі мітохондрій та вакуолей, поліфосфати входять до складу комплексів з полі-β-оксимасляною кислотою, регулюючи транспорт іонів та водорозчинних речовин [39, 40].

Аналіз активності ферментів, задіяних у поліфосфатному обміні дріжджів показав, що окрім участі поліфосфатів в специфічних для кожної органели процесах, найбільш важливою функцією поліфосфатів у дріжджів все ж таки є його накопичення у осмотично інертній формі [22]. Накопичення відбувається майже у всіх органелах, однак має певні особливості, а ферменти – екзополіфосфотази, залучені до цього процесу, відрізняються один від одного за специфічністю та рядом фізико-хімічних властивостей, отже в цілому поліфосфатний обмін є унікальним процесом для кожної органели.

В дослідженнях на *Acremonium chrysogenum* показано, що підчас синтезу грибами-продуцентами антибіотичної речовини – цефалоспорину С, кількість довголанцюгових поліфосфатів знижується, тоді як коротколанцюгових навпаки збільшується. Це свідчить про участь поліфосфатів у синтезі цефалоспорину С в якості джерела енергії [4.]

Останнім часом значної уваги дослідників заслуговують питання впливу різних екстремальних факторів (зокрема біоцидів, теплового шоку, тощо) на вміст поліфосфатів у мікроскопічних міцеліальних грибів-деструкторів родів *Penicillium, Aspergillum, Acrimonium* та ін. яким притаманна широка амплітуда адаптаційних реакцій, а також питання участі саме цих біополімерів у

формуванні механізмів адаптації до різноманітних стрес-впливів [10].

Практично всі дослідники погоджуються, що у нижчих еукаріот, існування яких в значній мірі залежить від умов навколишнього середовища, високомолекулярні поліфосфати приймають участь у метаболічному структурному контролі обміну речовин.

Поліфосфати рослин. Незважаючи на те, що поліфосфати були виявлені як у нижчих [5], так і в багатьох тканинах вищих рослин, дуже мало відомо про їх обмін в цих організмах. Поліфосфат-метаболізуючі ферменти зустрічаються в багатьох вищих рослинах [19, 34, 35], проте далеко не завжди вони проявляють помітну активність. Слід зазначити, що роль резерву фосфатів в рослинах належить не поліфосфатам, а фітину (кальцієво-магнієва сіль інозітфосфорної кислоти), який утворюється у великих кількостях під час дозрівання насіння, паралельно з накопиченням запасних речовин таких як крохмаль і ліпіди [11]. Подібний резерв фосфатів та наявність хлорофілу створює додаткові труднощі для ідентифікації та вивчення поліфосфатів в рослинах. Кількість поліфосфатів в тканинах вищих рослин зазвичай мала і залежать від певних етапів розвитку. Так, наприклад, досить велика кількість поліфосфатів накопичуються на ранніх стадіях дозрівання насіння бавовнику [5], досягаючи при цьому 10% загального фосфору, що перевищує вміст фосфору у складі фітину більш ніж у два рази.

Поліфосфати тварин. Організація тварин значно ускладнена відносно організації прокаріот і нижчих еукаріот, отже функції поліфосфатів у цих істот також зазнали сильних змін по відношенню до менш організованих організмів. Хоча перші відомості наявності поліфосфатів в клітинах ссавців отримані ще в 80-90-х роках минулого століття [17], метаболізм цього біополімеру у вищих еукаріот досі мало вивчений. Одна з причин цього полягає в дуже малих кількостях поліфосфатів у клітинах тварин. Концентрації поліфосфатів коливаються в діапазоні від 10 до 100 мкм, в той час як довжина ланцюга може становити від 100 до 1000 залишків [21].

Дослідження ролі поліфосфатів у тварин різних таксономічних груп носять доволі фрагментарний характер. Поліфосфати досліджувалися у комах [22], амфібій [43] і звичайно ж на самих різних органах і тканинах ссавців і людини [21].

Вміст поліфосфатів та активність екзополіфосфатаз в різних тканинах ссавців відрізняється, а також змінюється в ході розвитку і старіння організму [26]. Так, наприклад, рівень поліфосфатів у головному мозку щурів збільшується в шість разів одразу після народження, і максимальний рівень поліфосфатів спостерігався в мозку у 12 місячних тварин, а у дорослих особин загальний вміст поліфосфатів знижується до 50%. Це зниження концентрації поліфосфатів пояснюється зменшенням кількості нерозчинних довголанцюгових полі фосфатів. Кількість розчинних, довголанцюговихі поліфосфатів істотно не змінюється в процесі старіння. У печінці щурів вікові зміни у вмісті поліфосфатів виражені менше, проте на ранніх стадіях регенерації печінки спостерігався взаємозв'язок поліфосфатів та синтезу РНК [27], що можна пояснити участю цих полімерів у регуляції генетичної активності та синтезу РНК, як складових хроматину клітинних ядер.

Високим вмістом поліфосфатів у людей характеризуються молоді формуючі кісткову тканину елементи – остеобласти, причому активність екзополіфосфатази в остеобластів набагато вище, ніж в інших клітинах і тканинах ссавців. Дослідження поліфосфатного обміну на культурі остеобластів показали, що даний полімер може виступати в якості інгібітору мінералізації кісткової тканини [42].

В системі крові у людей поліфосфати відіграють ключову роль в процесах коагуляції. Тромбоцити людини містять велику кількість неорганічних поліфосфатів, які виділяються активованими тромбоцитами і характеризуються прокоагулянтними властивостями [44], впливаючи на фібринолітичну систему, активацію фактора V і структуру фібрину. Таким чином, поліфосфати прискорюють згортання крові та сприяють утворенню згустку як у фізіологічно нормальних умовах, так і у пацієнтів з гемофілією А і В. Поліфосфати також значно скорочують час згортання плазми, яка містить різні антикоагулянти, у тому числі гепарин, еноксапарин (низькомолекулярний гепарин), аргатробан (прямий інгібітор тромбіну) [45]. Поліфосфати є нестійкими в крові чи плазмі через присутність в даних рідинах фосфатаз.

Поліфосфати також приймають участь в регуляції тонусу судин і серцевої діяльності. Зокрема, диаденінполіфосфати демонструють вазодиляторні властивості, які пов'язані з активацією синтезу окиси азоту (NO) і простацикліну (PGI_2). Окрім того, у субмікромолярних концентраціях диаденінполіфосфати викликають зменшення частоти серцевих скорочень. Така дія реалізується через K^+_{ATP}-канали, що спряжені з P_1 і P_2 пуринергичними рецепторами, а також зі специфічними до диаденозинполіфосфатів рецепторами, що знаходяться в плазматичній мембрані кардіоміоцитів [29]. У зв'язку з цим припускається, що порушення метаболізму диаденозинполіфосфатів може бути однією з важливих ланок у розвитку гіпертензії та інших патологій серцево-судинної системи.

Окрім вмісту в клітинах, поліфосфати також присутні у позаклітиному просторі – в плазмі та сироватці крові людини. Концентрація нерозчинних довголанцюгових поліфосфатів в безклітинній фракції крові значно нижчі, ніж в людських мононуклеарних клітинах периферичної крові та еритроцитах. Поки складно сказати синтезуються поліфосфати в плазмі або з'являються в ній в результаті лізису еритроцитів [45].

У дослідженні ініційованого апоптозу людських лейкоцитів показано, що вміст поліфосфатів істотно не змінюється, спостерігається лише деградація довголанцюгових поліфосфатів. Тоді як дослідження лейкозних клітин показало, що в початковому стані в них містяться довголанцюгові поліфосфати (близько 150 залишків) і коротколанцюгові (25-45 залишків). При апоптозі клітин довголанцюгові поліфосфати зникають одночасно з фрагментацією ДНК. Це вказує на те, що поліфосфати можуть бути залучені до процесів апоптозу, впливаючи на стабільність ДНК-білкових комплексів або регулювання діяльності нуклеази [42].

Запуск апоптозу за допомогою поліфосфатів спостерігали у мієломних і лімфоїдних клітинних лініях. В мієломних клітинних лініях поліфосфати індукували екстерналізацію фосфатидилсерину із внутрішнього цитозольного шару мембрани на зовнішній, а також активували каспазу-3 і зупиняли клітинний цикл. У фізіологічно нормальних В-, Т-клітин та мононуклеарних клітин крові подібне явище не спостерігалось [26].

Таким чином, наведені дані з вивчення ролі поліфосфатів у організмі тварин, незважаючи на їх фрагментарність та розрізненість, свідчать про важливість подальшого дослідження функцій цих полімерів у тварин, оскільки вже зрозуміло, що поліфосфати є важливим регуляторним фактором нормального протікання процесів клітинної проліферації і диференціювання особливо в кістковій та мозковій тканині; коагуляції та фібринолізу; апоптозу ракових клітин, тощо.

Промислове використання і екологічна значущість. Синтетичні поліфосфати використовуються в харчовій промисловості в якості каталізаторів, емульгаторів і стабілізаторів. За своєю природою поліфосфати (добавка Е 452) є інгібіторами і можуть сповільнювати хімічні реакції. Завдяки цій властивості вони і використовуються в харчовій промисловості в якості добавок в таких продуктах, як фруктові соки і консервовані продукти. Їх використовують для того, щоб запобігти зміні кольору і зберегти смак. Поліфосфати використовуються також при консервуванні шинки, маринуванні овочів, як стабілізатори емульсії в сироварінні, і для утримання вологи в швидкозаморожених продуктах [16]. Функціональність поліфосфатів для цих цілей сильно залежить від їх вологозвязуючої здібності і буферної ємності, які визначаються довжиною поліфосфатний ланцюга. Промислові поліфосфати – це суміші поліфосфатів з різними довжинами ланцюгів.

Поліфосфати широко використовуються в інших видах промисловості як інгібітори корозії, для знежирення волокон, пом'якшення води в миючих засобах, зокрема в пральних порошках і милі, з огляду на це гостро постає питання про їх вплив на екосистеми та здоров'я людини.

Заключення. Поліфосфати є невід'ємними компонентами клітин всіх царств живих організмів, однак реалізація їх біологічних функції в ряду від мікроорганізмів до вищих еукаріот значно змінювалась в процесі еволюції.

У примітивних організмів поліфосфати відігравали найважливішу функцію в біоенергетиці клітини. У подальшому ця функція була передана більш енергоефективній сполуці – АТФ. У більшості сучасних прокаріот та нижчих еукаріот, які є найбільш залежними від умов свого оточення, поліфосфати виконують роль резерву фосфату та енергії, який дає можливість швидко переходити з інертної фази розвитку до активного росту та розмноження навіть в умовах стресу різної природи.

Високоорганізовані організми зберігають за поліфосфатами функції генетичного і структурного регулювання багатьох фізіологічних процесів, наприклад, мембранного транспорту, експресії генів, активації ферментів, коагуляції крові, тощо. Цілком можливо, що більшість з процесів, у регуляції яких приймають участь поліфосфати, все ще залишається за межами сучасних та є матеріалом для подальших досліджень.

1. Бертокс П., Радд Д. Стратегия защиты окружающей среды от загрязнений. – М.: Мир, 1980. 2. Вагабов В.М., Трилисенко Л.В., Кулаев И.С. Зависимость длины цепи неорганических полифосфатов от содержания ортофосфата в среде у дрожжей // Биохимия. – 2000. – Т. 65(3). – С. 414-420. 3. Вагабов В.М., Трилисенко Л.В., Щипанова И.Н., Сибельдина Л.А., Кулаев И.С. Изменение длины цепи неорганических полифосфатов в зависимости от стадии роста Saccharomyces cerevisiae // Микробиология. – 1998. – Т.67. – С. 193-198. 4. Валиахметов А.Я., Трилисенко Л.В., Вагабов В.М. та ін. Динамика содержания неорганических полифосфатов при синтезе цефалоспорина С у Acremonium chrysogenum // Прикладная биохимия и микробиология. – 2010. – Т. 46, № 2. – С. 198-204. 5. Валиханов М.Н., Бекназаров В.О., Игамназаров Р.П. Изучение возможной роли полифосфатов как источников фосфатного питания для хлопчатника // Физиология растений. – 1980. – Т. 227. – С. 296-300. 6. Кулаев И.С., Вагабов В.М. Влияние условий выращивания на обмен неорганических полифосфатов и некоторых других фосфорных соединений у Scenedesmus obliquus // Биохимия. – 1967. – Т. 32. – С. 253-260. 7. Кулаев И.С., Вагабов В.М., Кулаковская Т.В. Высокомолекулярные неорганические полифосфаты: биохимия, клеточная биология, біотехнологія. – М., 2005. 8. Личко Л.П., Кулаковская Т.В., Кулаев И.С. Неорганические полифосфаты и экзополифосфатазы различных компартментов клоток Saccharomyces cerevisiae // Биохимия. – 2006. – Т. 71, вып. 11. – С 1445-1450. 9. Мартынюк В.С., Громозова Е.Н., Лукьяненко И.В., Цейслер Ю.В. Вариабельность оптических свойств метиленового синего в растворах неорганического полифосфата натрия как одна из причин метахромазии // Физика живого. – 2010. – Т. 18, № 2. – С. 41 -46. 10. Смирнов В.Ф., Перцева А.Д., Абзалова Ю.Р. Содержание неорганических полифосфатов у микромицетов-декструкторов полімерних материалов в условиях теплового шока // Микологтя и фитопатология. – 2003. – Т. 37, вып. 1. – С. 83-86. 11. Соболев А.М. Распространение, образование и использование фитина у высших растений // Успехи биологической химии – 1962. – Т. 4. – С. 248–265. 12. Циоменко А.Б., Вагабов В.М., Августин Й., Кулаев И.С. О взаимосвязи обмена неорганических полифосфатов и маннана у дрожжей // Докл. АН СССР. – 1974. – Т. 215. – С. 478–480. 13. Шабалин Ю.А., Вагабов В.М., Циоменко А.Б., Земляныхина О.А., Кулаев И.С. Изучение полифосфаткиназной активности в вакуолях дрожей // Биохимия. – 1977. – Т. 42 (9). – С. 1642-1648. 14. Beauvoit B., Rigonlet M., Guerin B., Canioni P.Polyphosphates as a source of high energy phosphates in yeast mitochondria: a P-NMR study // FEBS Lett. – 1989 – Vol. 252 – P. 17-22. 15. Bobyk M.A., Afinogcnova A.V., Dubinskaya M.V., Lambina V.A., Kulaev I.S. Detection of polyphosphates and enzymes of polyphosphate metabolism in Bdellovibrio bacteriovorus / // Zentralbl. Bacteriol. Microbiol. Hyg. – 1980. – Vol. 135. – P. 461-466. 16. Feng Hui, Xue Chang-hu, Gao Rui-chang and etc. Effect of polyphosphate hydrolysis on properties of frozen Tilapia muscle // Science and Technology of Food Industry. – 2008. – Vol. 9. 17. Gabel N. W., Thomas V. Evidence for the occurence and distribution of inorganic polyphosphates in vertebrate tissues // J. Neurochem. – 1971. – Vol. 18 – P. 1229–1242. 18. Griffiths E.J., Halestrap A.P.Pyrophosphate metabolism in the perfiised heart and isolated heart mitochondria and its role in regulation of mitochondrial function by calcium // J. Biochem. – 1993. – Vol. 290. – P.489-495. 19. Jungnickel F. Significance of repressible polyphosphate phosphohydrolases in yeast and higher plants. In Proceedings of Reaction Mechanisms and Control Properties of Phosphotransferases // Joint Biochemical Symposium USSR–DDR, Renhardsbrunnm Akademie-Verlag, Berlin. – 1973. – P. 87–91. 20. Kim K.S., Rao N.N., Fraley C.D., Kornberg A. Inorganic polyphosphate is essential for long-term survival and virulence factors in Shigella and Salmonella spp // Proc Natl Acad Sei USA. – 2002. – Vol. 99. – P. 7675-7680. 21. Kornberg A. Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions / In Schrëoder H.C. and Mëuller W.E.G. (Eds), Inorganic Polyphosphates. Biochemistry, Biology, Biotechnology, Progress in Molecular and Subcellular Biology (Special Issue). – 1999. – Vol. 23, Springer-Verlag, Berlin. – P. 1–19. 22. Kulaev I.S., Rozhanets V. V., Kobylanskii A., Filippovich Yu.V. Inorganic polyphosphates in insects // Evol. Biochem. Fiziol. – 1974. – Vol. 10. – P. 147–165. 23. Kumble K.D., Kornberg A. Inorganic polyphosphate in mammalian cells and tissues // J. Biol. Chem. – 1995. – Vol. 270. – P. 5818-5822. 24. Kuroda A., Tanaka S., Ikeda T. and etc. Inorganic polyphosphate kinase is required to stimulate protein degradation and for adaptation to amino acid starvation in Escherichia coli // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1999. – Vol. 96. – P. 14264–14269. 25. Kusano S., Ishihama A. Functional interaction of Escherihia coli RNA polymerase with inorganic polyphosphate // Genes Cells. – 1997. – Vol. 2. – P. 433–441. 26. Lorenz B., Munkner J., Oliveira M.P. and etc. Changes in metabolism of inorganic polyphosphate in rat tissues and human cells during development and apoptosis // Biochim. Biophys. Acta. – 1997. – Vol. 1335. – P.51–60. 27. Mansurova S. E., Shama A. M., Sokolovskii V.Yu. and etc.High-molecular polyphosphates of rat liver nuclei. Their function during liver regeneration // Dokl. Akad. Nauk SSSR. – 1975. – Vol. 225. – P. 717–720. 28. Müller F., Mutch N.J., Schenk W.A. and etc. Platelet polyphosphates are proinflammatory and procoagulant mediators in vivo // Cell. – 2009. – Vol. 139(6). – P. 1143–1156. 29. Nicholas A. Flores, Brigitte M. Stavrou, Desmond J. Sheridan The effects of diadenosine polyphosphates on the cardiovascular system // Cardiovascular Research. – 1999.- vol. 42. – P. 15–26. 30. Ogawa N., DeRisi J., Brown P.O. New components of a system for phosphate accumulation and polyphosphate metabolism in Saccharomyces cerevisiae revealed by genomic expression analysis // Mol. Biol. Cell. – 2000. – Vol. 11. – P. 4309–4321. 31. Ogawa N., Tzeng C.M., Fraley C.D., Kornberg A. Inorganic polyphosphate in Vibrio cholerae: genetic, biochemical, and physiologic features // J. Bacteriol. – 2000. – Vol. 182. – P. 6687-6693. 32. Ohtomo R., Sekiguchi Y., Kojima T., Saito M Different chain length specificity among three polyphosphate quantification methods // Anal Biochem. 2008.– Vol. 15. – P. 383(2):210-6. 33. Penniall R., Griffin J.B. Studies of phosphorus metabolism by isolated nuclei. IV. Formation of polyphosphate // Biochim. Biophys. Acta. – 1964. – Vol. 90. – P. 429–435. 34. Pierpoint W. S. The phosphatase and metaphosphatase activities of pea extract // Biochem. J. – 1957. – Vol. 65. – P. 67–76. 35. Pierpoint W. S. The phosphoesterase of pea plants (Pisum sativum L.) // Biochem. J. – 1957. – Vol. 67. – P. 644–657. 36. Pisoni R.L., Lindley E.R. Incorporation of [32-P] orthophosphate into long chains of inorganic polyphosphates within lysosomes of human fibroblasts // J. Biol. Chem. – 1992. – Vol. 267. – P. 3626–3631. 37. Rao N.N., Gomez-Garcia M.R., Kornberg A. Inorganic polyphosphate: essential for growth and survival // Annu Rev Biochem. – 2009. – Vol. 78. – P.605–647. 38. Rashid M.H., Kornberg A. Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of Pseudomonas aeruginosa // Proc. Natl. Acad Sci. USA. – 2000. – Vol. 97. – P. 4885-4890. 39. Reusch R.N. Poly-beta-hydroxybutirate/calcium polyphosphate complexes in eukaryotic membranes // Roc. Soc. Exper. Biol. Med. – 1989. – Vol. 191. – P. 377–381. 40. Rodriguez, R.J. Polyphosphate present in DNA preparation from filamentous fungal species of Colleotrichum inhibits restriction endonucleases and other enzymes // Anal. Biochem. – 1993. – Vol. 209. – P. 291-297. 41. Ruiz F.A., Lea C.R., Oldfield E., Docampo R. Human platelet dense granules contain polyphosphate and are similar to acidocalcisomes of bacteria and unicellular eukaryotes // J Biol Chem. – 2004. – Vol. 279. – P. 44250–44257. 42. Schröder H.C., Kurz L., Müller W.E.G., Lorenz B. Polyphosphate in bone // Biochemistry. – 2000. – Vol. 65. – P. 296–304. 43. Shiokawa K., Yamana Y. Demonstration of

polyphosphate and its possible role in RNA synthesis during early development of rana japonica embryos // Exp. Cell. Res. – 1965. – Vol. 38. – P. 180–192. 44. Smith S.A., Morrissey J.H. Polyphosphate as a general procoagulant agent // J Thromb Haemost. 2008b; – Vol. 6. – P. 1750–1756.

45. Smith S.A., Mutch N.J., Baskar D. and etc. Polyphosphate modulates blood coagulation and fibrinolysis // Proc Natl Acad Sci U S A. 2006; – Vol. 103. – P. 903–908.

Надійшла до редакції 14.11.11

УДК 597.42/.55(282.247.32)

Н. Глотова, студ., Ю. Куцоконь, канд. біол. наук,
А. Подобайло, канд. біол. наук

РОЗПОДІЛ ДРІБНОРОЗМІРНОГО РИБНОГО НАСЕЛЕННЯ НА МІЛКОВОДДЯХ РІЧКИ УДАЙ НПП "ПИРЯТИНСЬКИЙ"

Виявлено 15 видів дрібнорозмірного рибного населення на мілководдях річки Удай (басейн Дніпра) в межах НПП "Пирятинський". В уловах домінував гірчак європейський Rhodeus amarus (Bloch, 1782) (54,3%), а найпоширенішим видом є плітка звичайна Rutilus rutilus (Linnaeus, 1758), яка присутня у 8 точках з 10 досліджених.

There are 15 species of the small-sized fish populations in shallow waters of the river Uday (Dnieper basin) with in the NNP "Pyryatynsky". In the catch dominated bitterling Rhodeus amarus (Bloch, 1782) – 54,3 %, and most common species is the roach Rutilus rutilus (Linnaeus, 1758), which is present in 8 points of 10 examined.

Вступ. Національний природний парк (НПП) "Пирятинський" створений з метою збереження унікальних еталонних природно-ландшафтних та історико-культурних комплексів басейну середньої течії річки Удай і для організації збалансованого використання цих комплексів. Він розташований у північно-західній частині Полтавської області на території Пирятинського району в адміністративних межах Давидівської, Сасенівської, Березоворудської, Каплинцівської, Харківецької, Дейманівської, Великокручанської, Грабарівської, Олександрівської сільських рад та Пирятинської міської ради. Географічні координати парку: $50^0 15'$ пн. ш. $32^0 31'$ сх. д.

Річка Удай – права притока Сули. Її довжина 324 км. Протікає в межах Чернігівської та Полтавської областей. Меліоративні роботи XX ст. не торкнулися долини Удаю, тому тут збережена в природному стані заплавна система, яка подекуди сягає 2 – 3 км в ширину. В місцях проведення досліджень дно піщано-мулисте, течія повільна.

З геоботанічної точки зору, найпоширенішими для Удаю в межах НПП "Пирятинський" є угруповання з домінуванням очерету звичайного (*Phragmites australis*). Значні площі водної поверхні зайняті угрупованнями з домінуванням різних видів рдестів (*Potamogeton pectinatus, P. crispus, P. natans* та ін.), водопериці колосистої (*Myriophyllum spicatum*), тілорізу алоевидного (*Stratiotes aloides*), жабурника звичайного (*Hydrocharis morsus-ranae*).

Матеріали і методи. Дослідження проводили в липні – серпні 2011 року на р. Удай в межах Пирятинського району Полтавської обл. від с. Кроти до с. Дейманівка. Досліджена ділянка має довжину 65 км. Глибина в районі досліджень – 1 – 5 м, лови проводили на глибинах до 2 м мальковою волокушею довжиною 6 м із вічком 5 мм. Всього досліджено 575 особин. Проби були відібрані в 10 точках (рис.1).

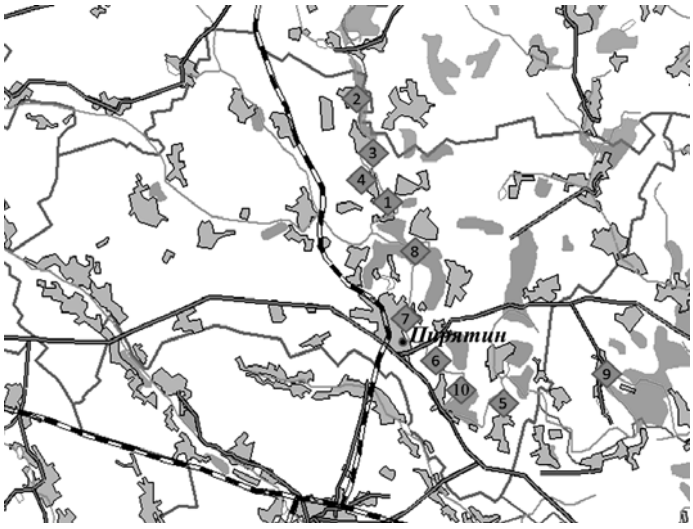


Рис. 1. Місця проведення ловів на р. Удай в Пирятинському р-ні:
1 – Кейбалівка, 2 – Кроти, 3 – Гурбенці, 4 – Леляки, 5 – Повстин, 6 – М. Круча, 7 – О. Масальський, 8 – Калиновий міст, 9 – Дейманівка, 10 – В. Круча

Для кожної точки було підраховано відсоткове співвідношення видів за кількістю особин. Крім того, ми підрахували фреквенцію (F) для кожного виду, тобто відсоток точок, в яких вид присутній. Ця величина широко використовується в подібних публікаціях закордоном (Kosco, 2007). Також визначено відсотки кожного виду від загальної кількості особин (D). Визначали розмір і масу кожної особини.

Результати та їх обговорення. Досліджені риби належать до 15 видів і до 6 родин (табл.1).

© Глотова Н., Куцоконь Ю., Подобайло А., 2012

***Таблиця* 1. Розподіл видів риб на різних точках дослідження р. Удай**

Види	Точки										F	D
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
Leuciscus idus (Linnaeus, 1758) – в'язь			19,38	4,62	8,54	20,83	47,83		50,00		60	11,80
Rutilus rutilus (Linnaeus, 1758) – плітка звичайна	3,70	63,64	1,25	12,14	1,22	2,08	4,35			4,00	80	7,30
Scardinius erythrophthalmus (Linnaeus, 1758) – краснопірка звичайна			3,13	5,20	3,66	12,50				32,00	50	5,39
Alburnus alburnus (Linnaeus, 1758) – верховодка звичайна	92,60	22,73	0,63	2,31	9,76		8,70			12,00	70	8,35
Leucaspius delineatus (Heckel, 1843) – вівсянка	3,70		0,63	5,20				38,46			40	2,78
Blicca bjoerkna (Linnaeus, 1758) – плоскирка		4,55	1,25			8,33				28,00	40	2,44
Rhodeus amarus (Bloch, 1782) – гірчак європейський			72,50	67,05	70,73	2,08	39,13	61,54		16,00	70	54,30
Pseudorasbora parva (Temminck et Schlegel, 1846) – чебачок амурський				0,58							10	1,39
Romanogobio belingi (Slastenenko, 1934) – пічкур-білопер дніпровський		4,55									10	0,17
Carassius gibelio (Bloch, 1782) – карась сріблястий					1,22						10	0,17
Cobitis taenia (s.l.) Linnaeus, 1758 – щипавка звичайна						45,83				4,00	20	4,00
Barbatula barbatula (Linnaeus, 1758) – слиж європейський						2,08					10	0,17
Esox lucius Linnaeus, 1758 – щука звичайна			1,25	1,16	1,22	2,08			50,00	4,00	60	1,39
Pungitius platygaster (Kessler, 1859) – колючка південна					3,66	2,08					20	0,70
Perca fluviatilis Linnaeus, 1758 – окунь звичайний		4,55		1,73		2,08					30	0,87
Всього видів	3	5	8	9	8	10	4	2	2	7	15	
Всього особин	27	22	160	173	82	48	23	13	2	25	575	

В уловах домінував гірчак європейський, відсоток виловлених особин цього виду від загальної кількості риб становить 54,3%. Гірчак був присутній в 7 точках з 10. Також чисельними є в'язь (11,8 %), верховодка звичайна (8,35 %), плітка звичайна (7,3 %). Найрозповсюдженіший вид – плітка звичайна, вона присутня в 8 точках. Найрідкіснішими в уловах були чебачок амурський, карась сріблястий, пічкур-білопер дніпровський, слиж європейський: лише по одній особині, тільки в одній точці. Найбільше видів риб зафіксовано з точок О. Мосальський (10 видів), Леляки (9 видів), Гурбенці і Повстин (по 8 видів).

Проаналізувавши розмірну структуру риб в наших уловах, можна зробити висновок, що деякі види представлені в основному молоддю (плоскирка, карась сріблястий, тощо), інші – як молодими, так і дорослими особинами (наприклад, плітка звичайна, вівсянка), окремі – лише дорослими (гірчак європейський). Розміри особин були в наступних межах (в мм): в'язь від 30 до 82, плітка звичайна – 17 – 119, краснопірка звичайна – 34 – 71, верховодка звичайна – 28 – 108, вівсянка – 28 – 40, плоскирка – 47 – 101, гірчак європейський – 18 – 44, чебачок амурський – 52, пічкур-білопер дніпровський – 58, карась сріблястий – 17, щипавка звичайна – 27 – 74, слиж європейський – 24, щука звичайна – 77 – 199, колючка південна – 19 – 25, окунь звичайний – 42 – 48.

Серед виявлених видів – 12 аборигенних, 3 чужорідних, з яких 2 поширилися внаслідок інтродукції (карась сріблястий, чебачок амурський), а один – шляхом саморозселення (колючка південна).

Загалом, на середній течії ріки Удай виявлено 27 видів риб, що належать до 7 родин (Подобайло, 2008). Якщо до цього переліку додати виявленого нами пічкура-білопера дніпровського, то буде 28 видів. Зокрема, 4 види риб є об'єктами охорони регіональних червоних списків кількох областей України, 2 види занесені до "Червоної книги України" (2009). 6 видів з іхтіофауни Удаю входять до 3 додатку Бернської конвенції (Годлевська та ін., 2010). З цих видів у наших дослідженнях присутні вівсянка, пічкур-білопер дніпровський, гірчак європейський, щипавка звичайна, слиж європейський.

Підсумовуючи, можна сказати, що мілководдя річки Удай в межах НПП "Пирятинський", є важливими для розмноження багатьох видів риб, а також – це місця існування аборигенних видів невеликих розмірів, деякі з них охороняються різноманітними міжнародними червоними списками.

1. Годлевська О., Парнікоза І., Різун В., Фесенко Г., Куцоконь Ю., Загороднюк І., Шевченко М., Іноземцева Д. Фауна України: охоронні категорії. Довідник. Ред. Годлевська О., Фесенко Г. – К., 2010. 80 с. 2. Подобайло А.В. Рибне населення середньої течії р. Удай // Тези І Міжнародної іхтіологічної науково-практичної конференції "Сучасні проблеми теоретичної і практичної іхтіології. – Канів. – 2008. С. 115 – 118. 3. Червона книга України. Тваринний світ. – К.: Глобалконсалтинг, 2009. – 600 с. 4. Kosco J. Zmeny ichtyocenoz povodia Torysy s dorazom na chranene a invazne druhi // Natura Carpatica. XLVIII. 2007. P. 127 – 140.

Надійшла до редколегії 07.12.11

582.2 (477:292.452)

Ю. Щербакова, студ., В. Джаган, канд. біол. наук

РАННЬОЛІТНІ ГРИБИ СВИДОВЕЦЬКОГО МАСИВУ КАРПАТСЬКОГО БІОСФЕРНОГО ЗАПОВІДНИКА

Представлено дані досліджень видового складу ранньолітніх видів грибів Свидовецького заповідного масиву (Карпатський біосферний заповідник). На території масиву відмічено 68 видів, що належать до 55 родів, 38 родин, 18 порядків, 9 класів, 4 відділів. Домінуючими за кількістю видів виявились порядки Agaricales (17 видів) та Polyporales (11 видів). Проаналізовано розподіл виявлених видів за основними висотними зонами рослинності масиву.

Species diversity of early-summer fungi from the Svidovez mountain range (Carpathian Biosphere Reserve) was investigated. 68 species from 55 genera 38 families 18 orders that belong to the Myxomycota, Zygomycota, Ascomycota and Basidiomycota were recorded. Agaricales and Polyporales have been found to dominate by the number of species. The zonation distribution of the species found was analised.

Вступ. Свидовецький заповідний масив (Рахівський р-н Закарпатської обл.) у 1997, згідно наказу президента України від 11.04.1997, став одним з заповідних масивів Карпатського біосферного заповідника (КБЗ) [1]. Розташований він у межах найвищої частини Свидовецько-Чорногірського фізико-географічного району Полонинсько-Чорногірської області підпровінції Східних Карпат і займає площу 6580 га в межах висот від 600 до 1883 м. н.р.м. Гірська споруда Свидовця, як і більша частина Українських Карпат, має флішову будову, а на головному хребті добре збереглися сліди льодовикової діяльності [2].

Масив охоплює водозбори річок Чорної Тиси, Кісьви, Шопурки та Тересви, та густо порізаний сіткою дрібних водотоків. Найвища вершина Свидовця – г. Близниця (1883 м н.р.м). Серед інших вершин виділяють Великий котел, Додяску, Ворожеску, Татаруку, що мають висоту більшу за 1700 метрів [5].

Особливою прикрасою Свидовецького ландшафту є сім живописних гірських озер. Найбільші з них – Апшинець, Герешаска, Ворожеска, Драгобратське, розташовані понад 1450 м н.р.м (площа кожного в середньому 1,2 га, глибина від 1.2 до 4.5 м) [6].

Свидовець – це типовий гірський район, де найбільш яскраво виражений вплив складного комплексу природних умов на розселення деревної і чагарникової рослинності. Якщо на інших гірських хребтах порівняно добре виражена вертикальна поясність лісової рослинності, то на Свидовці, в результаті певних кліматичних умов, можна побачити зовсім іншу картину. Більш теплі південні схили представлені вологими буковими *(Fagetum)* фітоценозами до висоти 1380 м н.р.м., що є найвищою межею бучин в Українських Карпатах. Фрагментарно на скельних формах рельєфу поширені буково-яворові *(Fageto-Aceretum)* та буково-яворово-ясенові *(Fageto-Acereto-Fraxinetum)* лісові фітоценози. На північних макросхилах, більш холодних, формуються мішані деревостани з участю *Abies alba* Mill. Верхню межу лісу, яка проходить в середньому на висоті 1400 м н.р.м., утворюють чисті клімаксові смеречники *(Piceetum),* вище яких зростають фітоценози криволісся *Duschekia viridis* (Chaix) Opiz та *Junipervs sibirica* Burgsd. Над верхньою межею лісу простягаються полонини субальпійського поясу, їх флора багата і різноманітна, що обумовлено своєрідною будовою гірського хребта. Альпійський пояс, розташований на найвищих вершинах (понад 1800 м н.р.м.) характеризується широким поширенням *Festuca supina* Schur, *Carex sempervirens* Vill., *Sesleria bielzi* (Schur), *Juncus trifidus* L. та ряду інших видів – представників альпійської флори [2].

Власне на Свидовці зосереджена найбільша кількість унікальних для України оселищ видів, які трапляються лише в цьому гірському регіоні. Це, зокрема *Antennaria carpatica* (Wahlenb.) Bluff & Fingerh., *Astragalus krajinae* Domin., *Oxyria digyna* (L.) Hill, *Salix alpina* Scop., *Biscutella laevigata* L., *Gentiana nivalis* L., *Veronica aphylla* L., *Saxifraga androsacea* L. Чимало свидовецьких оселищ рідкісних і зникаючих видів приурочені до масиву гір Близниця-Драгобрат, а також до південно-східного схилу г. Тодяска (інакше Доґяска), що поблизу озера Ґерешаска [4].

Мікологічну складову біорізноманітності Українських Карпат в цілому та Свидовця зокрема понад 70 років тому досліджував чешський міколог Альберт Пілат. В роботі "*Hymenomycetes Carpatorum orientalium*" він наводить для території Свидовецького масиву 406 видів грибів з відділів Ascomycota (19 видів) та Basidiomycota (387 видів) [8]. Інші задокументовані дані щодо видової різноманітності грибів Свидовецького масиву відсутні.

Об'єкт та методи досліджень. Протягом червня 2010 року здійснювався збір плодових тіл грибів та грибоподібних організмів у основних лісових угрупованнях в межах Свидовецького масиву та їх ідентифікація. Камеральна обробка зборів проводилася за загальноприйнятими методиками. Для оцінки флористичної новизни отриманих даних залучали "*Fungi of Ukraine: a preliminary checklist*" [7] Сучасні назви грибів та їх систематичне положення узгоджено з базами даних Міжнародної Мікологічної Асоціації, "*MycoBank*" [9] та Міжнародного Мікологічного інституту CABI, "*Index Fungorum*" [10]. Зібрані зразки плодових тіл інсеровані до гербарію Київського національного університету імені Тараса Шевченка (*KWU*).

Результати та їх обговорення. Всього було зібрано понад 150 зразків грибів та грибоподібних організмів. Ідентифіковано 68 видів, що належать до 55 родів, 38 родин, 18 порядків, 9 класів, 4 відділів царств Fungi та Protozoa.

Переважає за кількістю видів, зібраних на Свидовці, відділ Basidiomycota (67% загальної кількості зареєстрованих на досліджуваній території видів). Цей відділ об'єднує 45 видів з 32 родів, 21 родини, 8 порядків класів Agaricomycetes (34 види), Dacrymycetes (2), Pucciniomycetes (4) та Tremellomycetes (5). Домінуючими за кількістю видів виявились порядки Agaricales (39 %) та Polyporales (24%), що цілком закономірно, оскільки ці два порядки є найчисленнішими в мікобіоті України.

Відділ Ascomycota – другий за кількістю, і нараховує 19 видів і родів відповідно, 13 родин, 7 порядків, що належать до класів Dothideomycetes (1вид), Leotiomycetes (9), Pezizomycetes (3) та Sordariomycetes (6). Провідними порядками відділу Ascomycota на досліджуваній території виступають Helotiales (32%), Xylariales (25%) і Pezizales (19%). Це зумовлено тим, що представники цих порядків є переважно ксилосапротрофами, різноманіття яких обумовлене наявністю значної кількості відповідного субстрату на території Свидовецького масиву, зокрема відмерлої деревини, сухостою тощо.

Нами було знайдено одного представника відділу Zygomycota – *Spinellus fusiger* (*Mucoraceae*) на карпофорах *Mycena renati* Quél.

© Щербакова Ю., Джаган В., 2012

Грибоподібні організми царства Protozoa на цей час обмежені лише трьома знахідками відділу Myxomycota, що належать до 3 родів – *Diderma, Fuligo* та *Lycogala.*

В результаті аналізу літературних даних [3, 7, 8], 39 видів грибів і грибоподібних організмів виявились новими для території Свидовецького масиву, з них 18 – представники відділу Ascomycota, 17 видів належать до відділу Basidiomycota, один вид – Zygomycota, і 3 – Myxomycota.

Для території Закарпаття новими виявились 11 видів: *Biscogniauxia marginata, Mycena renati, Typhula uncialis, Coleosporium petasitidis, Gymnosporangium clavariiforme, Puccinia glechomatis, Spinellus fusiger, Peziza echinospora, Rutstroemia juniperi, Myriosclerotinia sulcatula, Melastiza chateri.* Останні чотири з перелічених видів виявились новими для мікобіоти України. Описи та ілюстрації вперше зареєстрованих в Україні видів грибів подані в окремій публікації (Джаган та ін., у друці).

Нижче наводимо список знайдених на Свидовці видів грибів та грибоподібних організмів, асоційованих з ними рослин або субстратів.

Protozoa

Myxomycota Whittaker

Myxomycetes

Licеales E. Jahn

Reticulariaceae Chevall.

Lycogala Pers.

L. epidendrum (L.) Fr. – на пні *Abies alba* Mill., 14.06.10.

Physarales T. Macbr.

Didymiaceae Rostaf. ex Cooke

Diderma Pers.

D. globosum Pers. – на корі *Abies alba*, 14.06.10.

Physaraceae Chevall.

Fuligo Haller

F. septica (L.) F.H. Wigg. – на деревині, 16.06.10.

Fungi

Zygomycota Moreau

Mucoromycotina Benny

Mucorales Fr.

Mucoraceae Dumort.

Spinellus Tiegh.

S. fusiger (Link) Tiegh. – на карпофорах *Mycena renati*, 14.06.10.

Ascomycota R.H. Whittaker

Pezizomycotina O.E. Erikss. & Winka

Dothideomycetes O.E. Erikss. & Winka

Pleosporomycetidae C.L. Schoch, Spatafora, Crous & Shoemaker

Pleosporales Luttr. ex M.E. Barr

Leptosphaeriaceae M.E. Barr

Leptosphaeria Ces. & De Not

L. ogilviensis (Berk. & Broome) Ces. & De Not. – на рослинних рештках, 16.06.10.

Leotiomycetes O.E. Erikss. & Winka

Leotiomycetidae

Helotiales Nannf. ex Korf & Lizon

Dermateaceae Fr.

Mollisia (Fr.) P. Karst.

M. cinerea (Batsch) P. Karst. – на мертвій деревині, 16.06.10.

Tapesia (Pers.) Fuckel

T. fusca (Pers.) Fuckel – на мертвій деревині, 18.06.10.

Helotiaceae Rehm

Hymenoscyphus Gray

H. herbarum (Pers.) Dennis – на рослинних рештках, 16.06.10.

Hyaloscyphaceae Nannf.

Capitotricha (Raitv.) Baral

C. bicolor (Bull.) Baral – на сухих стеблах трав'янистих рослин, 18.06.10.

Dasyscyphus Gray

D. virgineus (Batsch) Gray – на сухих гілках *Juniperus sp.*, 18.06.10.

Lachnum Retz.

L. clavigerum (Svrcek) Raitv. – на рослинних рештках, 18.06.10.

Rutstroemiaceae Holst-Jensen, L.M. Kohn & T. Schumach.

Rutstroemia P. Karst.

R. juniperi K. Holm & L. Holm – на гілках *Juniperus sibirica* Burgsd., 18.06.10.

Sclerotiniaceae Whetzel

Myriosclerotinia N.F. Buchw.

M. sulcatula T. Schumach. & L.M. Kohn – на минулорічних стеблах *Carex sp.*, 16.06.10.

Rhytismatales M.E. Barr ex Minter

Rhytismataceae Chevall.

Rhytisma Fr.

R. acerinum (Pers.) Fr. – на листках *Acer sp.*, 15.06.10.

Pezizomycetes O.E. Erikss. & Winka

Pezizomycetidae Locq.

Pezizales J. Schröt.

Pezizaceae Dumort.

Peziza Fr.

P. echinospora P. Karst. – на старому згарищі, 16.06.10.

Pyronemataceae Corda

Melastiza Boud.

M. chateri (W.G. Sm.) Boud. – на вологому глинистому грунті, 16.06.10.

Scutellinia (Cooke) Lambotte

S. scutellata (L.) Lambotte – на вологому грунті, 16.06.10.

Sordariomycetes O.E. Erikss. & Winka

Hypocreomycetidae O.E. Erikss. & Winka

Hypocreales Lindau

Nectriaceae Tul. & C. Tul.

Nectria (Fr.) Fr.

N. cinnabarina (Tode) Fr. (у стадії анаморфи *Tuberculariа vulgaris* Tode) – на гілках *Fagus sylvatica*, 16.06.10.

Sordariomycetidae O.E. Erikss. & Winka

Sordariales Chadef. ex D. Hawksw. & O.E. Erikss.

Nitschkiaceae (Fitzp.) Nannf.

Bertia De Not.

B. moriformis (Tode) De Not. – на деревині, 14.06.10.

Xylariomycetidae O.E. Erikss. & Winka

Xylariales Nannf.

Diatrypaceae Nitschke

Diatrype Fr.

D. disciformis (Hoffm.) Fr. – на гілці *Fagus sylvatica*, 14.06.10.

Xylariaceae Tul. & C. Tul.

Biscogniauxia Kuntze

B. marginata (Fr.) Pouzar – на корі, 16.06.10.

Hypoxylon Bull.

H. fragiforme (Pers.) J. Kickx f. – на гілці *Fagus sylvatica*, 14.06.10.

Kretzschmaria Fr.

K. deusta (Hoffm.) P.M.D. Martin (= *Ustulina deusta* (Hoffm.) Maire) – на пні *Fagus sylvatica*, 16.06.10.

Basidiomycota Whittaker ex Moore
Agaricomycotina Doweld
Agaricomycetes Doweld
Gloeophyllales Thorn
Gloeophyllaceae Jülich
Gloeophyllum P. Karst.
G. sepiarium (Wulfen) P. Karst. – на деревині (міст), 15.06.10.
Hymenochaetales Oberw.
Hymenochaetaceae Imazeki & Toki
Porodaedalea Murrill
P. chrysoloma (Fr.) Fiasson & Niemelä (= *Phellinus pini var. abietis* (P. Karst.) Pilát) – на деревині, 16.06.10.
Polyporales Gäum.
Fomitopsidaceae Jülich
Fomitopsis P. Karst.
F. pinicola (Sw.) P. Karst. – на деревині *Fagus sylvatica*, 14.06.10.
Phaeolus (Pat.) Pat.
P. schweinitzii (Fr.) Pat. – при основі пня, 14.06.10.
Ganodermataceae (Donk) Donk
Ganoderma P. Karst.
G. lipsiense (Batsch) G.F. Atk. (= *G. applanatum* (Pers.) Pat.) – на деревині *Abies alba*, 14.06.10.
Meruliaceae Rea
Bjerkandera P. Karst.
B. adusta (Willd.) P. Karst. – на мертвій деревині, 15.06.10.
Phanerochaetaceae Jülich
Climacodon P. Karst.
C. pulcherrimus (Berk. & M.A. Curtis) Nikol. – на гілці *Fagus sylvatica*, 16.06.10.
Polyporaceae Corda
Fomes (Fr.) Fr.
F. fomentarius (L.) Fr. – на *Fagus sylvatica*, 16.06.10.
Polyporus P. Micheli ex Adans.
P. alveolaris (DC.) Bondartsev & Singer – на гілці, 16.06.10.
P. varius (Pers.) Fr. – на гілці, 16.06.10.
Trametes Fr.
T. hirsuta (Wulfen) Pilát – на деревині, 15.06.10.
T. versicolor (L.) Lloyd – на деревині, 15.06.10.
Trichaptum Murrill
T. abietinum (Pers. ex J.F. Gmel.) Ryvarden – на деревині *Abies alba*, 16.06.10.
Agaricomycetidae Locq.
Agaricales Underw.
Agaricaceae Chevall.
Lepiota (Pers.) Gray
L. cristata (Bolton) P. Kumm. – на грунті, 15.06.10.
Amanitaceae R. Heim ex Pouzar
Amanita Pers.
A. rubescens Pers. – на грунті, 17.06.10.
A. vaginata (Bull.) Lam. (= *Amanitopsis vaginata* (Bull.) Roze) – на грунті, 14.06.10.
Hydnangiaceae Gäum. & C.W. Dodge
Laccaria Berk. & Broome
L. amethystina Cooke – на грунті, 15.06.10.
Marasmiaceae Roze ex Kühner
Gymnopus (Pers.) Roussel
G. androsaceus (L.) J.L. Mata & R.H. Petersen (= *Marasmius androsaceus* (L.) Fr.) – на лісовій підстилці, 14.06.10.
G. dryophilus (Bull.) Murrill (= *Collybia dryophila* (Bull.) P. Kumm.) – на лісовій підстилці, 16.06.10.
Mycetinis Earle
M. alliaceus (Jacq.) Earle (= *Marasmius alliaceus* (Jacq.) Fr.) – на підстилці, 14.06.10.
M. scorodonius (Fr.) A.W. Wilson & Desjardin (= *Marasmius scorodonius* (Fr.) Fr.) – на сухій деревині, 16.06.10.
Mycenaceae Overeem
Mycena (Pers.) Roussel
M. pura (Pers.) P. Kumm. – на грунті, 16.06.10.
M. renati Quél. – на деревині, 16.06.10.
Xeromphalina Kühner & Maire
X. campanella (Batsch) Kühner & Maire – на пні, 16.06.10.
Pleurotaceae Kühner
Pleurotus (Fr.) P. Kumm.
P. ostreatus (Jacq.) P. Kumm. – на деревині, 14.06.10.
Pluteaceae Kotl. & Pouzar
Pluteus Fr.
P. cervinus (Schaeff.) P. Kumm. – на поваленій колоді, 16.06.10.
Schizophyllaceae Quél.
Schizophyllum Fr.
S. commune Fr. – на гілці, 15.06.10.
Tricholomataceae R. Heim ex Pouzar
Clitocybe (Fr.) Staude
C. gibba (Pers.) P. Kumm. – на грунті, 15.06.10.
Tricholomopsis Singer
T. rutilans (Schaeff.) Singer – на грунті, 14.06.10.
Typhulaceae Jülich
Typhula (Pers.) Fr.
T. uncialis (Grev.) Berthier (= *Pistillaria typhuloides* (Peck) Burt) – на сухих стеблах трав'янистих рослин, 16.06.10.
Boletales E.-J. Gilbert
Boletaceae Chevall.
Boletus Gray
B. calopus Pers. – на грунті, 14.06.10.
B. edulis Bull. – на грунті, 14.06.10.
B. erythropus Pers. – на грунті, 14.06.10.
B. impolitus Fr. – на грунті, 14.04.10.
Dacrymycetes Doweld
Dacrymycetales Lindau
Dacrymycetaceae Bref.
Calocera (Fr.) Fr.
C. palmata (Schumach.) Fr. – на деревині *Picea abies*, 17.06.10.
Dacrymyces Nees
D. stillatus Nees (= *D. deliquescens* (Bull.) Duby) – на гілці *Picea abies*, 16.06.10.
Tremellomycetes Doweld
Tremellomycetidae Locq.
Tremellales Fr.
Exidiaceae R.T. Moore
Exidia Fr.
E. glandulosa (Bull.) Fr. – на деревині, 14.06.10.
E. pithya (Alb. & Schwein.) Fr. – на деревині *Abies alba*, 14.06.10.
Tremellaceae Fr.
Tremella Pers.
T. encephala Pers. – на поваленому стовбурі *Abies alba*, 14.06.10.
T. mesenterica (Schaeff.) Retz. – на деревинні, 17.06.10
T. foliacea Pers. – на деревині, 17.06.10.
Pucciniomycotina R. Bauer, Begerow, J.P. Samp., M. Weiss & Oberw.
Pucciniomycetes R. Bauer, Begerow, J.P. Samp., M. Weiss & Oberw.
Pucciniales Clem. & Shear
Coleosporiaceae Dietel
Coleosporium Lév.

C. petasitidis (DC.) Thüm. – на *Petasites albus* (L.) Gaerthn., 14.06.10.

Pucciniaceae Chevall.

Gymnosporangium R. Hedw. ex DC.

G. clavariiforme (Wulfen) DC. – на гілках *Juniperus sibirica* Burgsd., 18.06.10.

Puccinia Pers.

P. glechomatis DC. – на *Glechoma hederacea* L., 16.06.10

P. valantiae Pers. – на *Galium sp.*, 14.06.10.

Висновки. Протягом червня 2010 року у основних лісових угрупованнях Свидовецького лісового масиву (Карпатський біосферний заповідник) проводилося дослідження грибів та грибоподібних організмів. Всього було зібрано понад 150 гербарних зразків. Ідентифіковано 68 видів, що належать до 55 родів, 38 родин, 18 порядків, 9 класів, відділів Mухomycota, Zygomycota, Ascomycota та Basidiomycota.

Найбільшу кількість видів (46) було знайдено в нижній гірській зоні ялицево-букових мішаних лісів**.** Серед представників відділу Basidiomycota тут домінували: *Boletus erythropus, Fomitopsis pinicola*, найчастіше асоційований з *Abies alba* і *Picea abies*, *Amanita vaginata*, *Trichaptum abietinum*, *Coleosporium petasitidis* на *Petasites albus*; серед Ascomycota – *Hypoxylon fragiforme* та *Nectria cinnabarina* (у стадії анаморфи *Tubercularia vulgaris*), обидва представники зазвичай спостерігалися на гілках *Fagus sylvatica.* Також неодноразово відмічали еталії *Lycogala epidendrum* (Mухomycota). Крім того, тут зростали досить рідкісні види: *Xeromphalina campanella*, *Typhula uncialis*, *Exidia pithya, Tremella encephala* тощо. Саме в цій зоні нам вдалося знайти нові для території України види (*Myriosclerotinia sulcatula* (*Sclerotiniaceae*), *Melastiza chateri* (*Pyronemataceae*) та *Peziza echinospora* (*Pezizaceae*)).

У зоні ялинових лісів нами було зареєстровано 19 видів грибів, більшість з них є тривіальними для мікобіоти України видами.

В межах субальпійської зони була відмічена незначна кількість видів (6), проте серед них є цікаві знахідки. В цій зоні нами був знайдений рідкісний представник родини *Pucciniaceae* – *Gymnosporangium clavariiforme* на гілках *Juniperus sibirica*, і новий для території країни представник родини *Rutstroemiaceae* (Ascomycota) – *Rutstroemia juniperi*, також асоційований з *J. sibirica*.

Таким чином, цілеспрямоване дослідження мікобіоти Свидовецького заповідного масиву дозволило розширити список відомих для його території видів грибів та грибоподібних організмів, а також поповнити мікологічну складову біорізноманітності Закарпаття та України в цілому. Подальші дослідження мікобіоти Свидовця тривають.

Автори статті висловлюють щиру подяку канд. біол. наук О.О. Сенчилу за консультації щодо флори та рослинності Свидовця, а також А.Й. Югасу за сприяння в експедиційному виїзді для відбору мікологічного матеріалу.

1. Гамор Ф.Д., Беркела Ю.Ю. Збірник нормативно-правових документів з питань діяльності Карпатського біосферного заповідника. – Рахів: Карпатська вежа, 2011. – 356 с. 2. Гамор Ф.Д., Довганич Я.О., Покиньчереда В.Ф., та ін. Праліси Закарпаття. Інвентаризація та менеджмент. – Рахів, 2008 – 86 с. 3.Дудка І.О., Гелюта В.П., Гайова В.П. та ін. Флора і мікобіота // Біорізноманіття Карпатського біосферного заповідника. – К.: Інтерекоцентр, 1997. – с. 163-182. 4. Кобів Ю.Й., Прокопів А., Борсукевич Л. та ін. Поширення, стан популяцій та характеристика оселищ рідкісних і загрожених видів рослин у північній частині Свидовця (Українські Карпати) – Вісник Львів. ун-ту. – Сер. біол. – 2009. – 49. – с. 63-82. 5. Комендар В. И. Карпатские заповедники. Ужгород: Карпаты, 1966. – 272 с. 6.Попов В.П., Мариніч А.М. Физико-геогафическое районирование Украинской ССР – К.: Киев. ун-т, 1968. – 684 с.7. Fungi of Ukraine: A Preliminary Checklist / Andrianova T.V., Dudka I.O., Hayova V.P., Heluta V.P., Ing B. et al. / Ed. D.W. Minter & I.O. Dudka. CAB International, M.G. Kholodny Institute of Botany, Kiev: 1996. – 362 p. 8.Pilat A. Hymenomycetes Carpatorum Orientalium // Acta Mus. Nat. Prag. – 1940 – 2. p. 37-80 9. Fungal Databases Nomenclature and Species Banks Online Taxonomic Novelties Submission. MycoBank [електронний ресурс] http://www.mycobank.org 10. CABI Bioscience Database. Index fungorum [електронний ресурс] http:/www.indexfungorum.org/Names/Names.asp

Надійшла до редколегії 16.11.11

УДК 578.81

А. Бурхан, студ., С. Ромашев, пров. інж., Л. Семчук, канд. біол. наук

ВЗАЄМОВПЛИВ АНТАГОНІСТІВ ФАГА 8573SM ТА ЙОГО ХАЗЯЇНА *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* 8573 ПРИ ЇХ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІЙ КОЕВОЛЮЦІЇ

Показано, що резистентні до фагу 8573sm клони бактерій P. fluorescens IMV 8573 мали різні фенотипи, за здатністю підтримувати репродукцію його h-мутантів. Про зворотній вплив господарів на фаги свідчило те, що h-мутанти вірусів були здатні інфікували лише той резистентний клон, до якого їх виділили.

It is shown, that phage-resistant bacterial clones 8573sm P. fluorescens IMV 8573 had different phenotypes, on the ability to support the reproduction of its h-mutants. On the reverse effect of host on phages indicates that, the h-mutant infected only the clone, to which they are received.

Вступ. Сучасна екологія мікроорганізмів потребує розуміння процесів в органічному світі, їх зв'язок з природою та ролі в них окремих представників. Фаги, що є найбільш численними біологічними об'єктами на Землі можна знайти у всіх еконішах, де є присутні бактерії. Вони регулюють чисельність бактерій, в тому числі і патогенних.

Наземні екосистеми, зокрема, рослинні біоценози, потребують врахування значення ролі фагів та системного вивчення. Це відкриває перспективи створення прогностичної моделі, яка дозволила б, враховуючи ці фактори, запобігати поширенню бактеріальних інфекцій. Одним із важливих питань, що потребує висвітлення, з цієї точки зору, є здатність широкого кола бактерій формувати стійкість до фагової інфекції. Як відомо, взаємовплив антагоністів супроводжується їх коеволюцією. В такій системі, переборювати утворений бар'єр стійкості хазяїна можуть h- мутанти фагів. В природі коеволюція супроводжується змаганням антагоністів "у гонці озброєнь" [5], і є, потужною рушійною силою, що зумовлює їх зміни.

Метою роботи було дослідження другого етапу коеволюційного циклу, що зумовлював селекціонування вузькоспецифічних h- мутантів фагу 8573 sm до окремих резистентних клонів: 8573 Fsm6^r _ 9^r хазяїна *P.fluorescens IMV* 8573. Вказані клони були виявлені, виділені та пасирувані після лізису вказаним вірусом штаму на газоні хазяїна [2].

© Бурхан А., Ромашев С., Семчук Л., 2012

Об'єкт та методи досліджень. В роботі використовували штам фітопатогенних бактерій *Pseudomonas fluorescens IMV 8573*, отриманий з колекції музею Інституту мікробіології та вірусології ім. акад. Д.К. Заболотного НАН України, відділу фітопатогенних бактерій.

Дикий тип фагу 8573sm, використаний в роботі, був виділений в нашій лабораторії. Він утворював прозорі з чіткими краями негативні колонії, діаметром до 3 мм. Згідно із правилами, що застосовуються в лабораторії, у назву фагів включали номер штаму першого хазяїна, використаного при виділенні його із природи (*P. fluorescens IMV 8573)*, який був названий 8573 sm (small plaque – дрібні бляшки).

Титрування фагів проводили по Граціа [1]. Резистентні клони бактерій виявляли на чашках Петрі, після інфікування бактерій (10^6 кл/мл) суспензією фагу 8573sm (10^9 БУО/мл). Накопичення фагів проводили у бульйоні з примусовою аерацією, що дозволяло отримати фаголізат із титром 10^9 -10^{10} БУО/мл. Після цього його освітлювали при 4000g, 20 хв. Концентрацію фагів проводили шляхом центрифугуванням при 90000g, при температурі 5°С, протягом 2 годин. Осад ресуспендували в об'ємі 1/30 від вихідного в 0,1М трис -HCl буфері, pH 7,4. Остаточну очистку проводили центрифугуванням в градієнті щільності 1,4-1,6 $см^3$ хлористого цезію протягом 3 годин, при прискоренні 90000g.

Спектр літичної активності вивчали щодо 17 штамів бактерій (*P. syringae pv. tabaci IMV 223, P. syringae pv. atrofaciens IMV 1025, X. axonopodis pv. beticola IMV 7325, E. carotovora IMV 216, P. syringae pv. aptata IMV 185, P. syringae pv. tabaci IMV 8646, P. chlororophis IMV 8612, P. alliicola IMV 8494, P. syringae pv.phaseolicola IMV 4228, P.syringae pv.phaseolicola IMV 4013, P. viridiflava IMV 8867, P.syringae pv. aptata IMV 8545, P.syringae pv. cerasi IMV 8653, B. polymyxa IMV 9034, P. viridiflava IMV 8868, P. lachrymans IMV 7591, Agr. tumefaciens IMV 8628)*. Виділення ДНК з отриманих препаратів фагів здійснювали методом високотемпературної обробки, з використанням 10% SDS [4]. Порівняльну характеристику геномів фагів та їх h-мутантів проводили за допомогою методу рестрикційного аналізу [3]. В роботі використовували ендонуклеазу *Bgl* II. Гідролізовані ДНК розділяли в 0,7% агарозі, використовуючи ТВЕ буфер[3].

Результати та їх обговорення. Областю практичного використання, із значним потенціалом, є штучне внесення специфічних фагів в рослинні агроценози, для контролю за чисельністю збудників бактеріальних хвороб. Однак, для ефективного практичного застосування фагів важливо враховувати можливі біологічні процеси, що утруднюють ефективність їх застосування. Одним із яких є процес утворення резистентних, до їх інфекції фагами, бактеріальних штамів. Однак, як відомо, у популяціях фагів спонтанно виникають мутанти, що здатні переборювати стійкість резистентного хазяїна. Дослідження коеволюції хазяїв та фагів представляє собою актуальну наукову задачу.Їх коеволюція в умовах відкритої екосистеми може істотно відрізнятися, або мати свої особливості, у порівнянні зі спрощеною лабораторною моделлю "один фаг – одна чутлива бактерія". Однак, лабораторне моделювання зазначених процесів є необхідною умовою для подальшого розуміння особливостей їх циркуляції в природі. Використання у якості об'єкту штаму *Pseudomonas fluorescens* представляє інтерес у зв'язку із тим, що при участі вказаного хазяїна спостерігається швидка та ефективна коеволюція. Використовуючи подібну модель *Brockhurst M.* [5]. та *Paterson S*. [6]. показали, що коеволюція фагів та бактерій відбувається постійно, зумовлюючи збільшення змін у їх популяціях і їх не виявляють у контрольних зразках обох об'єктів. Тобто, мутації дозволяють обом антагоністам швидше пристосовуватись до змінених, ними ж, умов співіснування. Вивчення вказаних закономірностей є актуальною задачею, оскільки представляє як теоретичний, так і практичний інтерес.

Дослідження показали, що взаємодія із фагом 8573sm кожного резистентного клону хазяїна, зумовлює селекцію вузько специфічних мутантів фагів [2]. Даний факт представляє значний науковий інтерес, оскільки учасники коеволюційного процесу представлені лише двома певними генотипами, однак у результаті їх взаємодії виникає цілий ряд відмінних між собою мутантів фагу та його хазяїна.

За допомогою світлової мікроскопії було встановлено, що у клонів *P. fluorescens IMV 8573,* порівняно з вихідною культурою, під впливом фагу змінюються фенотипи. При світловій мікроскопії препаратів бактеріальних клітин хазяїна та його резистентних мутантів у полі зору спостерігали певні індивідуальні особливості. В той час як вихідна бактеріальна культура була утворена окремими клітинами або короткими ланцюжками, резистентні клони варіювали за розмірами (були мілкіші) та утворювали тяжі, "зірочки". тощо.

Одним з критеріїв, що використовують для характеристики фагів є визначення діапазону їх хазяїв. В наших дослідженнях спектр літичної активності визначали вивчали щодо 17 штамів бактерій, що указані в розділі "Матеріали і методи" та дев'яти мутантних резистентних клонів *P. fluorescens* IMV 8573, названі 8573 $Fsm2^r$ – 8573 Fsm 10^r Було встановлено, що h-мутанти фагів мають спільну літичну активність до материнського штамів *P. fluorescens* IMV 8573 та *P. syringae pv. tabaci IMV 223***.** Однак вони не здатні перехресно розмножуватися на інших виділених резистентних клонах хазяїна, крім власного, до якого мутантний фаг був виділений.

У зв'язку із цим, важливо було дослідити, чи супроводжується утворення h-мутантів змінами фагу 8573sm на генетичному рівні. Для виявлення використовували метод рестрикційного аналізу. Порівнювали геноми вихідного фагу 8573 sm та його h-мутантів: 8573h-6, 8573h-7, 8573h-8. Їх ДНК гідролізували специфічною ендонуклеазою *Bgl* II. Отримані фрагменти ДНК розділяли шляхом електрофорезу в 0,7% агарозі та порівнювали між собою (рис. 1)

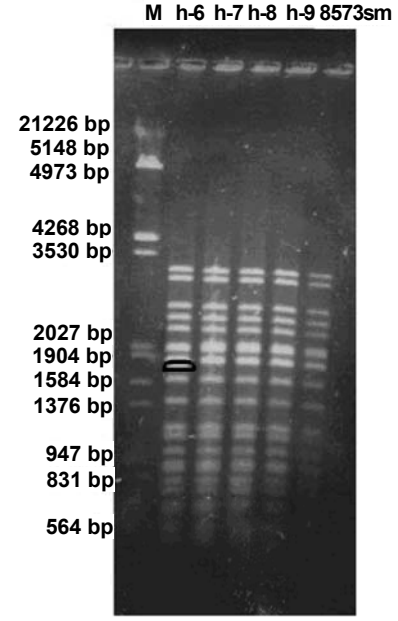


Рис.1. Електрофоретичне розділення фрагментів ДНК фагів групи 8573, після розщеплення рестриктазою *Bgl* II, М – маркер – ДНК фагу λ розщеплена рестриктазами Hind III та EcoR I

На другому треці, (фрагменти ДНК мутанту 8573h-6) виявлений додатковий фрагмент, що відсутній у всій групі та додатково виділений. Результати електрофорезу показали, що ДНК всіх досліджуваних бактеріофагів була чутливими до ферменту. Серед них, ДНК фагів 8573sm, та трьох мутантів (8573h-7, 8573h-8, 8573h-9) мали ідентичні профілі розділення фрагментів, а фаг 8573h-6 мав додатковий фрагмент, походження якого потребує подальшого дослідження.

Висновок. Представлені результати свідчать, що генотип фагу та бактерії, у процесі антагоністичного взаємовпливу дають початок набору резистентних клонів хазяїна, що відрізняються за здатністю підтримувати репродукцію певного h-мутанта фага. Їх негативні колонії на газонах резистентних клонів хазяїна виявляли варіативність за числом та морфологією негативних колоній [2].

Отримані дані вказують на важливість продовження представлених досліджень, оскільки, вони необхідні для подальшого розуміння процесів коеволюції фагів та їх хазяїв, що тривають мільйони років, і завдяки якій, переборюючи взаємні пристосувальні властивості "хижака та жертви" залишаються в екосистемі. Вони, також, дозволяють використовувати фаги та чутливі бактерії, як зручні модельні системи для дослідження еволюційних процесів в природі взагалі [6]. Переваги їхнього використання, полягають у тому, що вони мають високу швидкість розмноження однієї генерації антагоністів за короткий час, високу чисельність популяцій, для цих об'єктів легко зберігати проміжні генерації, а на популяції не впливають зовнішні фактори.

1. Адамс М. Бактериофаги. – Москва: Мир, – 1961. – 527 с. 2. Бурхан Г., Семчук Л., Ромашев С. Експериментальна коеволюція бактеріофагу 8573 m з фітопатогенним хазяїном Pseudomonas fluorescens. Вісн. Київського національного університету імені Тараса Шевченка. – 2010, – 57, – С. 16-18. 3. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. – С. 430..4. Єфименко Т.В., Андрійчук О.М., Ромашев С.А. та ін. Швидке та ефективне виділення ДНК, чутливих до специфічних ендонуклеаз із фагів Pseudomonas та Xanthomonas. // Вісн. Київ. ун-ту. Біологія. – 2001. – 35. – С. 13-16. 5. Brockhurst et al. Experimental coevolution with bacteria and phage: the Pseudomonas fluorescens–Φ2 model system. – 2007. – P.547–552. 6. Elena S. F. Lenski R. E. Evolution experiments with microorganisms: the dynamics and genetic bases of adaptation. Nat.Rev.Genet. – 2003. – P.457–469. 6. Paterson S. et al. Antagonistic coevolution accelerates molecular evolution. Nature. – 2010.

Надійшла до редколегії 15.11.11

УДК 616.6:616.8

А. Пустовалов, канд. біол. наук, М. Матвієнко, асп., М. Дзержинський, д-р біол. наук

ВПЛИВ СТРЕСУ НА МОРФОМЕТРИЧНІ ПАРАМЕТРИ ФУНКЦІОНАЛЬНОЇ АКТИВНОСТІ АСТРОЦИТІВ І НЕЙРОЦИТІВ АРКУАТНОГО ЯДРА ГІПОТАЛАМУСА ЩУРІВ НА РІЗНИХ СТАДІЯХ ЕСТРАЛЬНОГО ЦИКЛУ

Показано, що площа поперечного перерізу ядер астроцитів достовірно зменшується при переході від діеструса до еструса. Натомість, у нейроцитів цей параметр достовірно зростає. При стресі площа поперечного перерізу ядер достовірно збільшується як у нейроцитів, так і в астроцитів.

The significant decrease in astrocytes nuclei cross-sectional area of is shown in the transition from diestrus to estrus. Instead, this option has significantly increased in the neyrocytes. Under stress the nuclei cross-sectional area is significantly increased both in neyrocytes and astrocytes.

Вступ. Великий інтерес викликає вивчення чутливості репродуктивної функції, особливо на гормональному рівні, до подразників оточуючого середовища, зокрема впливу стресу. Стресові фактори здатні порушувати регулярність естрального циклу й негативно впливати на репродуктивну здатність організму [6, 8]. Основою жіночої репродуктивної системи є вісь гіпоталамус – гіпофіз – яєчник, правильне функціонування якої забезпечує дозрівання повноцінної яйцеклітини, запліднення, імплантацію і збереження ранньої вагітності [16]. Вищим органом регуляції гіпоталамо-гіпофізарно-гонадної осі є центральна нервова система, яка шляхом цілого комплексу прямих і зворотних зв'язків забезпечує стабільність роботи системи репродукції при зміні внутрішнього і зовнішнього середовища [11]. Важливо при дослідженні стресорного впливу звернути увагу на стан гіпоталамуса, а саме аркуатного ядра в його медіа базальній частині, яке відіграє ключову роль у регуляції репродуктивної функції. В аркуатному ядрі синтезується гонадотропний рилізінг-гормон (Гн-РГ), який є рилізинг-фактором двох головних гонадотропінів, лютеїнізуючого (ЛГ) і фолікулостимулюючого (ФСГ) гормонів, він надходить у систему воротного кровотоку гіпофіза в імпульсному режимі. Для забезпечення нормальної секреції гонадотропінів достатньо підтримки стабільної частоти викиду фізіологічних кількостей Гн-РГ. Варіації частоти викиду Гн-РГ змінюють не тільки кількість ЛГ і ФСГ, що виділяються гіпофізом, але і їх співвідношення, в той час як навіть десятикратне підвищення концентрації Гн-РГ призводить лише до незначного зниження виділення ФСГ і ніяк не змінює секреції ЛГ. Основними факторами, які регулюють частоту виділення Гн-РГ є опіати і альфа-адреноблокатори. Пульсовий генератор ритму – аркуатне ядро – не потребує для підтримки своєї нормальної роботи жодних впливів з боку інших відділів нервової системи [3,13].

Аркуатне ядро включає в себе кілька популяцій нейроцитів, а також гліальні клітини, зокрема астроцити. Астроцити (astrocyti) – клітини зірчастої форми із численними тонкими відростками, що обплітають нейрони й стінки капілярів, мають розмір 7-25 мкм, складають близько 60% від загальної кількості клітин нейроглії. Незважаючи на те, що ці клітини в десятки разів перевищують кількість нейроцитів, довгий час вони не привертали уваги вчених. Їм відводили лише службову роль – підтримку структури нервової тканини та забезпечення активності нейронів. Останні дослідження показали, що астроцити виконують багато важливих функцій. Є свідчення того, що глія є регулятором циркадіанних функцій організму, беручи участь у синхронізації як ритмів нейрональної активності, так і фізіологічних ритмів на рівні цілого організму [9,15]. Встановлена здатність астроцитів, відростки яких тісно переплітаються з дендритами нейронів, реагувати на збільшення синаптичної концентрації нейротрансміттерів і зміни електричної активності нейронів внаслідок зміни концентрації іонів Ca^{2+} [10, 14, 17]. Це створює хвилю міграції Ca^{2+} між астроцитами, яка в свою чергу може модулювати стан нейронів. За допомогою цих хвиль та вивільнення нейротрансміттерів глія може змінювати збудливість нейронів та ефективність синаптичної передачі, що є основою її координуючого впливу на активність у нейронній мережі [5]. Нейромодуляція – фундаментальний процес, який регулює синаптичну трансмісію та

© Пустовалов А., Матвієнко М., Дзержинський М., 2012

нейрональну активність [1, 7]. Поряд з нейроцитами астроцити беруть участь в інформаційних процесах мозку, які раніше представлялися лише як пасивна передача інформації між цими клітинами. Можливість передачі сигналів від нейронів до глії відкриває багато варіантів для міжклітинних комунікацій [4].

Астроцити поділяють на дві категорії – фіброзні (фібрилярні, волокнисті) та протоплазматичні. Фіброзні астроцити при електронномікроскопічному дослідженні характеризуються світлою цитоплазмою. Ядерна оболонка фіброзних астроцитів може утворювати глибокі складки, а каріоплазма характеризується рівномірною електронною щільністю. Протоплазматичні астроцити мають коротші та більш численні відростки, ніж у фіброзних астроцитів. Цитоплазма протоплазматичних астроцитів містить небагато вільних рибосом і мікротрубочок, багата на мітохондрії [2, 12].

Метою роботи було дослідження змін показників функціональної активності астроцитів і нейроцитів аркуатного ядра гіпоталамуса самок щурів на різних стадіях статевого циклу та в умовах іммобілізаційного стресу.

Матеріали та методи. Експеримент проведений на 24 самках щурів Rattus norvegicus трьохмісячного віку. Тварин, які перебували на стадії еструса і діеструса, піддавали дії іммобілізаційного стресу протягом 1,5 годин. Наприкінці досліду всі тварини були піддані декапітації.

Для гістологічних досліджень видалялися аркуатні ядра гіпоталамуса щурів, які були оброблені за стандартною гістологічною методикою Зрізи для електронної мікроскопії (товщиною 30 нм) виготовляли на ультрамікротомі LKB Ultratom ME III TYP 888802. Ультраструктурне дослідження здійснювали під електронним мікроскопом ТЕМ-125 С (АТ "Селмі", Суми). На мікрофотографіях, отриманих на збільшенні х2400, проводили підрахунок параметрів клітин за допомогою програмного забезпечення Scion Image. Висновки про функціональну активність клітин робили на основі вивчення наступних морфометричних показників: площа перерізу ядер астроцитів і нейроцитів; коефіцієнт форми ядер астроцитів та нейроцитів; кількість ядерних пор на мкм довжини периметру ядра (питома кількість ядерних пор).

Статистичну обробку даних здійснювали за допомогою програмного забезпечення SEWSS STATISTICA 7.0. Вірогідність різниці між морфометричними показниками контрольних та піддослідних груп щурів оцінювали за t-критерієм Стьюдента. Достовірною вважали різницю при p≤0,05.

Результати та їх обговорення. Площа перерізу ядер клітин – перший морфометричний параметр, за яким оцінювалися зміни клітин аркуатного ядра гіпоталамуса в щурів різних експериментальних груп. Ядро головним чином пов'язано з синтетичною функцією, тому перший морфометричний параметр, досліджуваний у даній роботі, дасть можливість зробити висновки про синтетичну активність клітин. Так, нейроцити (НЦ) щурів контрольної групи на стадії еструса (КЕ) показали збільшення площі перерізу ядер (152,52±2,83 мкм^2), порівняно з тваринами на стадії діеструса (КД) (110,83±3,10 мкм^2). При стресі цей морфометричний показник достовірно не змінився у нейроцитів тварин на стадії еструса (СЕ) (238,69±33,14 мкм^2), порівняно з щурами на стадії діеструса (СД) (206,73±12,51 мкм^2). При порівнянні груп тварин в одній стадії естрального циклу, можна відмітити, що нейроцити самок щурів при діеструсі (СД) після впливу стресу проявляється достовірне збільшення площі перерізу ядер (110,83± 3,10 мкм^2), порівняно з щурами, які не піддавалися дії стресу (КД) (206,73±12,51мкм^2). Даний морфометричний показник зазнав достовірного зростання у тварин на стадії еструса на тлі стресу (СЕ) (238,69±33,14 мкм^2), на відміну від тварин контрольної групи (КЕ) (152,52±2,83 мкм^2).

Площа перерізу ядер фіброзних астроцитів (ФА) у тварин контрольної групи на стадії еструса (КЕ) (42,10±1,33 мкм^2) достовірно зменшився, порівняно з щурами на стадії діеструса (КД) (60,07±1,93мкм^2). При стресі ці зміни проявилися в протилежному напрямку, а саме даний морфометричний показник достовірно збільшився у щурів на стадії еструса (СЕ) (92,05±2,66 мкм^2), на відміну від тварин на стадії діеструса (СД) (28,67±1,49мкм^2). Порівнюючи між собою експериментальні групи самок щурів в одній стадії статевого циклу, показано, що в тварин на стадії діеструса після впливу стресу (СД) достовірно знижується площа перерізу ядер фіброзних астроцитів (28,67±1,49мкм^2), на відміну від тварин контрольної групи (КД) (60,07±1,93мкм^2). На стадії еструса спостерігаються протилежні зміни, при стресі у тварин (СЕ) достовірно зростає даний морфометричний показник) (92,05±2,66 мкм^2), порівняно з фіброзними астроцитами щурів контрольної групи (КЕ) (42,10±1,33 мкм^2).

У протоплазматичних астроцитів (ПА) аркутного ядра гіпоталамуса щурів контрольної групи на стадії еструса (КЕ) достовірно збільшилася площа перерізу ядер (58,28±0,61 мкм^2), на відміну від астроцитів на стадії діеструса (КД) (47,80±0,83 мкм^2). Подібним чином даний морфометричний параметр зріс після впливу стресу в тварин на стадії еструса (СЕ) (62,00±2,40 мкм^2), порівняно з щурами на стадії діеструса (СД) (29,16±0,62 мкм^2). Стрес викликав достовірне зменшення площі перерізу ядер протоплазматичних астроцитів у щурів на стадії діеструса (СД) (29,16±0,62 мкм^2), ніж у тварин контрольної групи (КД) (47,80±0,83 мкм^2). У щурів на стадії еструса достовірних змін не зафіксовано між контрольною групою та групою тварин після дії іммобілізаційного стресу.

Другий морфометричний показник, коефіцієнт форми ядер клітин, характеризує ступінь відхилення форми ядра від правильного кола, що пов'язано зі змінами активації транспортних процесів між ядром і цитоплазмою. Коефіцієнт форми ядер нейроцитів у тварин контрольної групи на стадії еструса (КЕ) (0,84±0,02) проявляє тенденцію до збільшення, порівняно з тваринами на стадії діеструса (КД) (0,67±0,10), але статистично достовірних змін не зафіксовано. При стресі нейроцити достовірних змін за даним показником не проявили в групах СД (0,89±0,03) та СЕ (0,69±0,13). Але в щурів на стадії діеструса достовірно зріс коефіцієнт форми ядер після впливу іммобілізаційного стресу (СД) (0,89±0,03), порівняно з контрольною групою (КД) (0,67±0,10). Між групами щурів на стадії еструса КЕ (0,84±0,02) і СЕ (0,69±0,13) не зафіксовано достовірних змін під дією стресу.

У фіброзних астроцитів коефіцієнт форми ядер майже не змінився у тварин контрольної групи на стадії еструса (КЕ) (0,66±0,05), порівняно з діеструсом (КД) (0,64±0,06). Після дії стресу в групи щурів на стадії еструса (СЕ) з'явилася тенденція до зростання за даним морфометричним показником (0,73±0,06), на відміну від тварин на стадії діеструса (0,65±0,05), але ці зміни статистично недостовірні. Астроцити щурів на стадії діеструса практично не змінилися за коефіцієнтом форми після впливу стресу (СД) (0,65±0,05), на відміну від тварин контрольної групи (КД) (0,64±0,06). На стадії еструса в щурів проявляється тенденція до зростання даного морфометричного параметра під дією стресу (СЕ) (0,73±0,06), порівняно з тваринами контрольної групи (КЕ) (0,66±0,05). Але достовірність цих змін статистично не зафіксовано.

В протоплазматичних астроцитах усіх чотирьох експериментальних груп майже не змінився коефіцієнт форми

ядер. У тварин групи КД цей показник становить 0,78±0,05; СД – 0,77±0,07; КЕ – 0,79±0,03; СЕ – 0,79±0,04. Статистично жодної достовірної зміни не відмічено.

Третій морфометричний показник, за яким аналізувалися зміни в клітинах аркуатного ядра гіпоталамуса самок щурів, питома кількість ядерних пор. Як і коефіцієнт форми ядра, цей показник слугує додатковим, уточнюючим критерієм для оцінки ступеня активації транспортних процесів у ядрі. В нейроцитах щурів контрольної групи на стадії естроса (КЕ) існує тенденція до зростання питомої кількості ядерних пор (0,84±0,16), порівняно з тваринами на стадії діестроса (КД) (0,71±0,11), але різниця між групами статистично недостовірна. На тлі стресу достовірно зменшується даний морфометричний показник у групі щурів на стадії естроса (СЕ) (0,28±0,08), порівняно з діеструсом (СД) (0,81±0,24). Під дією стресу в тварин на стадії діестроса (СД) не відмічається достовірних змін питомої кількості ядерних пор (0,81±0,24), порівняно з щурами контрольної групи (КД) (0,71±0,11), але помітна тенденція до зростання цього параметра. На стадії естроса вплив іммобілізаційного стресу спричинив достовірне зменшення даного показника в нейроцитах щурів групи СЕ (0,28±0,08), на відміну від контрольної групи (КЕ) (0,84±0,16).

У фіброзних астроцитів контрольної групи тварин на стадії естроса (КЕ) цей показник питомої кількості ядерних пор сягає 0,75±0,12, що незначно перевищує отримані результати в групі на стадії діестроса (КД) (0,79±0,08). Ненабагато зріс даний морфометричний параметр у групі щурів СЕ (0,79±0,16), порівняно з СД (0,88±0,09) на тлі іммобілізаційного стресу. На стадії діестроса не змінилася питома кількість ядерних пор у щурів контрольної групи (КД) (0,79±0,08), порівняно з СД (0,88±0,09). В тварин на стадії естроса після впливу стресу (СЕ) з'явилася тенденція до зростання даного параметра (0,79±0,16), на відміну з контрольною групою (КЕ) (0,75±0,12). Фіброзні астроцити чотирьох досліджуваних груп щурів не дали достовірних змін за показником питомої кількості ядерних пор.

Показник питомої кількості ядерних пор протоплазматичних астроцитів у контрольній групі щурів на стадії діестроса (КД) (0,81±0,23) більший, порівняно з даними групи тварин на стадії естроса (КЕ) (0,57±0,14), але ці зміни недостовірні. Під впливом стресу цей показник майже не змінюється в щурів на стадії естроса (СЕ) (0,51±0,03), в порівнянні з діеструсом (СД) (0,52±0,07). Протоплазматичні астроцити самок щурів на стадії діестроса проявляють тенденцію до зменшення показника питомої кількості ядерних пор на тлі стресу (СД) (0,52±0,07), на відміну від групи КД (0,81±0,23). Іммобілізаційний стрес не вплинув на суттєві зміни цього параметра в тварин на стадії естроса (СЕ) (0,51±0,03), порівняно з контролем (КЕ) (0,57±0,14). Загалом протоплазматичні астроцити не продемонстрували статистично достовірних змін за показником питомої кількості ядерних пор (табл.1).

***Таблиця* 1. Морфометричні показники клітин аркуатного ядра гіпоталамуса щурів**

Група тварин		КД	КЕ	СД	СЕ
Параметр	Клітини				
Площа перерізу ядер клітин, мкм^2	НЦ	110,83±3,10	152,52±2,83#	206,73±12,51*	238,69±33,14*
	ФА	60,07±1,93	42,10±1,33#	28,67±1,49*	92,05±2,66*#
	ПА	47,80±0,83	58,28±0,61#	29,16±0,62*	62,00±2,40#
Коефіцієнт форми ядер клітин	НЦ	0,67±0,10	0,84±0,02	0,89±0,03*	0,69±0,13
	ФА	0,64±0,06	0,66±0,05	0,65±0,05	0,73±0,06
	ПА	0,78±0,05	0,79±0,03	0,77±0,07	0,79±0,04
Питома кількість ядерних пор	НЦ	0,71±0,11	0,84±0,16	0,81±0,24	0,28±0,08*#
	ФА	0,79±0,08	0,75±0,12	0,79±0,16	0,88±0,09
	ПА	0,81±0,23	0,57±0,14	0,52±0,07	0,51±0,03

– $p<0,05$, порівняно з відповідною групою, на стадії діестроса;

* – $p<0,05$, порівняно з відповідною групою, що не піддавалася дії стресу.

Висновки. Результати дослідження показали, що при стресі у тварин як на стадії естроса, так і на стадії діестроса збільшується площа перерізу ядер нейронів. Фіброзні і протоплазматичні астроцити продемонстрували зростання цього морфометричного параметра в щурів на стадії естроса, але зменшення на стадії діестроса під дією іммобілізаційного стресу. В щурів контрольної групи на стадії діестроса збільшується площа перерізу ядер фіброзних астроцитів, порівняно зі стресованими тваринами. Площа перерізу ядер протоплазматичних астроцитів зменшується при діеструсі як в контролі, так і на тлі стресу. Також показано, що площа перерізу ядер протоплазматичних астроцитів достовірно менше цього показника у фіброзних астроцитів. Недостовірні ці відмінності у протоплазматичних астроцитів стресованих тварин на стадії діестроса, що пов'язано із загальним зменшенням цього параметра у астроцитів даної групи. Протоплазматичні астроцити мають більший коефіцієнт форми ядра, порівняно з фіброзними астроцитами тільки у тварин на стадії діестроса, які не піддавалися стресу. Для фіброзних астроцитів характерна в цілому більш висока щільність ядерних пір, ніж у протоплазматичних астроцитів, однак ці відмінності достовірні тільки у стресованих тварин на стадії естроса.

Отже, зміни параметрів функціональної активності протоплазматичних та фіброзних астроцитів аркуатного ядра не завжди співпадають зі змінами в нейроцитах цього ядра. Так, площа поперечного перерізу ядер двох типів астроцитів достовірно зменшується при переході від діестроса до естроса, натомість у нейроцитів цей показник достовірно зростає. Водночас у стресованих тварин спостерігається зростання площі поперечного перерізу ядер усіх трьох досліджуваних типів клітин, при цьому діапазон коливання розмірів ядер клітин усіх типів виявляється більшим, ніж за відсутності стресу.

1. Agulhon C., Petravicz J., et. al. What is the role of astrocyte calcium in neurophysiology // Neuron. – 2008. – Vol. 59, № 6. – P. 932-946. 2. Blanco V.M., Filosa J.A. Tone-dependent vascular responses to astrocyte-derived signals // American Journal Physiology Heart Circ. Physiology. – 2008 – Vol. 1, № 2. – P. 53-68. 3.Bouret S.G., Draper S.J., Simerly R.B. Formation of Projection Pathways from the Arcuate Nucleus of the Hypothalamus to Hypothalamic Regions Implicated in the Neural Control of Feeding Behavior in Mice // The Journal of Neuroscience. – 2004. – Vol. 11, № 24. – P. 2797-2805. 4.Caleb E. Neurons, glia, and plasticity in normal brain aging // Neurobiology of Aging.- 2003. – Vol. 24, № 1. – P. 123-127. 5.Chung E.K., Chen L.W., et. al. Downregulation of glial glutamate transporters after dopamine denervation in the striatum of 6-hydroxydopamine-lesioned rats // Journal of Comp. Neurology. – 2008. – Vol. 1, № 4. – P. 421-437. 6.Devall A.J., Lovick T.A. Differential activation of the periaqueductal gray by mild anxiogenic stress at different stages of the estrous cycle in female rats.

// Neuropsychopharmacology. – 2010. – Vol. 5, № 35. – P. 1174-1185. 7. Fellin T. Communication between neurons and astrocytes: relevance to the modulation of synaptic and network activity // Neurochemistry. – 2009. – Vol. 3, № 108. – P. 533-544. 8.Goldstein J.M., Jerram M., et. al. Sex differences in stress response circuitry activation dependent on female hormonal cycle. // J. Neurosci. – 2010. – Vol. 2, № 30. – P. 431-438. 9. Jones B.E. Glia, adenosine, and sleep // Neuron. – 2009. – Vol. 2, № 61. – P.156-157. 10.Kreft M., Potokar M., et. al. Regulated exocytosis and vesicle trafficking in astrocytes // Annual New York Academic Science – 2009. – Vol. 1, № 52. – P. 30-42. 11. Lakoski J.M. Cellular electrophysiologycal approaches to the central regulation of female reproductive aging. // Neural control of reproductive function. – J.M. Lakoski, J.R. Perez-Polo, D.K.Rassin (Eds.). -New York: Liss. – 1989, P. 209-220. 12. Oberheim N.A., Takano T., Han X., et. al. Uniquely Hominid Features of Adult Human Astrocytes // The Journal of Neuroscience. – 2009. – Vol. 10, № 29. – P. 3276-3287. 13.Plant T.M., Krey L.S., et. al. The arcuate nucleus and the control of gonadotropin and prolactin secretion in the female rhesus monkey (Macaca mulatta) / /Endocrinology. – 1978. – Vol. 102,№ 1. – P. 52-62. 14. Wang X., Takano T., Nedergaard M. Astrocytic calcium signaling: mechanism and implications for functional brain imaging // Methods of Molecular Biology. – 2009. – Vol. 4, № 89. – P. 93-109. 15. Zueva M., Tsapenko I., Zaguskin S. The Muller cells' function as an indicator of overdose in light therapy // Abstracts of 20th Annual Meeting of SLTBR June 26–28th, Vancouver, British Columbia, Canada. – 2008. – P. 65-66. 16.Запорожан В.М., Холодкова О.Л., Пихтєєв Д.М., Щербатюк А.Л. Морфометричні показники супраоптичного та аркуатного ядер гіпоталамусу експериментальних тварин за умов впливу шкідливих чинників // Морфологія. – 2009. – Т. 3, № 3. – С. 55-59. 17. Коцюмбас Г.І. Гістопатологія головного мозку щурів при експериментальному хронічному Т-2 токсикозі // Науково-технічний бюлетень Інституту біології тварин УААН. – 2005. – Т.1, № 2. – С. 98-103.

Надійшла до редколегії 14.11.11

УДК 612.615

А. Пусь, студ., О. Юрченко, канд. мед. наук,
Н. Скрипник, канд. біол. наук

ВИВЧЕННЯ ОСОБЛИВОСТЕЙ ПУХЛИННИХ КЛІТИН ПРИ НАБУТТІ ФЕНОТИПУ ЛІКАРСЬКОЇ РЕЗИСТЕНТНОСТІ

Вивчено основні молекулярно-біологічні зміни при набутті резистентності до цитотоксичної дії доксорубіцину клітин раку молочної залози лінії MCF-7. Показано, що для пухлинних клітин з набутою резистентністю до доксорубіцину є характерною гіперекспресія P-gp, відсутність рецепторів стероїдних гормонів, зниження кількості активно проліферуючих клітин, зміни морфологічної будови, які пов'язані зі збільшенням ступеня диференціювання резистентних клітин. Зміни біологічних властивостей, які відбуваються при набутті клітинами резистентного фенотипу, відповідають за різні складові механізму виникнення множинної лікарської резистентності, основною метою якого є забезпечення життєдіяльності клітин під впливом токсичної дії протипухлинного препарату.

Main molecular-biologic changes suffered by the MCF-7 line of cancer cells of mammary gland at forming of their resistance to the cytotoxic action of the doxorubicin were studied. It was shown that tumor cells with developed resistance to the doxorubicin are characterized by a hyper expression of P-gp, absence of steroid hormone receptors, low amount of actively proliferating cells, and change in the morphological structure that is connected with the degree of differentiation in between the resistant cells. Changes in biological properties, which occur during acquiring of the resistant phenotype by the cells, are responsible for different components of onset mechanisms of the multivariate doctoral resistance, which is targeted at supporting vital functions of cells under the toxic effect of the antitumor drug.

Вступ. Лікарська терапія пухлин є основним, а при деяких формах та стадіях поширення пухлинного процесу, єдиним методом лікування онкологічних хворих. Незважаючи на значне розширення арсеналу протипухлинних препаратів (ППП), сучасний стан консервативних методів лікування злоякісних пухлин залишається незадовільним. Більшість ППП мають ряд недоліків, до яких відносять відсутність вибірковості дії та, внаслідок цього, високу загальну токсичність. Однією з найбільш серйозних перешкод підвищення ефективності специфічної терапії пухлин, як і раніше, залишається стійкість пухлинних клітин до цитотоксичної дії ППП [3, 7].

Згідно спостережень клініцистів та результатів фундаментальних досліджень резистентність формується по відношенню майже до кожного ефективного ППП, і в її розвитку задіяні чисельні механізми, такі як гіперфункція АТФ-залежних транспортерів, робота системи внутрішньоклітинної детоксикації, що забезпечується активністю ферментів родини глутатіон-*S*-трансфераз та глутатіон-редуктази, підвищення рівню активності репаративних процесів, зміни властивостей молекулярних мішеней ППП (зокрема топоізомераз I та II), або застосування клітинами пухлини альтернативних метаболічних шляхів біосинтезу життєво необхідних субстратів. Усі зазначенні вище механізми забезпечення фенотипу лікарської стійкості, так чи інакше, досягають однієї мети: вони спрямовані на запобігання взаємодії цитотоксину з внутрішньоклітинною мішенню та на швидку ліквідацію наслідків такої взаємодії [6].

Отже, розвиток множинної лікарської резистентності (МЛР) є багатофакторним процесом, що залежить від багатьох складових [8]. Визначення окремих чинників, які пов'язані з виникненням резистентності, не в змозі пояснити загальну картину цього явища, тому потрібне комплексне дослідження біологічних особливостей пухлинних клітин, які набули стійкості до цитотоксичної дії ППП і стали резистентними до них.

Об'єкт та методи досліджень. Дослідження проведені на клітинах лінії MCF-7, яка була отримана з плевральної рідини хворого на метастатичний рак молочної залози (РМЗ) в 1970 році [1], і по сьогоднішній день залишається зручною модельною системою РЕ-позитивного РМЗ. Лінія MCF-7 була отримана з Національного банку клітинних ліній та пухлинних штамів Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології НАН України. Клітини вихідної лінії MCF-7 культивували у культуральному середовищі *Dulbecco ISCOV* (*Sigma*, США) з додаванням 10% ембріональної телячої сироватки (*Sigma*, США) у зволоженій атмосфері з 5% CO_2, при температурі 37^{o}C. Клітини пересівали двічі на тиждень з щільністю посіву 2-4×104 клітин на см^2 поверхні. Пересів клітин робили, коли 50% поверхні було зайнято клітинами.

Для дослідження змін біологічних властивостей клітин при формуванні резистентності до цитотоксичної дії доксорубіцину з клітинної лінії MCF-7 була отримана сублінія клітин MCF-7/Dox (резистентна до цитотоксичної дії доксорубіцину) шляхом вирощування вихідних клітин лінії MCF-7 у культуральному середовищі, в яке додавали зростаючі концентрації доксорубіцину ("Ебеве", Австрія) в діапазоні доз від 0,1 до 32 мкг/мл. Доксорубіцин додавали двічі на тиждень після пересіву клітин.

Тестування досліджуваних клітин для встановлення рівня їх резистентності проводили кожні два місяці за допомогою гістоаналізу з використанням 0,4% розчину вітального барвника трипанового синього. Морфологічний аналіз проводили після забарвлення цитологічних препаратів клітин лінії MCF-7 та MCF-7/Dox за Романовським-Гімза.

Для виготовлення цитологічних препаратів, клітини вирощували на покривних скельцях, які знаходилися в

© Пусь А., Юрченко О., Скрипник Н., 2012

стерильних чашках Петрі, заповнених культуральним середовищем, одну добу за стандартних умов. Через добу поверхня скелець була зайнята клітинами на 80%. Скельця діставали з чашок Петрі, відмивали від залишків середовища у фізіологічному розчині та забарвлювали.

На першому етапі забарвлення на скельця наносили азур – еозин за прописом Романовського у розведенні 1:5 на 1 хвилину. Потім, не змиваючи барвник, на скельця додавали декілька крапель дистильованої води на 30 секунд. Барвник змивали проточною водою. На другому етапі обробки препаратів проводили забарвлення розчином Майн-Грюнвальда, який наносили на скельця на 45 секунд. Після цього препарати відмивали проточною водою та підсушували. Препарати аналізували за допомогою імерсійної системи мікроскопа *Axiophot* (*Zeiss*, Німеччина) при збільшенні 1000х.

Для визначення імунофенотипових особливостей пухлинних клітин лінії MCF-7 та її сублінії, резистентної до цитотоксичної дії доксорубіцину – MCF-7/Dox, було використано комплекс клітинних маркерів, що визначалися імуноцитохімічно. Було досліджено експресію ряду білків, пов'язаних з лікарською резистентністю – P-gp, рецепторів стероїдних гормонів – рецептори естрогенів (РЕ) та рецептор прогестерону (РП), антигену проліферації Ki-67.

Клітини для імуноцитохімічних досліджень вирощували на покривних скельцях в чашках Петрі одну добу, після чого фіксували в 4%-ому розчині параформальдегіду протягом 20 хвилин. Для оптимізації імуноцитофенотипування внутрішньоклітинних антигенів клітини фіксували розчином метиловий спирт-ацетон у співвідношенні 1:1 при температурі -20^{o}C протягом 12 годин. Далі проводили ретельне відмивання фіксованих клітин у декількох порціях забуференого фізіологічного розчину впродовж 2 годин при температурі 4^{o}C. Для зменшення неспецифічного забарвлення клітини 30 хвилин інкубували в 1%-ому розчині бичачого сироваткового альбуміну.

Визначення рівня експресії маркерних білків проводили за допомогою моноклональних антитіл (МКАТ) проти P-gp, Ki-67, РЕ та РП (*DakoCytomation*, Данія) впродовж 1 години, після чого застосовували ПАП-метод або систему візуалізації *EnVision* (DakoCytomation, Данія), кон'югована з лужною фосфатазою або пероксидазою. Через 30 хвилин проводили визначення рівня активності ферменту за допомогою модифікованого методу *Graham, Karnovsky* із застосуванням в якості субстратів 3-аміно-9-етилкарбазолу або, для системи візуалізації *EnVision*, кон'югованої з пероксидозою, 3,3'-діамінобензидину солянокислого. При застосуванні системи візуалізації *EnVision*, кон'югованої з лужною фосфатазою, проводили цитохімічне дослідження ферменту методом азосполучення за допомогою *Fast Red TR* (*4-Chloro-2-methylbenzene-diazonium salt*).

По закінченню імуноцитохімічної реакції препарати промивали водою, дофарбовували гематоксиліном (5-10 секунд) та заключали у *Faramount Aqueous Mounting Medium* (*DakoCytomation*, Данія). В якості позитивного контролю для кожного дослідження використовували МКАТ проти пан – цитокератинів, в якості негативного контролю – МКАТ того ж самого ізотипу, як і дослідне МКАТ, але яке завідомо не експресувалося у епітеліальних клітинах (наприклад МКАТ CD45 – загальне лейкоцитарне антитіло). Поява в ядрах досліджених клітин коричневого або червоного забарвлення, в залежності від використаного субстрату (діамінобензидин або 3-аміно-9-етилкарбазол, *Fast Red TR* чи *Perma Red/AP*), свідчить про наявність експресії Ki-67, РЕ та РП, в той час як забарвлення цитоплазми є характерною ознакою експресії P-gp.

Аналіз імуноцитохімічних препаратів проводили з використанням світлооптичного мікроскопу *Axiophot* (*Zeiss*, Німеччина) з подальшим підрахунком позитивно та негативно забарвлених клітин [2].

Статистичну обробку отриманих результатів проводили за допомогою математичної програми медико – біологічної статистики *STATISTICA* 6.0. Обчислення і порівняння достовірності відмінностей середніх величин проводили з використанням *t*-критерію Ст'юдента; достовірними вважали відмінності з вірогідністю не менше 95% ($P<0,05$).

Результати та їх обговорення. Аналіз експериментального цитологічного матеріалу, проведений з використанням стандартного забарвлення трипановим синім, показав зростання у 8 разів стійкості до цитотоксичної дії доксорубіцину клітин (визначалось за рівнем їх виживаності), що культивувалися у культуральному середовищі з додаванням доксорубіцину, на відміну від клітин вихідної лінії MCF-7, які є чутливими до його впливу. Слід відмітити, що отриманий рівень резистентності не змінювався протягом 1,5 місяців і зберігався при подальшому кріозберіганні клітин.

При культивуванні клітини РМЗ лінії MCF-7 утворювали колонії, в яких клітини щільно прилягали одна до одної. Лише невелика кількість клітин виходила за межі колоній та змінювала форму, утворюючи невеликі цитоплазматичні вирости. На відміну від вихідних клітин MCF-7, клітини лінії MCF-7/Dox не виявляли тенденції до колонієутворення, між клітинами були наявні значні проміжки, а самі клітини контактували одна з одною за допомогою цитоплазматичних виростів, які, в деяких клітинах, набували досить суттєвого розміру [4].

При морфологічному аналізі дослідного матеріалу було встановлено, що клітини лінії MCF-7 представлені клітинами округлої форми, в той час як їх резистентні аналоги, клітини MCF-7/Dox, мали веретеноподібну форму. Клітини, резистентні до доксорубіцину, більші за розмірами, ніж клітини лінії MCF-7, мали високе ядерно-цитоплазматичне співвідношення. Вихідні клітини мали ядро округлої форми, основу якого складав еухроматин, та добре розвинуте ядерце, як правило, розташоване, в центрі ядра. Для резистентних клітин було характерним переважання в ядрі гетерохроматину та наявність одного, іноді двох ядерець, розташованих по периферії ядра. Морфологія резистентних клітин свідчить про збільшення рівня диференціювання резистентних клітин та високу метаболічну активність, яка пов'язана, ймовірніше за все, з синтезом та транспортом протеїнів.

Виникнення МЛР до ППП в пухлинних клітинах може відбуватись за різними механізмами. Стартовим чинником одного з них є ампліфікація гену *mdr1* і, відповідно, експресія специфічного білку – P-gp – АТФ-залежного транспортеру токсичних речовин, в тому числі і ППП [5]. Відомо, що молочна залоза належить до органів, тканини яких в нормі не експресують мембранний білок P-gp. В багатьох випадках РМЗ цей глікопротеїн також не виявляється і до проведення хіміотерапевтичного лікування.

Проведений нами імуноцитохімічний аналіз характеру експресії P-gp в клітинах вихідної лінії MCF-7 показав відсутність даного глікопротеїну в плазматичній мембрані, тоді як в резистентних клітинах сублінії MCF-7/Dox експресія P-gp виявляється в більшості клітин (82,61,4%). Отже, при розвиткові резистентності до цитотоксичної дії доксорубіцину клітини сублінії MCF-7/Dox не лише набувають читко визначених морфологічних змін, але й змінюють імунофенотиповий профіль: з'являється експресія P-gp, що свідчить про залучення АТФ-залежних транспортерів до швидкого виведення доксорубіцину з клітин, що унеможливлює досягнення

необхідної концентрації цитостатику для здійснення цитотоксичного ефекту.

На сьогоднішній день вже не викликає сумнівів той факт, що експресія рецепторів стероїдних гормонів злоякісними клітинами при РМЗ асоціюється з їх чутливістю до гормональної терапії, дає змогу прогнозувати перебіг захворювання і є важливим фактором для вибору адекватного лікування. Імуноцитохімічний аналіз експресії РП та РЕ в клітинах вихідної та резистентної сублінії показав, що у клітинах з фенотипом МЛР відбувається значне зниження рівня їх експресії. Якщо для клітин вихідної лінії MCF-7 кількість клітин, що експресують РП дорівнює 40,6 ± 0,6 %, а позитивних на РЕ – 20,6 ± 0,6%, то набуття резистентності призводить до майже повного зникнення експресії рецепторів як естрогенів, так і прогестерону [9].

Відомо, що дерегуляція експресії рецепторів стероїдних гормонів вносить значний внесок у розвиток та прогресію більшості випадків РМЗ. Стероїдні гормони та відповідні рецептори діють як фактори транскрипції, є активаторами різновекторних клітинних сигнальних шляхів, сприяють фізіологічному проходженню клітин клітинного циклу. Зникнення рецепторів стероїдних гормонів може асоціюватись із змінами рівня проліферації в клітинах. Порушення ж регуляції клітинного циклу є однією з основних ознак злоякісних новоутворень, що відбивається у характерній для пухлинних клітин збільшеній і нерегульованій проліферативній активності. І хоча на сьогодні проводяться масштабні дослідження по вивченню клітинного циклу та його порушень в пухлинних клітинах, але ще й досі не з'ясовано, які зміни виникають в них при набутті резистентності.

Не менш важливою прогностичною ознакою, що визначає ступінь злоякісності та агресивний потенціал пухлини, є показник проліферації злоякіснотрансформованих клітин. Імуноцитохімічне визначення характеру експресії Кі-67 (вона виявляється в ядрі клітини, що діляться, в усіх фазах клітинного циклу, крім G0 та ранньої G1) дозволило визначити кількість активно проліферуючих клітин. Проведений аналіз показав, що для клітин, резистентних до доксорубіцину, характерне зменшення на 10% кількості клітин, які експресують Кі-67. Крім того, було встановлено, що клітини лінії MCF-7/Dox відрізняється від клітин вихідної лінії і за швидкістю проліферації. Час подвоєння резистентних клітин лінії MCF-7/Dox є більшим і становить 23±0,5 години, тоді як час подвоєння вихідних клітин лінії MCF-7 – лише 19±0,5 години.

Висновки. Набуття резистентності до цитотоксичної дії доксорубіцину клітинами РМЗ лінії MCF-7 призводить до морфологічних та фенотипових змін в резистентних клітинах. Показано, що для пухлинних клітин з набутою резистентністю до доксорубіцину є характерною гіперекспресія P-gp, відсутність рецепторів стероїдних гормонів, зниження кількості активно проліферуючих клітин, у порівнянні з вихідними клітинами, зміни морфологічної будови, які пов'язані зі збільшенням ступеня диференціювання резистентних клітин. Зміни біологічних властивостей, які відбуваються при набутті клітинами резистентного фенотипу, відповідають за різні складові механізму виникнення МЛР, основною метою якого є забезпечення життєдіяльності клітин під впливом токсичної дії ППП.

1. Копнин Б.П. Неопластическая клетка: основные свойства и механизмы их возникновения // Практическая онкология. – 2002. – Том. 3, № 4. – С. 229 – 235. 2. Чехун В.Ф. Современные взгляды на формирование лекарственной устойчивости опухолей // Онкология. – 2000. – Том. 2, № 1-2. – С.11 – 15. 3. Baguley B.C. Multiple drug resistance mechanisms in cancer // Mol. Biotechnol. – 2010. – Vol. 46, № 3. – P. 308-316. 4. Gillet J.P. Mechanisms of multi drug resistance in cancer // Methods Mol. Biol. – 2010. – Vol. 596. – P. 47 – 76. 5. Gottesman M.M., Fojo T. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters // Nat. Rev. Cancer. – 2002. – Vol. 2(1). – P. 48 – 58. 6. Hembruff S., Laberge M., Villeneuve D. et al. / Role of drug transporters and drug accumulation in the temporal acquisition of drug resistance // BMC Cancer. – 2008. – Vol. 8. – P. 318-334. 7. Nooter K., Herweijer H. Multidrug resistance (mdr) genes in human cancer // Br. J. Cancer. – 1991. – Vol. 63, № 5. – P. 663-669. 8. Quintieri L., Fantin M., Vizler C. Identification of molecular determinants of tumor sensitivity and resistance of anticancer drug // Adv. Exp. Med. Biol. – 2007. – Vol. 593. – P. 95-104. 9. Yeates C., Hunt S.M., Balleine R.L., Clarke C.L. Characterization of a truncated estrogene receptor protein in breast tumors // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2008. – Vol. 83. – P. 460 – 467.

Надійшла до редколегії 12.12.11

УДК 578.

О. Білан, студ., О. Шевченко, канд. біол. наук, В. Поліщук, д-р біол. наук

РОЗВИТОК ВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ В МОДЕЛЬНІЙ СИСТЕМІ "NICOTIANA TABACUM CV. SAMSUN – ВІРУС ТЮТЮНОВОЇ МОЗАЇКИ" ПІД ВПЛИВОМ УЛЬТРАФІОЛЕТОВОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ

В статті наведено результати дослідження особливостей перебігу вірусної інфекції, проведених у модельній системі Nicotiana tabacum cv. Samsun – вірус тютюнової мозаїки, під дією ультрафіолетового випромінювання типу С.

Article includes experimental results which demonstrate alteration of viral infection, conducted in model system Nicotiana tabacum cv. Samsun – Tobacco Mosaic Virus, under the influence of UV-C.

Вступ. Живі організми знаходяться під впливом багатьох абіотичних та біотичних факторів. Це має особливе значення для факторів, інтенсивність дії яких значно зросла із збільшенням техногенного забруднення зовнішнього середовища [1]. Наприклад, в результаті зменшення щільності озонового шару відбувається збільшення проникності ультрафіолетового випромінення у нижні шари атмосфери, відповідно вплив типу випромінення на живі організми, в тому числі і на рослини, стає більш істотним. Надмірна кількість ультрафіолетового випромінення впливає на ростові процеси, стабільність геному та біохімічні показники рослинного організму [2]. Віруси рослин, як облігатні внутрішньоклітинні паразити, також здатні впливати на активність біологічно активних сполук клітини, підпорядковувати білковий синтез для утворення структурних і неструктурних вірусних білків, змінювати структурний і функціональний стан органел, впливати на хід фізіологічних процесів та викликати патологічні зміни тканин і органів рослин [3]. На сьогоднішній день актуальним є вивчення вірусної інфекції у рослин, які зазнають додаткових стресових впливів. Особливий інтерес викликає дія випромінення, яке здатне впливати на фізіологічний стан рослин і на структуру та інфекційність вірусів, тому інфекційний процес у рослинному організмі під впливом ультрафіолетового випромінення потребує більш детального вивчення.

© Білан О., Шевченко О., Поліщук В., 2012

Метою даної роботи є вивчення особливостей динаміки розвитку інфекції, викликаної вірусом тютюнової мозаїки у рослин *Nicotiana tabacum* cv. Samsun при дії ультрафіолетового випромінення. Встановлення кореляційних залежностей проходження вірусної інфекції при дії ультрафіолетового випромінення може бути важливим для кращого розуміння процесів, які визначають особливості поширення вірусів рослин у природі.

Методи та матеріали. Об'єктами досліджень були 5 груп рослин *Nicotiana tabacum* cv.Samsun вирощених в однакових стандартних умовах. Зараження проводили вірусом тютюнової мозаїки (ВТМ) методом механічної інокуляції. Згідно схеми досліду, рослини групи №1 були інокульовані перед опроміненням, а рослини групи №3 – після опромінення ультрафіолетом типу С. рослини групи №2 були інокульовані ВТМ та виступали в якості позитивного контролю. До контрольних груп №4 та №5 належали опромінені рослини, які не були інокульовані ВТМ, та інтактні рослини, відповідно. Опромінення рослин проводили за допомогою ультрафіолетової лампи УФ-С типу АОБМ-150м на відстані 25 см від джерела ультрафіолетового випромінювання. Потужність УФ-С випромінювання складала 3,4 Вт/м^2, час експозиції – 3 хв 41 с, енергія випромінювання – 750 Дж/м^2. Для визначення концентрації вірусу в дослідних рослинах застосовували імуноферментний аналіз (ІФА) у "сандвіч"-модифікації з використанням специфічної комерційної-системи виробництва Loewe (Німеччина) [4]. Результати ІФА реєстрували на автоматичному ELISA-рідері при довжині хвилі 405 нм. За позитивний результат приймався показник E_{405}, що принаймні вдвічі перевищував показник негативного контролю (сік здорової рослини) [5, 6].

Результати та їх обговорення. В результаті візуального спостереження було відмічено зміну морфології листкових пластинок опромінених рослин. Дані симптоми були виявлені на 4-й день після опромінення. Морфологічні зміни листкових пластинок проявлялись у загортанні країв догори і були виявлені у всіх групах рослин, які були опромінені ультрафіолетом-С (Рис.1). У рослин, які не були опромінені, подібних ефектів виявлено не було. Огляд рослин групи №4 показав, що ультрафіолетове випромінювання може викликати вірусоподібні симптоми на листках. Візуальне обстеження рослин групи №1, які були опромінені ультрафіолетовим випромінюванням та інокульовані ВТМ, показало наявність симптомів вірусної інфекції на листкових пластинках (Рис.2). У рослин групи №3, які спочатку були опромінені, а потім механічно інокульовані ВТМ, симптомів симптомів вірусної інфекції також виявлено не було. Відсутність симптомів вірусної інфекції у рослин групи №3 може свідчити про здатність ультрафіолетового випромінювання індукувати маскування симптомів вірусної інфекції (Рис.2).

а б в

Рис.1. Деформація листкових пластинок Nicotiana tabacum cv. Samsun під дією ультрафіолетового випромінювання.
а – рослини групи №3, б – рослини групи №1, в – рослини групи №4

а б

Рис.2. Симптоми ВТМ на рослинах *Nicotiana tabacum* cv. Samsun.
а – Мозаїка, викликана ВТМ (група №1); б – Інтактні рослини (відсутність симптомів, група №5)

Порівняльний аналіз вмісту ВТМ (оптичної густини E_{405}) у системно інфікованих листкових тканинах тютюну на 14-й та 30-й день після інфікування не виявив статистично значимих відмінностей у вмісті вірусу в рослинах груп №1, №2 і №3. Таким чином, ультрафіолетове опромінення типу С достовірно не впливає на концентрацію ВТМ в рослині, а отже – й на ефективність його реплікації (Рис.3).

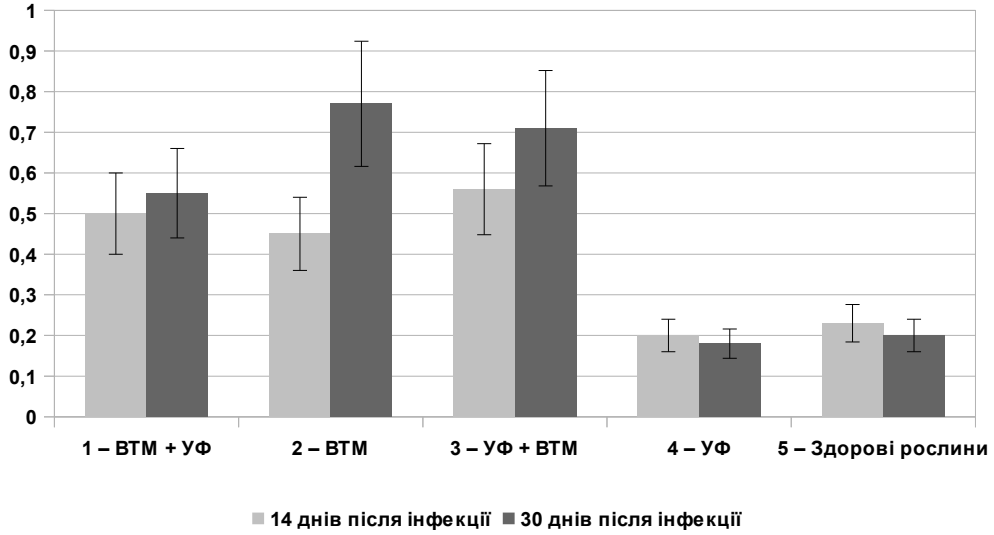


Рис.3. Вміст ВТМ у рослинах тютюну під впливом ультрафіолетового випромінювання типу С на 14 та 30 день після інфекції

Висновки. Досліджено особливості розвитку системної вірусної інфекції під стресовим впливом ультрафіолетового випромінювання типу С у модельній системі "рослини *Nicotiana tabacum* cv. Samsun – вірус тютюнової мозаїки". Показано, що ультрафіолетове випромінювання типу С у стресовій для рослин дозі на віддалено ранніх етапах вірусної інфекції не чинить достовірного впливу на вміст ВТМ у рослинах тютюну. Вперше продемонстровано, що під впливом ультрафіолетового випромінювання типу С відбувається "маскування" типових мозаїчних симптомів вірусної інфекції, не зважаючи на накопичення ВТМ у системно інфікованих рослинах тютюну.

1. A. Dmitriev, O. Shevchenko, V. Polischuk, and N. Guscha Effects of low dose chronic radiation and heavy metals on plants and their fungal and virus infection // Data Science Journal. – 2009. – V.8. – 24 September. – P. 49 – 57. 2. Pyle J.A. Global ozone depletion: observation and theory. Plants and UV-B. Responses to Environmental Change // Cambridge University Press. – 1996. – P.3 –12. 3. Balachandran S. Concepts of plant biotic stress. Some insights into the stress physiology of virus-infected plants, from the perspective of photosynthesis // Physiologia Plantarum. – V.100. – P.203-213. 4. Crowther J.R. ELISA. Theory and practice. – N.Y.: Humana Press, 1995. – 96 p. 5. Антитела 1. Методы // Под ред. Д. Кэтти – М.: Мир, 1991. – 196 с. 6. Антитела 2. Методы // Под ред. Д. Кэтти – М.: Мир, 1991. – 216 с.

Надійшла до редколегії 13.12.11

УДК 577.151.6:612.115:616-005

Н. Бурлова-Васильева, канд. біол. наук,
О. Савчук, д-р біол. наук, Л. Остапченко, проф.

ЗАСТОСУВАННЯ МЕТОДУ АГРЕГОМЕТРІЇ ДЛЯ ВИВЧЕННЯ ВПЛИВУ НА ТРОМБОЦИТИ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ СПОЛУК

В статті описано підходи до визначення біологічних властивостей компонентів отрути Agkistrodon blomhoffi usuriensis. Визначено дві субстанції, які мають здатність інгібувати агрегацію тромбоцитів in vitro. Ступінь інгібування залежить від концентрації ефектора і від часу його інкубації з пробою.

This report reviews the scientific approaches used during the investigation of Agkistrodon blomhoffi usuriensis venom components. It was shown that the venom contained two components inhibiting platelet aggregation. The inhibition extent depended on effector concentration and incubation time.

Вступ. Застосування методу агрегометрії є одним з найпоширеніших підходів аналізу стану тромбоцитарної ланки гемостазу. Даний метод дозволяє дослідити не лише процес агрегації, а й оцінити адгезивну та секреторну функцію тромбоцитів. Тромботичні ускладнення є основною причиною розвитку таких важких захворювань, як інфаркт міокарда різної етіології, атеросклероз, гіпертонія і порушення мозкового кровообігу. Саме тому проблема ефективної діагностики стану тромбоцитарної ланки гемостазу та тестування ефективності фармацевтичних препаратів привертає особливу увагу.

Для лікування патологічного тромбоутворення на сьогоднішній день найбільш ефективними є антиагрегантна і тромболітична терапії. Значна кількість антиагрегантів, які застосовують у медичній практиці, отримані/розроблені на основі білків зміїної отрути [11, 5]. Отрути є багатим джерелом протеолітичних ферментів, які застосовуються чи можуть бути застосовані для діагностики серцево-судинних захворювань, а також для лікування і профілактики тромботичних ускладнень. Таким токсинам притаманні як прокоагулянтні, так і антикоагулянтні властивості, а також здатність впливати на функціонування ендотеліоцитів та тромбоцитів [6, 2, 14].

У даній роботі ми описуємо застосування методу агрегометрії для визначення характеристик компонентів отрути, які впливають на функціонування тромбоцитів з метою виділення білків, які мають терапевтичну цінність.

Об'єкт та методи досліджень. У роботі використовували плазму крові кроля, збагачену тромбоцитами. Кров відбирали пункцією вушної вени з додаванням розчину цитрату натрію (38 г / л) в кінцевому співвідношенні 9:1 і центрифугували 20 хв за 150 g і температури 20° С. Надосадову рідину, яка містила тромбоцити, відбирали і перевіряли клітини на активність за допомогою АДФ. При внесенні в пробу 2,5 мкм індуктора спостерігали агрегацію тромбоцитів.

Агрегацій ну активність реєстрували за допомогою агрегометра АР2110 фірми "Солар" (Білорусь). Реєстрували такі параметри агрегаційної кривої, як ступінь агрегації (%) максимальний рівень світлопропускання плазми крові після внесення ефектора. За 1 одиницю

© Бурлова-Васильева Н., Савчук О., Остапченко Л., 2012

активності інгібітора агрегації тромбоцитів приймали 50% інгібування АДФ-залежної агрегації клітин контрольного зразка. Зміст тромбоцитів стандартизували за показаннями приладу, концентрація клітин становила приблизно 200 000 в мкл кожної проби.

Результати та їх обговорення. До складу зміїної отрути входить ряд компонентів, які впливають на функціонування тромбоцитів. Серед них інгібітори агрегації тромбоцитів, які сприяють припиненню тромбоутворення на стадії формування тромбоцитарних агрегатів. Інгібітори агрегації тромбоцитів ще відомі під назвою дезінтегріни. Вони являють собою пептиди з молекулярною масою 5 – 8 кДа [4, 1]. На сьогоднішній день найбільш ефективними з антиагрегантних препаратів є антагоністи і блокатори глікопротеїнових рецепторів тромбоцитів GP IIb/IIIa. Са-залежний глікопротеїновий IIb / IIIa комплекс – основний рецептор на поверхні клітин і може взаємодіяти з одним з чотирьох протеїнів: фібриногеном, фібронектином, фактором фон Віллебранда і вітронектином (всі містять RGDдомен).

RGD-вмісні білки з отрути змій інгібують агрегацію тромбоцитів шляхом зворотного блокування GPIIb/IIIa рецептора [10]. Інгібування RGD-залежних інтегринів є основною метою фармакологічних досліджень в області багатьох захворювань. Блокування інтегральних рецепторів на тромбоцитах, особливо IIb/IIIa, може також мати застосування в лікуванні певних типів раку [7, 9, 3]. Добре відомо, що тромбоцити беруть участь в механізмах, відбуваються під час росту пухлини, ангіогенезу і утворення метастазів [8].

Зміїні отрути також є найбільш ефективним джерелом фосфоліпази А2. Фосфоліпази з отрут змій розрізняються за своєю структурі і мають безліч ізоформ, вони вміщують від 1 до 5 гомологічних доменів, які складаються з 120 амінокислот, і мають молекулярну масу 14 – 17 кДа. Ферменти містять гістидин в каталітичному центрі і виявляють фосфоліпазну активність у присутності міллімолярних концентрацій кальцію. Вони мають висококонсервативні амінокислотні послідовності в каталітичному центрі і ділянці кальційзв'язуючої петлі, а також 6 – 8 консервативних сульфідних містків. В активному центрі знаходиться також аспартат, який спільно з кальційзв'язуючим доменом виконує роль кишені для іона Са2 +. Ці ферменти каталізують гідроліз фосфоліпідів у позиції 2 з вивільненням жирної кислоти і відповідного лізофосфоліпіду [13]. Фосфоліпази класу А2 з отрут змій виявляють широке розмаїття фармакологічних ефектів, порушуючи протікання фізіологічних процесів [12]. Фермент активує каскад запальних реакцій, які характеризуються підвищенням проникності капілярів і формуванням набряку, зосередженням лейкоцитів і вивільненням запальних медіаторів, що призводить до численних системних і локальних запальних процесів у людей. принципу і механізму дії фосфоліпази може дати ключ до розуміння отруйної дії зміїного укусу і допомогти в розробці альтернатив традиційним протиотрутам. Ці ферменти є дуже токсичними і впливають на функціонування тромбоцитарної ланки системи гемостазу за рахунок розщеплення мембранних трогліцеридів.

Як бачимо з Рис. 1. у складі отрути виявлено компоненти, які інгібують агрегацію тромбоцитів. Найбільш ефективними інгібіторами є фракція 2 та фракція 3. Подальше дослідження цих компонентів з використанням специфічних хромогенних та флюорогенних субстратів дозволить встановити, до якої групи належить ці інгібітори.

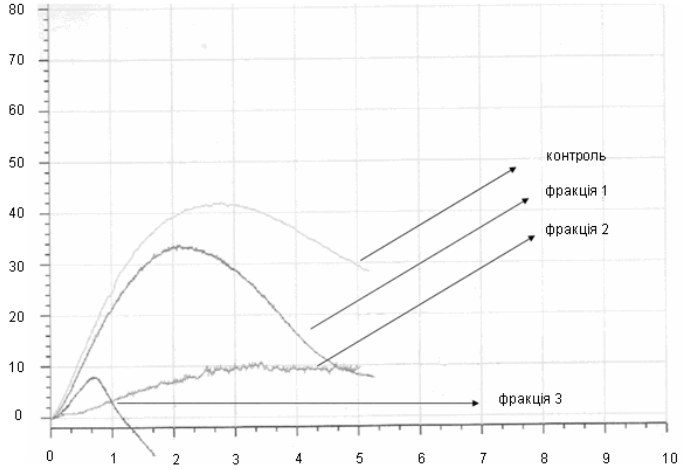


Рис. 1. Вплив різних фракцій отрути Agkistrodon blomhoffi usuriensis на агрегацію тромбоцитів

На Рис. 2. представлені дані інгібування агрегаційної активності тромбоцитів фракцією 3 отрути Agkistrodon blomhoffi usuriensis. Максимальний ефект інгібування проявляє доза, що дорівнює 1/5 від загального об'єму проби. У цьому випадку ступінь АДФ-залежної агрегації становить 4%, що нижче контрольного показника у 14 разів.

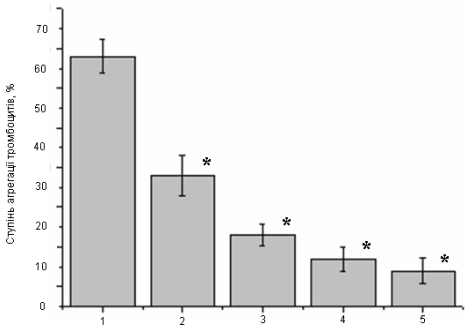


Рис. 2. АДФ-залежна агрегація тромбоцитів під дією фракції 3:
(1) контроль; та під дією фракції в кількості,
рівній 1/25 загального об'єму проби (2),
1/12 загального об'єму проби (3),
1/6 загального об'єму проби (4), 1/5 загального об'єму проби (5)
* – P ≤ 0,05 відносно контролю.

На Рис. 3. представлені дані інгібування агрегаційної активності тромбоцитів фракцією 2. Як видно, ступінь АДФ-залежної агрегації під впливом компоненту фракції склала 35%, в той час як для контрольного зразка цей показник дорівнює 52%.

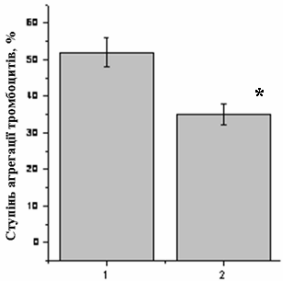


Рис.3. АДФ-залежна агрегація тромбоцитів під дією фракції 2:
(1) контроль; та під дією фракції в кількості, рівній 1/5 загального об'єму проби (2)

* – P ≤ 0,05 відносно контролю.

Висновки.

1. За допомогою методу агрегометрії виявлено компоненти отрути Agkistrodon blomhoffi usuriensis, які інгібують агрегацію тромбоцитів. Дані компоненти можуть бути перспективними для використання у медицині як антиагрегантні препарати.

1. Gould RJ, Polokoff MA, Friedman PA. Disintegrins: A family of integrin inhibitory proteins from viper venoms / Proc. Soc. Exp. Biol. Med. – V. 195. – P. 168 – 172.2. Hutton R. A., Warrell D. A. Action of snake venom components on the haemostatic system // Blood. – 1993. – V. 7, № 3. – P. 176 – 189. 3. Knudsen KA, Tuszynski GP, Huang TF, Niewiarowski S. Trigramin, an RGD-containing peptide from snake venom, inhibits cell-substratum adhesion of human melanoma cells // Exp. Sell Res. – 1988. – V. 179, №1. – P. 42 – 53.4. Marcinkiewicz C. Functional characteristic of snake venom disintegrins: potential therapeutic implication // Curr. Pharm. Des. – 2005. – V. 11,.№ 7. – P. 815 – 827.5. Markland F. S. Snake venoms and the hemostatic system // Toxicon. – 1998. – V. 36, № 12. – P. 1749 – 1800.6. Matsui T., Fujimura Y., Titani K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis // BBA. – 2000. – V. 1477. – P. 146 – 156. 7. Rucinski B. Niewiarowski S, Holt JC, Soszka T, Knudsen K. Batroxostatin, an Arg-Gly-Asp-containing peptide from Bothrops atrox, is a potent inhibitor of platelet aggregation and cell interaction with fibronectin // Biochim. Biophys. Acta. – 1990. – V. 1054, № 3. – P. 257 – 264. 8. Ruggeri Z. M. Old concepts and new developments in the study of platelet aggregation // J. Clin. Invest. – 2000. – V. 105, № 6. – P. 699 – 701. 9. Sozka T, Knudsen KA, Beviglia L, Rossi C, Poggi A, Niewiarowski S. Inhibition of murine melanoma cell-matrix adhesion and experimental metastasis by albolabrin, an RGD-containing peptide isolated from the venom of Trimeresurus albolabris // Exp. Sell Res. – 1991. – V. 196, №1. – P. 6 – 14.10. Trikha M., Nakada M. T. Platelets and cancer: implications for antiangiogenic therapy // Semin. Thromb. Hemost. – 2002. – V. 28, № 1. – P. 39 – 44.11. Tu A. T. Overview of snake venom chemistry //Adv. Exp. Med. Biol. – 1996. – V. 391, № 5. – P. 37 – 62.12. Valentin E., Lambeau G. Increasing molecular diversity of secreted phospholipases A(2) and their receptors and binding proteins // Biochim. Biophys. Acta. – 2000. – V. 1488, № 1-2. – P. 59 – 70.13. Verheij H. M., Boffa M. C., Rothen C., Bryckert M. C., Verger R., de Hass G. H. Correlation of enzymatic activity and anticoagulant properties of phospholipase A2 // Eur. J. Biochem. – 1980. – V. 112, № 1. – P. 25 – 32.14. White J. Snake venoms and coagulopathy // Toxicon. – 2005. – V. 45. – P. 951 – 967.

Надійшла до редколегії 12.12.11

УДК 575.23: 595.773.4

**С. Серга, асп., С. Демидов, д-р. біол. наук,
С. Крамаренко, канд. біол. наук, І. Козерецька, канд. біол. наук**

ЕНДОСИМБІОТИЧНІ БАКТЕРІЇ РОДУ *WOLBACHIA* ТА МУТАЦІЙНІ ПРОЦЕСИ У *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Wolbachia надзвичайно поширена бактерія в природних популяціях популярного модельного об'єкту Drosophila melanogaster. Проте причини такого поширення залишаються не розкритими. У наведеній роботі продемонстровано, що мутантні особини за геном mei-41(meiotic-41: 1-54.2) за впливу радіоактивного випромінювання у дозі 500 R виживають краще у випадку їх інфікованості ендосимбіотичною бактерією Wolbachia. Виживання мутантних особин може призводити до підвищення відсотка поліморфізмів в популяціях D. melanogaster.

The bacteria Wolbachia are extremely wide-spread in natural populations of the popular model species Drosophila melanogaster. Still, the reasons behind its ubiquitous presence remain unclear. In the present work, we demonstrate that fruit flies with a mutant mei-41(meiotic-41: 1-54.2) gene exposed to a 500 R radiation dose survive better if infected with the endosymbiotic Wolbachia. The survival of mutant individuals might lead to elevated rates of polymorphism in D. Melanogaster populations.

Вступ. Дослідження останніх років дозволили сформулювати нову теорію еволюції, яка базується на усвідомленні того факту, що окремий організм завжди співіснує з цілою низкою представників інших видів, що врешті решт і визначає його долю у кожний конкретний момент його існування [18]. Наші знання механізмів таких взаємодій іще вкрай обмежені, але сьогодні вже відомо, що, патогенні бактерії здатні активувати апоптоз для руйнування клітин організму-хазяїна та швидкого розповсюдження в його тканинах, або навпаки гальмувати цей процес для того, щоб залишатися у оточенні клітини якомога довше [19]. Саме останню стратегію використовують бактерії роду *Wolbachia* для мутуалістичного співіснування з деякими безхребетними. Так відомо, що вони гальмують апоптоз у харчуючих клітинах під час овогенезу оси *Asobara tabida* [14] та перешкоджають апоптозу у клітинах зародкового шляху і ембріонах нематод *Brugia malayi* та *Onchocerca volvulus*, для яких *Wolbachia* є облігатним симбіонтом [7]. Механізми впливу бактерії на запуск запрограмованої клітинної смерті залишаються невідомими. Проте описаний відповідний вплив *Wolbachia in vitro* на культурі клітин людини (PMNs – polymorphonuclear cells), який пов'язаний з інгібуванням апоптозу поверхневим білком бактерії WSP [5].

Wolbachia зустрічається у переважній більшості досліджених сьогодні природних популяцій *Drosophila melanogaster* [15], хоча причини такого явища все ще залишаються не з'ясованими [1; 6;12; 16].

Вплив *Wolbachia* на мутаційні процеси у виду-хазяїна раніше не досліджувався, хоча, як відомо, мутаційний процес є одним із факторів динаміки популяцій [4].

У наведеній роботі продемонстровано, що мутантні особини за геном *mei-41(meiotic-41:* 1-54.2) за впливу радіоактивного випромінювання у дозі 500 R виживають краще у випадку їх інфікованості ендосимбіотичною бактерією *Wolbachia*.

Матеріали та методи досліджень. *Лінії D. melanogaster та схрещування.*

У дослідженні було використано лінії *D. melanogaster,* які представлено у таблиці 1. Лінії утримували на стандартному середовищі (на 1 літр води 6 г агару, 15 г дріжджів, 50 г цукру, 55 г манної крупи).

© Серга С., Демидов С., Крамаренко С., Козерецька І., 2012

***Таблиця* 1. Залучені у дослідження лінії та їх інфекційний статус**

Назва лінії	Скорочена назва лінії	Інфекційний статус	Фенотип
Canton-S Новосибірськ*	*C-S* H	+	Дикий тип
mei-41	*mei-41*	+	Містить точкову мутацію у гені *meiotic-41* (1-54.2) C8924T (призводить до заміни у білку P2159L), а також декілька інших точкових мутацій, які присутні і у інших алелях даного гену, лінія чуттєва до опромінення
*Harwich**	*Hw*	+	Лінія з активним P-елементом
white cut	*w ct*	+	Генетично нестабільна лінія

* – лінія була надана з колекції лабораторії генетики популяцій Інституту цитології та генетики СВ РАН.

Після перевірки інфекційного статусу, інфіковані *Wolbachia* лінії, були перенесені на середовище з додаванням антибіотику тетрацикліну у концентрації 0,25 мг/мл. Тетрациклін є інактиватором малої субодиниці рибосом прокаріот та діє на низку мікроорганізмів, включаючи рікетсії, до яких належать бактерії роду *Wolbachia*. На середовищі з додаванням антибіотику лінії утримувались протягом двох поколінь, а після цього, ще два покоління на стандартному середовищі. Отримані лінії було перевірено на наявність *Wolbachia* методом ПЛР. Таким шляхом отримали вільні від бактерії лінії генотипово однакові з вихідними – *C-S* H (t), *w ct* (t), *mei 41* (t), *Hw* (t).

Після цього всі лінії, інфіковані *Wolbachia* та вільні від неї, було опромінено дозами 500 R та 1000 R на стадії яйця чи личинки (опромінення проводили за допомогою пристрою РУМ-17, Москва, 1983). Самці з усіх ліній опромінених та неопромінених схрещувались з самками лінії *C(1)DX* [17]. Дана лінія містить дві фізично зчеплені Х хромосоми, тому Х хромосома самця передається у наступному поколінні самцям, що дозволяє оцінити рівень летальних мутацій у Х хромосомі за співвідношенням статей у першому поколінні.

Діагностика наявності Wolbachia. Всі залучені у дослідження лінії було протестовано на наявність внутрішньоклітинного симбіонту *Wolbachia* методом ПЛР. Для виділення ДНК з кожної лінії брали по 10 особин. ДНК виділяли з використанням DNeasy Blood & Tissue Kit ("Qiagen", США). Наявність бактерії в препаратах ДНК визначали методом ПЛР з використанням праймерів, специфічних до висококонсервативного регіону гену *16S рРНК Wolbachia* довжиною 438 п. о. (5'-CAT ACC TAT TCG AAG GGA TAG, 5'-AGC TTC GAG TGA AAC CAA TTC). ПЛР проводили за наступною схемою: 3 хвилини при температурі 94°C, 30 циклів, що складаються з 30 с при 94°C, 45 с при 55°C, 60 с при 72°C, та 7 хвилин при 72°C. Реакція проводилась у суміші 20 мкл (2 мкл ДНК, 2 мкл 10 х ПЛР буфера (100 mM Tris-HCl (pH 8.8 на 25°C), 500 mM KCl, 0.8% (v/v) Nonidet P40), 2 мкл 25 mM $MgCl_2$, 2 мкл 2,5 mM dNTP ("Fermentas"), 2 мкл 20 mM праймерів, 0,25 Taq (5 u/мкл, "Fermentas"), 10 мкл дистильованої води), яка готувалася для всіх проб разом, а вже потім додавалась ДНК [11].

Статистична обробка результатів. Для виявлення впливу *Wolbachia* та дози опримінення на відсоток летальних мутацій у *D. melanogaster* було використано трьохфакторний дисперсійний аналіз. Всі розрахунки було проведено за загальноприйнятими методиками [2] з використанням пакету прикладних програм STATISTICA v. 5.5.

Результати дослідження та їх обговорення. Результати тестування залучених у дослідження ліній *D. melanogaster* на наявність бактерій роду *Wolbachia* показано у таблиці 1. Лінія *C(1)DX* виявилися вільною від бактерії, так як і всі лінії, які утримувались на середовищі з додаванням антибіотику тетрацикліну. У подальших дослідженнях використовувалися лише нащадки протестованих на наявність бактерії особин.

Дослідження було проведено у два етапи. На першому етапі опромінювались лінії *mei 41, mei 41* (t), *C-S* H, *C-S* H (t) у дозі 500R. Після цього самці першого покоління схрещувалися з самками лінії *C(1)DX* та підраховувалось співвідношення статей у нащадків. Результати представлено на Рис. 1.

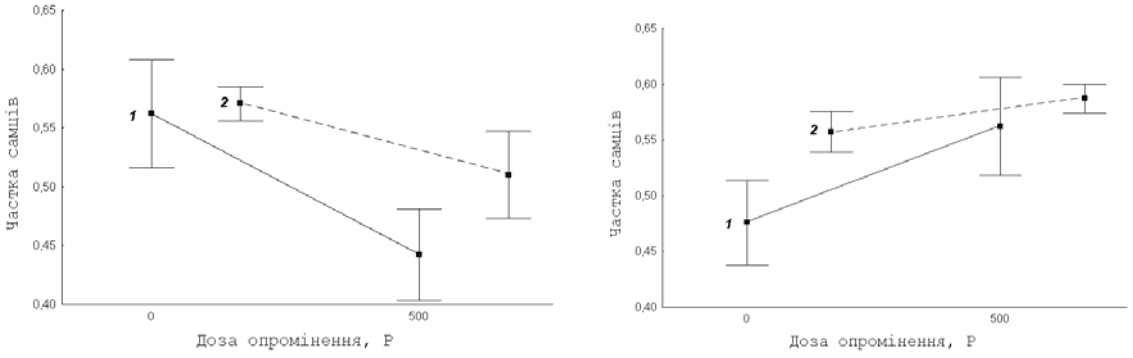


Рис. 1. Частка самців у потомстві схрещувань досліджуваних ліній з лінією *C(1)DX* у першому експерименті
(А – лінії без *Wolbachia*, Б – лінії з *Wolbachia*, 1- *mei 41*, 2 – *C-S H*)

Результати дисперсійного аналізу свідчать, що частка самців у схрещуваннях, отже і рівень летальних мутацій, залежить від сукупної дії факторів наявності бактерій роду *Wolbachia* та опромінення дозою 500 R (F = 8,43, p = 0,007). При цьому ця частка в схрещуванні лінії *C-S H* при опроміненні і без нього не відрізняється, тоді як при опроміненні лінії *mei-41* з *Wolbachia* вона зростає, а без бактерії – падає.

Особини лінії *mei-41* гомозиготні за алелем *mei-41^{D5}*, та характеризуються 50% фертильністю [8], чутливістю до рентгенівського опромінення, ультрафіолетового опромінення та хімічних мутагенів [8; 13]. Отриманий нами результат свідчить про те, що *Wolbachia* здатна впливати на чутливість лінії *mei-41* до досліджуваних доз рентгенівського опромінення. Ген *mei-41* кодує білок, який є контрольним у момент

вирішення необхідності переходу клітин до апоптозу за наявності порушень ДНК у імагінальних дисках личинок та нейробластах. Крім того, MEI-41 приймає участь у мейозі, де він контролює репарацію подвійних розривів під час кросинговеру, регулює проходження профази I, забезпечує затримку метафази I, яка відбувається наприкінці овогенезу [8]. Встановлений нами ефект інфікування *Wolbachia* на частоту мутування можна пояснити тим, що присутність *Wolbachia* безпосередньо знижує рівень мутацій у яйцеклітині чи клітинах зародкового шляху за рахунок поки ще не відомих механізмів. Одним з таких механізмів може бути активація індуктивних систем репарації у відповідь на наявність інфекції, як стресового чинника [3], і тоді можна припустити, що взаємодія відбувається на рівні компонентів системи відповіді на стрес. Іншою причиною описаного ефекту може бути підвищення бактерією виживання особин з генетичними порушеннями через гальмування апоптозу у ембріонах. Ефект впливу бактерії на запуск апоптозу описаний тільки для організмів, для яких *Wolbachia* є облігатним симбіонтом [7; 14]. Особини *D.* melanogaster можуть нормально існувати і у відсутності бактерії. Тому, можливо, *Wolbachia* є необхідною для виживання саме за дії певних чинників, одним з яких може бути радіоактивне випромінення. В свою чергу така залежність може призводити до розповсюдження та закріплення у популяції нових поліморфізмів. Механізми впливу бактерії на апоптоз можуть стосуватися двох аспектів: прямої дії білків бактерії на передачу сигналу запуску апотозу у клітині або непрямим шляхом через вплив на метаболізм клітини-хазяїна [7]. Перший шлях використовується близькою до *Wolbachia* бактерією *Anaplasma phagocytophilium*, яка секретує через специфічну систему типу IV білок Ats1, який знижує чутливість мітохондрій до апоптичного сигналу [10]. Відомо, що геном *Wolbachia* також містить як гени, які кодують компоненти специфічної системи типу IV (Type IV secretion system (T4SS)) [9], які є засобом введення патогенними мікроорганізмами своїх білків у клітину хазяїна, так і гени, продуктами яких є білки з анкіріновими повторами, що вважаються типово еукаріотичними регуляторними білками і дуже рідко зустрічаються у прокаріот. Проте функції даних білків *Wolbachia,* можливість їх взаємодії з білками клітини-хазяїна та можливість трансляції їх мРНК залишаються не дослідженими.

Для перевірки можливості безпосередньої взаємодії білків *Wolbachia* з білком MEI-41 було проаналізовано доменну структуру цього білка, а також проведено пошук білка з подібною функцією серед білків *Wolbachia.* Білок MEI-41 відносять до серин/треонін-протеїн кіназ, він містить два функціоналтні домени – UME домен (домен має серин/треонін кіназну активність) та PI3Kc домен (має фосфотрансферазну активність). Аналіз можливості взаємодії білка MEI-41 з білками *Wolbachia* на ресурсі STRING 9.0. (http://string-db.org) показав відсутність прямої взаємодії з будь-яким білком бактерії. Крім того, не було знайдено жодного білка *Wolbachia*, який би містив хоча б один з функціональних доменів білка MEI-41, що означає, що *Wolbachia* не містить білків, які б могли брати на себе функцію MEI-41 у випадку порушення його роботи. Все вищевикладене дозволяє зробити висновок, що взаємодія відбувається через компонент–посередник, або іншим шляхом.

Взаємодія бактерії з клітиною-хазяїном може відбуватися і через бактеріальні поверхневі білки. Саме такий механізм показаний у системі PMNs/ *Wolbachia* [5]. Білок WSP вольбахії здатен викликати імунну відповідь у нематод філярій шляхом взаємодії з TLR (toll-like receptors), з однієї сторони, а з іншої – агоністи TLR здатні затримувати апоптоз у PMNs. Таким чином, одним з основних кандидатів на роль білка, який затримує апоптоз і у *D. melanogaster* може бути саме білок WSP, присутність якого у культурі клітин людини призводить до затримки апоптозу [5]. Оскільки у вказаній роботі відповідний ефект був продемонстрований для WSP нематод, ми виконали порівняння послідовності даного білка, виділеного з *Wolbachia Brugia malayi* (номер в GenBank YP_198262.1)*,* та білка WSP *Wolbachia D. melanogaster* (номер в GenBank NP_966785.1) (Рис. 2.).

```
Drosophila      MHYKKFFSAAALATLLSLSNSAFSDPVGPISDEETSYYVRLQYNGEFLPLFTKVDGIT-- 58
Brugia          MHYKKFFSATALVMLLSLSNSAFSDPVGPIADEETSYYIRLQYNSEFSPLNTKVDGITGA 60
                *********:**. ****************:*******:*****.** ** *******

Drosophila      YKKDKSDYSPLKPSFIAGGGAFGYKMDDIRVDVEGVYSYLNKNDVKDVTFDPANTIADSV 118
Brugia          QKDSKDTNDLYKPSFMAGGSAFGYRMDDIRVDIEGLYSQLSKS---TLSRAPTPDIVDNL 117
                 *..*.  .  ****:***.****:*******:**:** *.*.    ::  *:  *.*.:

Drosophila      TAISGLVNVYYDIAIEDMPITPYIGVGVGAAYISTPLEP-AVNDQKSKFGFAGQVKAGVS 177
Brugia          TAISGLVNVYYDVVIEDIPITPYVGVGLGVAYISNPAKAQVIADQKHGFGFAYQAKAGIS 177
                ************:.***:*****:***:*.****.* :. .: ***  **** *.***:*

Drosophila      YDVTPEVKLYAGARYFGSYGANFDGKKTDPKNSTG---QAADAGAYKVLYSTVGAEAGVA 234
Brugia          YDVTPEIKLFAGARYFGSYGANFDKSEEVNKGTSEDKETKVTAGAYKVLYSTIGAEAGIA 237
                ******:**:*************** .:   *.::      . **********:*****:*

Drosophila      FNF 237
Brugia          FNF 240
                ***
```

Рис. 2. Результати порівняння послідовностей білків WSP *Wolbachia B. malayi* та *D. Melanogaster* (номера в GenBank YP_198262.1 та NP_966785.1 відповідно)

Порівняння послідовностей WSP білків показало суттєві відмінності між білками з *Wolbachia B. malayi* та *D. melanogaster.* Тому, з однієї сторони, така відмінність може свідчити і про не виконання таких функцій цим білком у дрозофіли, з іншої, цього виключити не можна.

На другому етапі експерименту було опромінено лінії *Hw* та *w ct*. Дисперсійний аналіз показав відсутність впливу як присутності бактерії, так і сумарної дії факторів присутності бактерії та опромінення на отриманий результат ($p>0,05$) (результати не приводяться). Лінія *mei-41* та лінії *w ct* та *Hw* характери-

зуються різною природою генетичної нестабільності. Причина відсутності впливу *Wolbachia* на рівень летальних мутацій у ліній *w ct* та *Hw* може бути обумовлена саме цим. Отриманий нами результат є першим кроком у розумінні особливостей впливу *Wolbachia* на такі важливі показники як мутаційні процеси та генетична різноманітність особин-хазяїв бактерії. При цьому в різних системах нестабільності вплив бактерії або виявляється, або відсутній, або незначний, що, можливо, пояснюється молекулярними механізмами впливу *Wolbachia* на мутаційні процеси у дрозофіли та може бути наслідком саме затримки апоптозу. Уточнення та детальне вивчення таких механізмів потребує подальших досліджень.

Wolbachia здатна знижувати рівень сцеплених зі статтю летальних мутацій у *D. melanogaster.* Проте такий ефект бактерії залежить від генотипу організму-хозяїна. Молекулярні механізми такого явища залишаються не визначеними та потребують подальших досліджень.

1. Илинский Ю.Ю., Захаров И.К. Эндосимбионт Wolbachia в Евразийских популяциях Drosophila melanogaster // Генетика. – 2007. – Т.43, №7. – С. 905-915. 2. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М., 1980. 3. Сорочинський Б.В. Цитоскелет та ефекти опромінення. – Київ, 2010. 4. Ayala J. F. Genetic differentiation during the speciation process // Evol. Biol. – 1975. – Vol. 8. – P. 1–78. 5. Bazzocchi C., Comazzi S., Santoni R., et al. Wolbachia surface protein (WSP) inhibits apoptosis in human neutrophils // Parasite Immunol. – 2007. – Vol. 29. – P. 73–79. 6. Fry A.J., Palmer M.R., Rand D.M. Variable fitness effects of Wolbachia infection in Drosophila melanogaster // Heredity. – 2004. – Vol. 93. – P.379–389. 7. Landmann F., Voronin D., Sullivan W., Taylor M.J. Anti-filarial activity of antibiotic therapy is due to extensive apoptosis after Wolbachia depletion from filarial nematodes // PLoS Pathog. – 2011. – Vol. 7, № 11. – doi: e1002351. doi:10.1371/journal.ppat.1002351.8.Laurencon A., Purdy A., Sekelsky J., Hawley R.S., Su T.T. Phenotypic analysis of separation-of-function alleles of MEI-41, Drosophila ATM/ATR // Genetics. – 2003. – Vol.164, №2. – P. 589–601. 9. Masui S., Sasaki T., Ishikawa. Genes for the type IV secretion system in an intracellular symbiont, Wolbachia, a causative agent of various sexual alterations in arthropods // J Bacteriol. – 2000. – V. 182, № 22. – P. 6529-6531. 10. Niu H., Kozjak-Pavlovic V., Rudel T., Rikihisa Y. Anaplasma phagocytophilum Ats-1 is imported into host cell mitochondria and interferes with apoptosis induction // PLoS Path. – 2010. – Vol. 6. – doi: e1000774. 11. O'Neill S. L., Giordano R., Colbert A.M.E., Karr T.L. Robertson H.M. 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1992. – Vol. 89. – 2699–2702.12.O'Neill S.L., Hoffmann A.A., Werren J.H. Influential passengers: inherited microorganisms and arthropod reproduction. – Oxford University Press, 1997. 13. Oliveri D.R., Harris P.V., Boyd J.B. X-ray sensitivity and single-strand DNA break repair in mutagen-sensitive mutants of Drosophila melanogaster // Mutat. Res. – 1990. – Vol. 235. – P. 25-31. 14. Pannebakker B. A., Loppin B., Coen P. H. Elemans C.P.H., et.al. Parasitic inhibition of cell death facilitates symbiosis // PNAS. – 2007. – Vol. 104, № 1. – P. 213–215.15.Riegler M., Sidhu M., Miller W.J., O'Neill S.L. Evidence for global Wolbachia replacement in Drosophila melanogaster // Current Biology. -2005. – V. 15. – P. 1428–1433.16.Starr D.J., Cline T.W. A host parasite interaction rescues Drosophila oogenesis defects // Nature. – 2002. – V. 418. № 6893. – P. 76-79.17.Woodruff R.C., Thompson J. N. A one-generation assay for induced genetic damage // Dros. Inf. Serv. – 1999. – Vol. 82. P.140-141.18.Zilber-Rosenberg I., Rosenberg E. Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution // FEMS Microbiol. Rev. – 2008. – V. 32. – P. 723–735. 19. Zychlinsky A., Sansonetti P. Apoptosis in bacterial pathogenesis //J. Clin.Invest. – 1997. – Vol.100. – P. 493–496.

Надійшла до редколегії 12.12.11

УДК 598.2

А. Турчик, асп., В. Серебряков, д-р біол. наук

НОВІ ДАНІ ПО ОРНІТОФАУНІ ТЕТІЇВСЬКОГО РАЙОНУ КИЇВСЬКОЇ ОБЛАСТІ

Avifauna of Tetiiv district of Kiev region (central Ukraine, natural forest-steppe zone) was studied, and 115 species of birds, 3 of them listed in the Red Book of Ukraine (Milvus migrans, Haliaeetus albicilla and Picus viridis), were found. 103 species are protected by the Bonn and the Bern Conventions.

Досліджено орнітофауну Тетіївського району Київської області (центральна Україна, лісостепова природна зона). Відмічено 115 видів птахів; з них 3 види, занесені до Червоної книги України (Milvus migrans, Haliaeetus albicilla та Picus viridis). 103 види охороняються Боннською та Бернською конвенціями.

Вступ. Тетіївський район розташований в південно-західній частині Київської області. Район межує з Вінницькою та Черкаською областями. Площа – 0,76 тис.кв.км (2,7 % від території області). Територія району розташована в межах плато Правобережжя України і займає в ньому найвищі місця – відроги Придніпровської височини, де відмітка відносно рівня моря становить 250-280 метрів, а найвища точка розміщена біля села Високе, де проходить водорозділ. По території району протікають 4 річки, довжиною більше 230 км (найбільша – р. Роська). Район лежить у межах лісостепової природної зони України. Більша частина території розорана, і являє собою переважно агроценози з лісопосадками, з незначними вкрапленнями лісів (дуб (*Quercus robur*), граб (*Carpinus betulus*)). У районі присутня значна кількість штучних водойм – каналів і ставків. За невеликих глибин, що не перевищують 1,5 м, ці водойми прогріваються до дна і посилено заростають (рогіз вузьколистий (*Typha angustifolia*), рдест пронизанолистий (*Potamogeton perfoliatus*), очерет звичайний (*Phragmites australis*)).

Орнітофауна Тетіївського району Київської області є недостатньо вивченою. Останні дослідження даної території було проведено в кінці 80-х рр. XX ст. [5]. Однак, авторами було досліджено лише водно-болотяні угіддя, відповідно подано дані лише по птахам водно-болотяних комплексів, що включають водоплавних і коловодних птахів. Деякі публікації [1,2] стосуються переважно орнітофауни сусідніх районів Черкаської області. Окремо пташине населення вивчали для наукового обґрунтування щодо розширення території ландшафтного заказника місцевого значення "Попів хутір", створеного 10.03.1994 р. на площі 17,0 га в околицях м.Тетіїв [10]. Незначна вивченість орнітофауни Тетіївського району пов'язана, перш за все, майже повною відсутністю на його території заповідних ділянок та наявністю значної кількості сільськогосподарських угідь.

Матеріали і методи

Спостереження за птахами району проводились у гніздовий період (квітень-червень) 2008-09 рр., а також у позагніздовий період (серпень-вересень) 2008-09 рр.

Під час обліків вздовж річок та каналів використовували маршрутний метод [9], на широких ділянках ставків, у районі річок – облік з однієї точки. На окремих територіях – тотальний облік з однієї точки [6]. Для визначення кількості та видового складу птахів було використано оптичні прилади – біноклі з 8Х та 10Х приближенням. Уточнене визначення і підрахунок проводили за допомогою цифрової фотозйомки з високою роздільною здатністю. У всіх місцях досліджень по можливості проводили пошук гнізд.

У роботі використано назви птахів згідно анотованого списку українських наукових назв птахів фауни України [11].

Запропонований список не є повним і в майбутньому може бути доповнений новими видами, а також відомостями щодо сучасного стану, поширення та чисельності багатьох видів птахів.

© Турчик А., Серебряков В., 2012

Результати

За час досліджень виявлено 115 видів птахів (табл. 1), що належать до 17 рядів: *Podicipediformes* – 1, *Pelecaniformes* – 1, *Ciconiiformes* – 7, *Anseriformes* – 5, *Falconiformes* – 7, *Galiformes* – 2, *Gruiformes* – 4, *Charadriiformes* – 10, *Columbiformes* – 3, *Cuculiformes* – 1, *Strigiformes* – 1, *Apodiformes* – 1, *Caprimulgiformes* – 1, *Upupiformes* – 1, *Coraciiformes* – 2, *Piciformes* – 5, *Passeriformes* – 63.

Для оцінки чисельності птахів використано критерії А.П. Кузякіна [4].

***Таблиця* 1. Орнітофауна Тетіївського району Київської області**

№	Вид	Ч	З	Р	БЕ	БО	№	Вид	Ч	З	Р	БЕ	БО
1	*Podiceps cristatus*			+	3		*59*	*Motacilla alba*	+			2	
2	*Phalacrocorax carbo*			+	3		*60*	*Motacilla flava*		+		2	
3	*Botaurus stellaris*		+		2	2	*61*	*Lanius collurio*	+			2	
4	*Ixobrychus minutus*			+	2	2	*62*	*Lanius minor*			+	2	
5	*Egretta alba*		+		2	2	*63*	*Bombycilla garrulus*			+	2	
6	*Egretta garzetta*			+	2		*64*	*Troglodytes troglodytes*			+	2	
7	*Ardea cinerea*	+			3		*65*	*Erithacus rubecula*		+		2	2
8	*Ardea purpurea*		+		2	2	*66*	*Luscinia luscinia*		+		2	2
9	*Ciconia ciconia*	+			2	2	*67*	*Phoenicurus ochruros*			+	2	2
10	*Cygnus olor*			+	3	1, 2	*68*	*P. phoenicurus*		+		2	2
11	*Anas platyrhynchos*		+		3	1, 2	*69*	*Saxicola rubetra*		+		2	2
12	*Anas querquedula*		+		3	1, 2	*70*	*Saxicola torquata*		+		2	2
13	*Aythya ferina*			+	3	1, 2	*71*	*Oenanthe oenanthe*			+	2	2
14	*Aythya fuligula*			+	3	1, 2	*72*	*Turdus merula*		+		3	2
15	***Milvus migrans***			+	2	1, 2	*73*	*Turdus pilaris*		+		3	2
16	***Haliaeetus albicilla***			+	2	1, 2	*74*	*Turdus philomelos*	+			3	2
17	*Accipiter gentilis*		+		2	1, 2	*75*	*Locustella fluviatilis*		+		2	
18	*Accipiter nisus*		+		2	1, 2	*76*	*A. schoenobaenus*		+		2	
19	*Buteo buteo*		+		2	1, 2	*77*	*A. scirpaceus*		+		2	
20	*Circus aeruginosus*		+		2	1, 2	*78*	*A. arundinaceus*	+			2	
21	*Falco tinnunculus*			+	2	2	*79*	*Hippolais icterina*		+		2	
22	*Perdix perdix*			+	3		*80*	*Sylvia nisoria*			+	2	
23	*Coturnix coturnix*		+		3	2	*81*	*Sylvia borin*			+	2	
24	*Porzana porzana*			+	2	2	*82*	*Sylvia atricapilla*	+			2	
25	*Rallus aquaticus*		+		3		*83*	*Sylvia communis*		+		2	
26	*Gallinula chloropus*		+		3		*84*	*Phylloscopus trochilus*			+	2	
27	*Fulica atra*	+			3	2	*85*	*Phylloscopus collybita*		+		2	
28	*Charadrius dubius*			+	2	2	*86*	*Phylloscopus sibilatrix*	+			2	
29	*Vanellus vanellus*			+	3	2	*87*	*Muscicapa striata*		+		2	2
30	*Tringa ochropus*			+	2	1, 2	*88*	*Ficedula hypoleuca*		+		2	2
31	*Tringa totanus*			+	3	1, 2	*89*	*Ficedula albicollis*		+		2	2
32	*Actitis hypoleucos*			+	2	1, 2	*90*	*Aegithalos caudatus*			+	3	
33	*Larus canus*			+			*91*	*Remiz pendulinus*			+	2	
34	*Larus cachinnans*		+				*92*	*Parus palustris*		+		2	
35	*Larus ridibundus*	+					*93*	*Parus major*	+			2	
36	*Chlidonias niger*		+		2	2	*94*	*Parus caeruleus*		+		2	
37	*Sterna hirundo*	+			2	2	*95*	*Sitta europaea*		+		2	
38	*Columba palumbus*		+				*96*	*Certhia familiaris*		+		2	
39	*Streptopelia turtur*		+		3		*97*	*Emberiza calandra*		+		3	
40	*Streptopelia decaocto*			+	3		*98*	*Emberiza citrinella*	+			2	
41	*Cuculus canorus*		+		3		*99*	*Emberiza schoeniclus*		+		2	
42	*Strix aluco*			+	2		*100*	*Fringilla coelebs*	+			3	
43	*Caprimulgus europaeus*			+	2		*101*	*Chloris chloris*	+			2	
44	*Apus apus*	+			3		*102*	*Spinus spinus*			+	2	
45	*Alcedo atthis*			+	2		*103*	*Carduelis carduelis*		+		2	
46	*Merops apiaster*	+			2	2	*104*	*Acanthis cannabina*		+		2	
47	*Upupa epops*		+		2		*105*	*C. coccothraustes*		+		2	
48	*Jynx torquilla*		+		2		*106*	*Passer domesticus*	+				
49	***Picus viridis***			+	2		*107*	*Passer montanus*	+				
50	*Picus canus*			+	2		*108*	*Sturnus vulgaris*	+			3	
51	*Dendrocopos major*	+			2		*109*	*Oriolus oriolus*		+		2	
52	*Dendrocopos syriacus*	+			2		*110*	*Garrulus glandarius*		+			
53	*Galerida cristata*	+			3		*111*	*Pica pica*		+			
54	*Alauda arvensis*	+					*112*	*Corvus monedula*			+		
55	*Riparia riparia*		+		2		*113*	*Corvus frugilegus*		+			
56	*Hirundo rustica*	+			2		*114*	*Corvus cornix*		+			
57	*Delichon urbica*	+ +			2		*115*	*Corvus corax*			+	3	
58	*Anthus trivialis Motacilla flava*		+		2								

Умовні позначки до таблиці:

Ч – чисельний; З – звичайний; Р – рідкісний, або такий, що зустрічався не більше двох-трьох разів (за період спостережень); БЕ – вид занесено до 2 або 3 додатку Бернської конвенції; БО – вид занесено до 1,2, або до двох одночасно додатків Боннської конвенції; Види, що занесені до Червоної книги України, у списку виділені жирним шрифтом.

Отже, із 115 відмічених видів 103 та 41 вид, охороняються Бернською та Бонською конвенціями відповідно, положення яких ратифіковано Україною в 1999 році [7].

З видів, що занесені до Червоної книги України [12], тут виявлені шуліка чорний (*Milvus migrans*), орлан-білохвіст (*Haliaeetus albicilla*) та жовна зелена (*Picus viridis*). По літературним даним [8], для вищезгаданого ландшафтного заказника місцевого значення "Попів хутір" відмічено червонокнижного степового канюка (*Buteo rufinus*), але за період досліджень, цей вид не спостерігали. Канюк степовий характерний для Київщини, однак найчастіше відмічався значно північніше Тетіївського району [3,12].

В цілому, орнітофауна району представлена звичайними видами, характерними для лісостепової природної зони України.

Через інтенсивну меліорацію в районі залишається все менше природних водойм, а мережа штучних постійно зростає. Водосховища, риборозплідні ставки, вторинно заболочені торфяні кар'єри густою мережею вкривають територію району і слугують місцемешканнями, які приваблюють більш значні скупчення низки колоніально гніздуючих видів навколоводних та водоплавних птахів, ніж вцілілі плями природних водно-болотяних угідь, де зазвичай птахи розміщуються диффузно. З водно-болотяних птахів домінантом на більшості точок спостереження є сіра чапля (*Ardea cinerea*), невелика колонія якої (до 20 пар) відмічена біля с.Високе. Для мартина жовтоногого (*Larus cachinnans*) та крячка річкового (*Sterna hirundo*) відмічені дві змішані колонії – на ставках с.П'ятигори та с.Бурківці (до 35 та 60 пар відповідно). Колонії відмічали для цих місць і раніше [5]. Також чисельними є крижень (*Anas platyrhynchos*), лиска (*Fulica atra*), місцями чепура велика (*Egretta alba*). В заростях навколо водойм відмічено значну чисельність очеретянки великої (*Acrocephalus arundinaceus*) та ставкової (*Acrocephalus scirpaceus*).

Для відкритих територій району та ділянок, що зайняті агроценозами чисельними та звичайними видами є перепілка (*Coturnix coturnix*), лелека білий (*Ciconia ciconia*), посмітюха (*Galerida cristata*), жайворонок польовий (*Alauda arvensis*), сорокопуд терновий (*Lanius collurio*), вівсянка звичайна (*Emberiza citrinella*), горобець польовий (*Passer montanus*). З хижих птахів поширеними є канюк звичайний (*Buteo buteo*) та лунь очеретяний (*Circus aeruginosus*).

Для нечисленних лісових масивів району характерними та фоновими видами є зозуля (*Cuculus canorus*), припутень (*Columba palumbus*), вивільга (*Oriolus oriolus*), кропив'янки чорноголова (*Sylvia atricapilla*) та сіра (*Sylvia communis*), мухоловки сіра (*Muscicapa striata*), білошия (*Ficedula albicollis*), дрізд чорний (*Turdus merula*), вільшанка (*Erithacus rubecula*). З хижих птахів звичайними є яструби малий (*Accipiter nisus*) та великий (*Accipiter gentilis*). Неодноразово відмічали сову сіру (*Strix aluco*).

Висновки

Орнітофауна Тетіївського району Київської області (центральна Україна, лісостепова природна зона) є недостатньо вивченою. Спостереження за птахами району проводились у 2008-09 рр. Відмічено 115 видів птахів; з них 3 види, занесені до Червоної книги України (*Milvus migrans*, *Haliaeetus albicilla* та *Picus viridis*). 103 види охороняються Боннською та Бернською конвенціями. Основні біотопи в районі – агроценози з лісопосадками, тому більшість видів представляють ряд *Passeriformes*. Домінантами є зяблик (*Fringilla coelebs)*, сорокопуд терновий (*Lanius collurio*), вівсянка звичайна (*Emberiza citrinella*) та дрізд співочий (*Turdus philomelos*).

1. Гаврилюк М.Н. О редких гнездящихся воробьиных птицах Черкасщины // Беркут. – 2004. – Т.13, вып.1. – С. 18-22. 2. Гаврилюк М.Н., Грищенко В.М., Яблоновська-Грищенко Є.Д. Нові дані про рідкісних та маловивчених птахів Центральної України // Беркут. – 2005. – Т.14, вип.1. – С. 28-37. 3. Лопарев С.А. О гнездовании степного канюка возле Киева // Беркут. – 1998а. –Т.7, вып. 1-2. – С.135. 4. Кузякин А.П. Зоогеография СССР // Ученые записки МОПИ им. Н.К. Крупской. Биогеография. – 1962. – Т. 109. – С. 3-182. 5. Мельничук В.А., Грищенко В.В., Кучерявая Л.Ф., Лопарев С.А., Микитюк А.Ю., Серебряков В.В., Сорокун Г.Н., Фесенко Г.В. Водно-болотные угодья Киевской области как места концентрации зимующих и колониально гнездящихся птиц. – К.: АН УССР и-тут зоол. им. И.И. Шмальгаузена, 1988. – 41 с. 6. Новикова Л.М., Карякин И.В. Методическое руководство по сбору полевых данных, их вводу в базы данных, предварительной камеральной обработке и выводу материалов для отчетов и Летописи природы. – Н.Новгород, 2008. – 116 с. 7. Парникоза И.Ю., Годлевская Е.В., Шевченко М.С., Иноземцева Д.Н. Фауна України: охранные категории / под ред. Загороднюка И.В. – К.: Киевский эколого-культурный центр, 2005. – 60 с. 8. Парнікоза І., Василюк О., Іноземцева Д., Костюшин В., Мішта А., Некрасова О., Балашов І. Степи Київської області. Сучасний стан та проблеми збереження. Серія: Збережемо українські степи. – К.: НЕЦУ, 2009. – 160 с. 9. Равкин Е.С., Челинцев Н.Г. Методические рекомендации по комплексному маршрутному учету птиц. – М.: ВНИИ охраны природы и заповедного дела Госкомприроды СССР, 1990. – 33 с. 10. Рішення Київської обласної ради від 02 квітня 2009 р. №447-24-V "Про погодження розширення ландшафтного заказника місцевого значення "Попів хутір". 11. Фесенко Г.В., Бокотей А.А. Анотований список українських наукових назв птахів фауни України (друге видання). – Київ-Львів, 2002. – 44 с. 12. Червона книга України. Тваринний світ / за ред. Акімова І. А. – К.: Глобалконсалтинг, 2009. – 600 с.

Надійшла до редколегії 19.12.11

УДК 612.82/.83; 612.821

А. Охрей, студ., Т. Куценко, канд. біол. наук,
М. Макарчук, д-р біол. наук

МІЖПІВКУЛЬНА ВЗАЄМОДІЯ ГОЛОВНОГО МОЗКУ У МУЗИКАНТІВ І НЕМУЗИКАНТІВ ПРИ СПРИЙНЯТТІ ЗВУКОВИХ СТИМУЛІВ І ТЕСТУВАННІ ОПЕРАТИВНОЇ ПАМ'ЯТІ

У немузикантів латентні періоди компонентів N2, P3, N3 слухових когнітивних викликаних потенціалів у правій півкулі були коротшими, ніж у лівій. Немузиканти здійснювали вірні відповіді на 2,5,6,7 стимулів при тестуванні оперативної пам'яті на літери правою рукою швидше, ніж лівою. У музикантів міжпівкульних відмінностей як за латентностями компонентів викликаних потенціалів, так і показників оперативної пам'яті, не виявлено.

The latencies of N2, P3, N3 components of cognitive event-related potentials were shorter in a right hemisphere of non-musicians, than in the left one. Non-musicians demonstrated faster reactions of their right hand, than of the left one during verbal working memory testing (answers to 2,5,6,7 stimuli). Musicians demonstrated no hemispherical difference regarding latencies of cognitive event-related potentials components and indexes of working memory.

Вступ. Доведено, що функціональна асиметрія півкуль головного мозку людини є динамічним явищем, яке змінюється на різних стадіях здійснення нервово-психічних функцій, а також у процесі навчання [2]. У цьому контексті досить помітний інтерес викликає вивчення психічних функцій і міжпівкульних взаємодій в індивідів, які опанували певні специфічні навички і використовують їх в повсякденному житті [4]. Останнім часом предметом багатьох наукових праць є дослідження впливу музичної діяльності на функціональні

© Охрей А., Куценко Т., Макарчук М., 2012

можливості та пластичність головного мозку людини. Відомо, що тривалі і регулярні заняття музикою ведуть до структурно-функціональної перебудови головного мозку людини [3, 7], впливають на особливості взаємодії між півкулями [4, 2], когнітивну сферу індивідів [3]. Проте питання, які стосуються деталей сприйняття та обробки музичної інформації [6], а також особливостей впливу музичної діяльності на різні когнітивні процеси [3, 9] та міжпівкульну кооперацію [4], на сьогодні є вивченими недостатньо.

Метою роботи була оцінка специфіки міжпівкульної взаємодії головного мозку та дослідження функціонування оперативної пам'яті у музикантів та немузикантів.

Об'єкт та методи досліджень. У дослідженні як обстежувані взяли участь 17 студентів обох статей віком від 17 до 21 року. Усі обстежувані були праворукими і не мали неврологічних порушень. Основним критерієм вибору обстежуваних була або повна відсутність у них музичної освіти (контрольна група; n=10), або ж наявність музичного досвіду з регулярними заняттями музикою (група музикантів; n=7).

Процедура обстеження включала в себе реєстрацію когнітивних викликаних потенціалів (КВП) в обстежуваних та проходження ними комп'ютерного тесту з оцінки рівня розвитку оперативної пам'яті.

Для реєстрації КВП використовувався електроенцефалограф "Нейрон-Спектр 4/ВП" (Нейрософт, Росія). Обстежувані отримували інструкцію рахувати кількість значимих стимулів (високий тон з частотою 2000 Гц), що пред'являлися з вірогідністю 20%, ігноруючи незначимі стимули (низький тон з частотою 1000 Гц) з вірогідністю 80% [1]. Використовували монополярні відведення C3 та C4, референтні електроди встановлювали на мочках іпсилатеральних вух [1]. Реєстрували латентні періоди (ЛП) піків й амплітуди всіх компонентів КВП.

З метою оцінки розвитку оперативної пам'яті використано авторську комп'ютерну програму [5]. Обстежувані послідовно проходили 3 субтести. У субтесті 1 оцінювалася оперативна пам'ять на літери. Обстежуваному пред'являлася певна множина приголосних, кількість яких у цій множині послідовно зростала від 2 до 7. Час експозиції кожної множини літер становив 1,5 с, після чого вони зникали, а через 1 с з'являлася тестова літера, стосовно якої потрібно було відповісти, чи була вказана літера в попередній множині, для чого потрібно було натиснути правою рукою клавішу "/", чи її там не було – лівою рукою необхідно було натиснути клавішу "z". Інші субтести були організовані за аналогічною схемою (у субтесті 2 оцінювалася оперативна пам'ять на цифри, у субтесті 3 – на геометричні фігури). Реєстрували ЛП реакцій кожної руки та кількість помилок у субтестах.

Статистичний аналіз проводили за допомогою пакету "STATISTICA" ("StatSoft", США). Нормальність розподілів вибірок перевіряли за тестом Шапіро-Вілка. У випадку нормального розподілу застосовували середнє значення (M), стандартну помилку (SE), стандартне відхилення (SD), порівняння незалежних та залежних даних здійснювали за допомогою критерію Стьюдента. Якщо ж розподіл даних виявлявся ненормальним, застосовували медіану (Me), верхній і нижній квартилі. Для порівняння залежних даних використовували критерій Вілкоксона, незалежних – критерій Мана-Вітні. Критичний рівень значущості при перевірці статистичних гіпотез приймався рівним p=0.05.

Результати та їх обговорення. Застосування методики реєстрації КВП дозволило виявити значущу міжгрупову відмінність ЛП компонента P3 в обстежуваних.

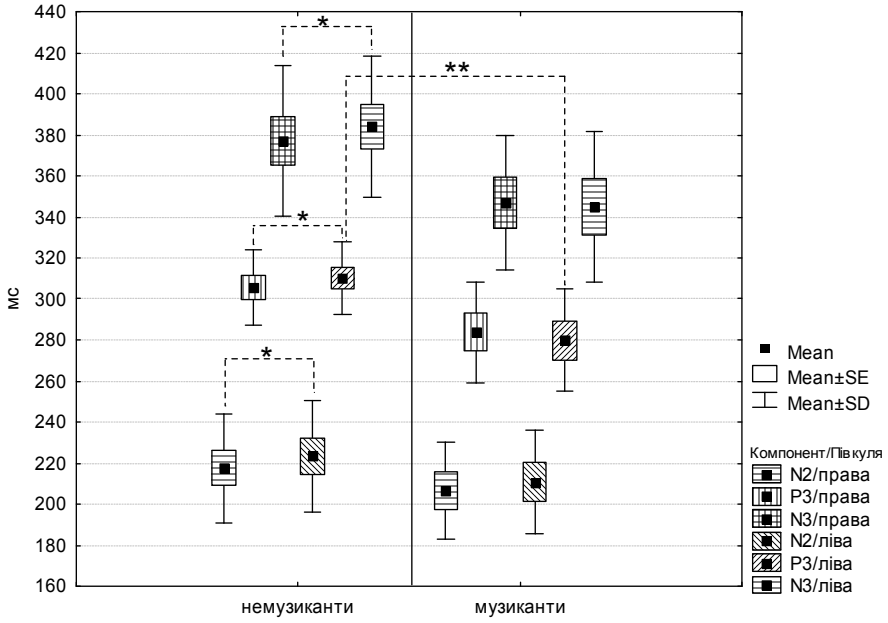


Рис. 1. Латентні періоди когнітивних компонентів ВП у правій і лівій півкулі немузикантів та музикантів. "*" – p ≤ 0.05, "" – p ≤ 0.01**

Зокрема нами було встановлено, що у музикантів відповіді у лівій півкулі мали менші ЛП максимумів (M = 279.9 мс, SD = ±24.82 мс) порівняно з відповідними значеннями представників контрольної групи (M = 310.2 мс, SD = ±17.53 мс) (рис. 1).

Статистичний аналіз, проведений окремо у межах двох груп, показав, що у музикантів відсутня значуща різниця ЛП компонентів N2, P3, N3 у правій і лівій півкулі. У той же час у немузикантів спостерігалась асиметрія – ці компоненти ВП у лівій півкулі з'являлися пізніше, ніж у правій (див. рис. 1).

При порівнянні амплітуд компонентів ВП у лівій і правій півкулях у межах груп було виявлено, що амплітуда компонента P3 у немузикантів у лівій півкулі була

вищою (M = 13.1 мкВ, SD = ±6.31 мкВ), ніж у правій (M = 10.5 мкВ, SD = ±5.21 мкВ).

Міжпівкульних відмінностей щодо ЛП піків та амплітуд компонентів ВП, що виникали після пред'явлення незначимого стимулу, між групами і в межах груп не виявлялося.

Статистичний аналіз результатів комп'ютерних тестів з оцінки рівня розвитку оперативної пам'яті виявив, що немузиканти на пред'явлення серій з 2,5,6,7 літер давали вірні відповіді правою рукою швидше, ніж лівою (субтест "Літери"). У той же час, у групі музикантів нами не було виявлено значущих відмінностей ЛП вірних реакцій обох рук у цьому субтесті (рис. 2).

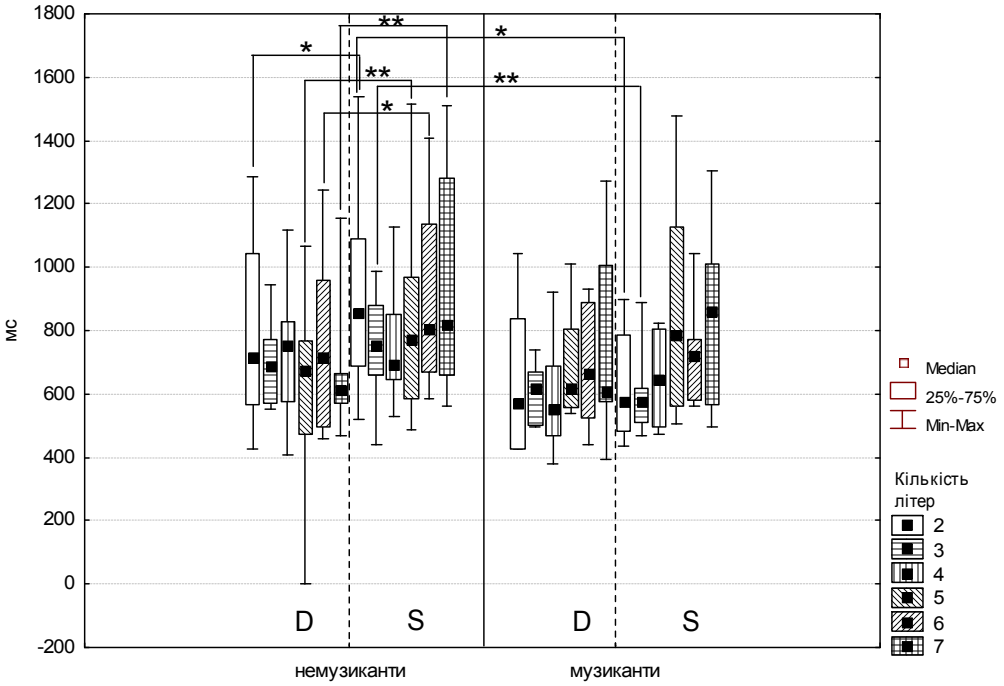


Рис. 2. Латентні періоди вірних реакцій правою (D) і лівою (S) рукою в немузикантів та музикантів. "*" – p ≤ 0.05, "" – p ≤ 0.01**

За результатами виконання інших субтестів ("Цифри" і "Геометричні фігури") нами не було виявлено ні між групових, ні внутрішньогрупових значущих відмінностей.

Крім того, за кількістю помилок, допущених у процесі виконання усіх комп'ютерних субтестів, також не виявлено відмінностей між музикантами і немузикантами, що, ймовірно, вказує на однакову ефективність функціонування оперативної пам'яті в обстежуваних обох груп.

Таким чином, результати статистичного аналізу ЛП та амплітуди КВП дають підстави стверджувати, що у музикантів, порівняно з немузикантами, ліва півкуля швидше залучається до аналізу стимулу і до прийняття рішення, свідченням чого є менша величина ЛП компоненту P3. Беручи до уваги відсутність міжпівкульної різниці латентних періодів компонентів N2, P3, N3 у музикантів, можна констатувати, що мозок у представників даної групи демонструє більш симетричну роботу в процесі сприйняття й обробки музичних стимулів. Ці результати узгоджуються з даними інших авторів [2, 4]. У групі немузикантів виявлялася асиметрія: когнітивні компоненти N2, P3, N3 у лівій півкулі з'являлися пізніше. До того ж, встановлено, що амплітуда P3 у лівій півкулі представників контрольної групи була вищою порівняно з такою в правій. Можливо, це пояснюється меншою тренованістю цієї гемісфери у немузикантів до обробки висоти тонових сигналів і необхідністю сильнішого залучення ресурсів уваги та оперативної пам'яті [8].

Важливо відмітити, що показники ЛП сенсомоторних реакцій, отриманих під час проходження тесту з оцінки розвитку оперативної пам'яті на літери, також вказують на певний ступінь функціональної асиметрії головного мозку у немузикантів за таких умов, оскільки відповіді правої руки у них виявлялися швидшими, ніж лівої. У той же час ЛП реакцій правої і лівої рук музикантів значуще не відрізнялися між собою. Можливо, це пояснюється тим, що вербальна інформація, яка аналізується у лівій півкулі, і відповідне прийняте рішення передається до правої півкулі у музикантів швидше, що обумовлено кращою міжпівкульною взаємодією у представників цієї групи в результаті тривалих тренувань.

Висновки. У немузикантів латентні періоди компонентів N2, P3, N3 слухових когнітивних викликаних потенціалів у правій півкулі коротші, ніж у лівій. При тестуванні оперативної пам'яті на літери немузиканти здійснювали вірні відповіді на пред'явлені серії з 2,5,6,7 стимулів правою рукою швидше, ніж лівою. У музикантів відсутні міжпівкульні відмінності як за латентностями компонентів викликаних потенціалів, так і показників оперативної пам'яті. Виявлені відмінності у немузикантів і музикантів можуть бути пов'язані з тривалими і регулярними заняттями музикою, яких зазнають останні в повсякденному житті. Результатом цих занять стає посилена міжпівкульна взаємодія.

1. Гнездицкий В. В. Вызванные потенциалы мозга в клинической практике// Эндогенные ВП. – Таганрог, 1997. 2. Костандов Э. А. Фактор динамичности в функциональной асимметрии больших полушарий головного мозга// Физиология человека – 1992. – Том 18, № 3. – С. 17-24. 3. Панюшева Т.Д. Музыкальный мозг: обзор отечественных и зарубежных исследований// Асимметрия. – 2008. – Том 2, № 2. – С.41-54. 4. Панюшева Т.Д. Межполушарная организация слуховых и двигательных функций у музыкантов: Автореф. дис. канд. псих. наук. – М., 2010. 5. Філімонова Н.Б., Куценко Т.В, Макарчук М.Ю. Особливості обробки зорової вербальної та невербальної інформації в оперативній пам'яті людини// Фізика живого. – 2006. – Том 14, №3. – С. 75-86. 6. Altenmüller E. Music in your head// Scientific American mind. – 2003. – Vol. 14, №1. – P. 24-31. 7. Hyde K., Lerch J., Norton A. et al. Musical training shapes

structural brain development // Neuroscience. – 2009. – Vol. 29, № 10. – P. 3019–3025. 8. Polich J., Kok A. Cognitive and biological determinants of P300: an integrative review// Biological Psychology. – 1995. – № 41. – P. 103-108. 9. Tierney A., Bergeson T., Pisoni D. General intelligence and modality-specific differences in performance: a response to Schellenberg (2008) // Empirical Musicology Review. – 2009. – Vol. 4, № 1. – P. 37-39.

Надійшла до редколегії 14.12.11

УДК 577.112.3:616.33-006.6

М. Тимошенко, асп., Л. Гайда, канд. біол. наук,
О. Кравченко, канд. біол. наук, Л. Остапченко, д-р біол. наук

ВМІСТ РІЗНИХ ФОРМ ГЛУТАТІОНУ ТА АКТИВНІСТЬ ГЛУТАТІОНРЕДУКТАЗИ В КЛІТИНАХ СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ ШЛУНКА ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ГАСТРОКАНЦЕРОГЕНЕЗУ

Досліджено вміст відновленої та окисленої форм глутатіону та активність глутатіонредуктази в загальній фракції клітин слизової оболонки шлунка в динаміці експериментального гастроканцерогенезу. Через 4 та 6 тижнів розвитку раку шлунка рівень відновленого глутатіону зростав, зниження його вмісту відбувалось через 8, 12, 18 та 24 тижня. Активність глутатіонредуктази та вміст її специфічного субстрату – окисленого глутатіону був підвищений на 8 та 12 тижні гастроканцерогенезу. Отримані дані можуть свідчити про зміни у функціонуванні глутатіонової системи в клітинах слизової оболонки шлунка за умов експериментального гастроканцерогенезу.

Content of reduced and oxidized glutathione and activity of glutathione reductase were analyzed in general fraction of gastric mucosa cells in dynamics of experimental gastric carcinogenesis. Our findings suggest that functioning of glutathione antioxidant system is disturbed. The level of glutathione grew on 4 and 6 weeks of gastric cancer development. The glutathione level decreased on 8, 12, 18 and 24 weeks of the experiment. The activity of glutathione reductase increased on 8, 12, 18 and 24 weeks. Concentration of oxidized glutathione was enlarged in comparison whit control on 8 and 12 weeks.

Вступ. Розвиток злоякісної трансформації, зокрема раку шлунка, нерозривно пов'язаний з порушеннями в системі антиоксидантного захисту [1]. Важливе значення в забезпеченні антиоксидантного захисту належить відновленому глутатіону, який бере участь в модуляції редокс-залежної сигналізації, регуляції проліферації, апоптозу та диференціювання клітин [2]. Широкого розповсюдження набула думка про важливу роль системи глутатіону в регуляції клітинного циклу, контролі ділення та передачі сигналів, що запускають проліферацію [3].

В клітині відновлений глутатіон присутній у високій концентрації (1-10мМ) і є головним низькомолекулярним тіолом, на долю якого припадає 90-95% від загальної кількості цих сполук [3]. За фізіологічних умов високий внутрішньоклітинний вміст відновленого глутатіону, окрім його синтезу de novo, забезпечується регенерацією окисленого глутатіону під дією глутатіонредуктази, відтак, в нормі вміст окисленого глутатіону дуже низький (<1% від загального вмісту).

Глутатіонредуктаза (КФ 1.6.4.2) каталізує відновлення окисленої дисульфідної форми глутатіону (GSSG) у відновлену сульфгідрильну (GSH) за рахунок НАДФН+$Н^+$, який є донором протонів. Така регенерація глутатіону зменшує необхідність синтезу його de novo. Глутатіонредуктаза (ГР) в основному локалізована в цитозолі, але міститься і в мітохондріях, ядрах та мікросомах. Основна біологічна роль ферменту полягає в підтриманні високого рівня GSH та низького GSSG і, відповідно, високого співвідношення GSH/GSSG. Окислення GSH в GSSG відбувається при відновленні пероксидів в реакціях за участі глутатіонпероксидази та глутатіонтрансферази, дисульфідів за участі тіолтрансферази, тіолпротеїндисульфідоксидоредуктази, глутатіонтрансферази та глутаредоксину, дегідроаскорбату дегідроаскорбатредуктазою, рибонуклеозиддифосфатів глутаредоксином [3].

На сьогодні відомо, що концентрація відновленого глутатіону збільшена при діленні клітин та в пухлинах [2,3]. Показано, що у людей активність ГР зростає в пухлинах шлунка. Також підвищення активності даного ензиму відмічене і в пухлинах іншої локалізації, проте ці дані є суперечливими [3].

Однак дані щодо особливостей окисно-відновної рівноваги в тканинах, в яких розвивається патологічний процес відсутні.

Для оцінки загального стану антиоксидантної системи клітин слизової оболонки шлунка за умов експериментального гастроканцерогенезу визначали вміст відновленого та окисленого глутатіону, а також активність глутатіонредуктази – ферменту, що забезпечує відновну регенерацію GSSG в GSH.

Об'єкт та методи досліджень. Досліди проводились на білих нелінійних щурах-самцях з початковою масою 100±20г. Модель гастроканцерогенезу ініціювали протягом 10-ти тижнів заміною питної води на 0,01% розчин специфічного канцерогену N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідину (МННГ) з одночасним переведенням тварин на корм, збагачений хлоридом натрію (5% NaCl від сухої маси). По закінченню 10 тижня тварини утримувались на стандартному раціоні віварію до кінця 24 тижня [4]. Забір дослідного матеріалу проводили на різних етапах моделі, а саме, по закінченню 4, 6, 8, 10, 12, 18 та 24 тижня. Контрольна група утримувалась на стандартному раціоні. Розвиток патології діагностували візуально та гістологічно.

Загальну фракцію клітин слизової оболонки шлунка виділяли за методикою, яка заснована на ферментативному відщепленні клітин з використанням пронази [5,6]. Для отримання супернатанту гомогенат клітини центрифугували 20000g 15хв при +4°С. Вміст відновленого та окисленого глутатіону визначали спектрофлюориметричним методом в середовищах з різними значеннями рН з використанням ортофталевого альдегіду та N-етилмалеіміду, який попереджає перехід GSH в GSSG. В результаті взаємодії ортофталевого альдегіду з глутатіоном утворюються високофлюоресцентні продукти, які збуджуються при λ=350нм, і мають чітко виражений пік при λ=420нм [7]. Активність глутатіонредуктази визначали спектрофотометрично по зменшенню оптичної густини в результаті окиснення НАДФН+$Н^+$ при довжині хвилі 340нм [8]. Концентрацію білка визначали за методом Бредфорд [9]. Вимірювання проводили на спектрофлюориметрі RF-510 (Shimadzu) та спектрофотометрі Ultrospec 1100 pro (Amersham Biosciences).

Результати та їх обговорення. Оскільки глутатіон приймає участь в регуляції різноманітних клітинних процесів, в тому числі і клітинної диференціації, проліферації та апоптозу, порушення його гомеостазу обумовлює виникнення та прогресію численних хвороб людини, включаючи рак. Поруч з цим, через плейотропні ефекти глутатіону на функції клітини достатньо важ-

© Тимошенко М., Гайда Л., Кравченко О., Остапченко Л., 2012

ко визначити його роль в ініціації та/або прогресії хвороби. Рівень GSH, швидкість його обміну та/або стан окиснення можуть бути порушені успадкованими або набутими дефектами ензимів, транспортерів, сигнальних молекул або транскрипційних факторів, які задіяні в гомеостаз глутатіону, а також дією хімічних речовин або метаболічних інтермедіатів [2].

Глутатіон в клітині виступає як відновлюючий агент та антиоксидант. Він попереджає окиснення SH-груп або відновлює -S-S- зв'язки, поява яких індукована окисним стресом, інактивує вільні радикали та бере участь у детоксикації ксенобіотиків (лікарських речовин та канцерогенів) [10].

GSH в клітині існує в рівновазі з окисленим глутатіоном, і співвідношення вмісту GSH/GSSG є показником редокс-стану клітини [11].

Для оцінки загального стану антиоксидантної системи клітин слизової оболонки шлунка нами було визначено вміст відновленого, окисленого глутатіону та активність глутатіонредуктази.

Споживання 0,01% розчину МННГ протягом 4 тижнів використовується як експериментальна модель передракових змін шлунка [12]. Через 4 та 6 тижнів споживання тваринами розчину МННГ рівень GSH зростав на 135% та 85% в порівнянні з контролем (рис.1). Такі ефекти на фоні контрольних значень GSSG та активності ГР, очевидно, спричинені активацією процесів антиоксидантного захисту та компенсаторним гіперсинтезом GSH, який спрямований на відновлення пошкоджень слизової оболонки шлунка, викликаних канцерогеном. Зазначені зміни в свою чергу обумовлені підвищенням активності γ-глутамілцистеїнсинтетази – ключового ферменту синтезу GSH. Кінець 6 тижня характеризувався високим вмістом відновленої форми глутатіону, підвищенням GSSG на 612% (рис.2) та зростанням активності ГР відносно контрольних значень. За літературними даними такі процеси є результатом гальмування експорту GSH з клітини білками-переносниками, який є опосередкований великими концентраціями внутрішньоклітинного окисленого глутатіону та кон'югатами глутатіону (GSR) [3].

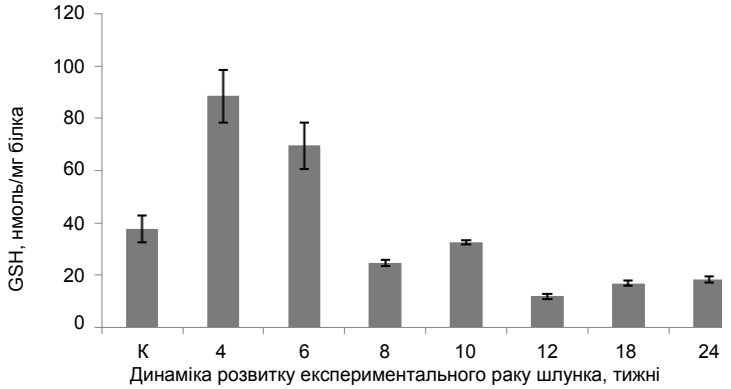


Рис. 1. Вміст відновленого глутатіону за умов розвитку експериментального раку шлунка

* – p < 0,05 (достовірність різниці в порівнянні з показниками контрольної групи тварин)

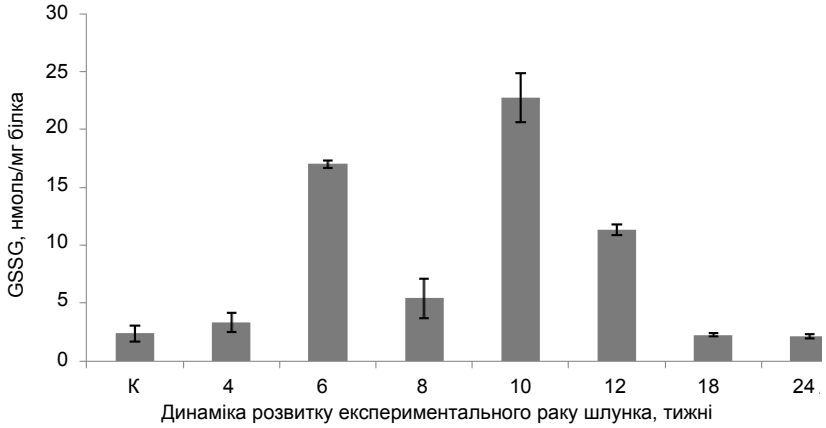


Рис. 2. Вміст окисленого глутатіону за умов розвитку експериментального раку шлунка

* – p < 0,05 (достовірність різниці в порівнянні з показниками контрольної групи тварин)

Наприкінці 6 тижня нами встановлено незначне, порівняно з кількість GSSG, зростання активності ГР на 27% (рис.3). Надлишкове накопичення в клітинах активних форм кисню, в тому числі пероксиду водню, стимулює функціонування глутатіонпероксидази і в результаті призводить до накопичення GSSG. Глутатіонредуктаза є високоспецифічним до своїх субстратів ферментом (значення K_m відповідає концентрації окисленого глутатіону в тканинах 20-110мкМ), тому накопичення GSSG завжди викликає його активне відновлення [3]. За нормальних умов у більшості тканин швидкість відновлення GSSG переважає над синтезом GSH [3]. Затримку відновних процесів, яка проявляється вираженим накопиченням окисленого глутатіону, можна пояснити нестачею НАДФН+H^+.

Через 8, 12, 18 та 24 тижня розвитку досліджуваної патології в загальній фракції клітин слизової оболонки шлунка спостерігалося зниження вмісту GSH на 34%, 69%, 55% та 52% відповідно, в порівнянні з контролем. Встановлені зміни можуть бути наслідком інтенсифікації метаболізму GSH через його безпосереднє залучення до детоксикації цитотоксичних, канцерогенних сполук

та оксидантів з утворенням окисленої форми глутатіону. Відомо, що GSSG є специфічним субстратом глутатіонредуктази, зростання активності якої на 25%, 92%, 46% та 28% зафіксовано в ці ж терміни досліджень. Окислений глутатіон був підвищений на 8 та 12 тижні на 127% та 375%, відповідно.

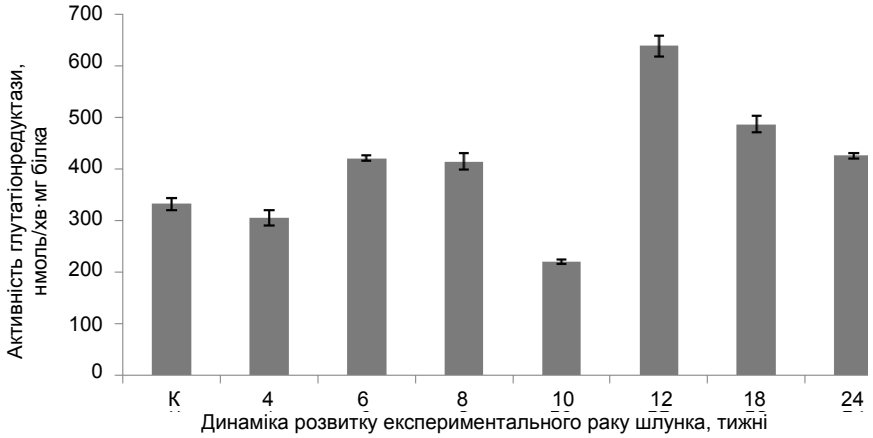


Рис. 3. Активність глутатіонредуктази за умов розвитку експериментального раку шлунка

* – p < 0,05 (достовірність різниці в порівнянні з показниками контрольної групи тварин)

На етапі дослідження 8 тижня експериментального гастроканцерогенезу активність глутатіонредуктази була подібною до попереднього рівня (вища на 25% від контролю), а вміст окисленого глутатіону знижувався на 485% в порівнянні з 6 тижнем, проте все ще перевищує контроль на 127%. Частково таке зменшення вмісту GSSG може бути обумовлене тривалим зростанням активності ГР та його експортом, оскільки підвищення внутрішньоклітинного окисленого глутатіону призводить до активації його транспорту з клітини. Вищезгаданий процес забезпечується особливою GSSG-залежною АТФазою плазматичної мембрани [3]. Експорт і утворення кон'югатів глутатіону в глутатіонтрансферазній реакції призводить до невідновної втрати глутатіону для клітини без можливості його регенерації глутатіонредуктазою.

Максимальне підвищення концентрації окисленого глутатіону на 852% та максимальне зниження активності глутатіонредуктази на 34% зафіксоване через 10 тижнів МННГ-стимульованого гастроканцерогенезу.

Таким чином, при окисному стресі GSH окислюється до GSSG і відбувається накопичення GSSG в цитозолі. Для запобігання зрушенню редокс-рівноваги клітини, GSSG може активно виводитись з клітини або взаємодіяти з SH-групою білків (PSH) з утворенням змішаного дисульфіду (PSSG) [13].

Оскільки специфічних внутрішньоклітинних інгібіторів глутатіонредуктази не виявлено, а конкурентним інгібітором є тільки НАДФ, причиною зниження активності ГР є нестача відновлених коферментів НАДФН, які утворюються в пентозофосфатному циклі. Глутатіонредуктазна реакція утилізує більше НАДФН, ніж інші реакції в клітині [3]. Також каталітична активність ГР залежить від стану її SH-груп і при фізіологічних концентраціях відновлений глутатіон виявляє інгібуючий вплив на фермент [14]. Відмітимо, що кінець 10 тижня характеризувався контрольними значеннями вмісту відновленого глутатіону.

Подальший розвиток раку шлунка (12 тиждень) призводив до зниження вмісту GSH на 69%, зростання вмісту GSSG на 375%, а активність ГР була максимально високою з усіх етапів дослідження і перевищувала контроль на 92%. Такі зміни опосередковані зняттям інгібуючого впливу відновленої та активуючого окисленої форми глутатіону на глутатіонредуктазу.

Розвиток експериментального гастроканцерогенезу наприкінці 18 та 24 тижня призводить до суттєвих змін: вмісту відновленого глутатіону в клітинах слизової оболонки шлунка, який знижується на 55% та 52%, активність глутатіонредуктази при цьому зростає на 46% та 28%, відповідно, а окислений глутатіон залишається в межах контрольних значень. На 18 тижні у залозистому відділі виявлені новоутворення [15], які за гістологічними дослідженнями відповідають аденомам та аденокарциномам.

Висновки. Виявлені особливості змін концентрації відновленого та окисленого глутатіону, активності глутатіонредуктази в загальній фракції клітин слизової оболонки шлунка за умов гастроканцерогенезу свідчать про порушення глутатіонового гомеостазу, що може бути задіяне в ініціації та промоції розвитку патології.

1. Pasupathi P., Saravanan G., Chinnaswamy P., Bakthavathsajam G. Glutathione, glutathione-dependent enzymes and antioxidant status in gastric carcinoma patients // J. of Appl. Biomed. – 2009. – №.7. – P.101-109. 2. Ballatori N., Krance S., Notenboom S. et al. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases // Biol.Chem. – 2009. – V.390(3). – P.191-214. 3. Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. Обмен глутатиона // Успехи биологической химии. – 1990. – Т.31. – с.157-179. 4. Okazaki K., Ishii Y., Kitamura Y. et al. Dose-dependent promotion of rat forestomach carcinogenesis by combined treatment with sodium nitrite and ascorbic acid after initiation with N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine: possible contribution of nitric oxide-associated oxidative DNA damage // Cancer Sci. – 2005. – V.97. – P.175-182. 5. Roediger W.E.W., Truelove S.C. Methods of preparing isolated colonic epithelial cells (colonocytes) for metabolic studies // Gut. – 1979. – Vol. 20. – P.484-488. 6. Таиров М.М., Берсимбаев Р.И., Аргутинская С.В., Салгани Р.И. Клеточная локализация аденилатциклаз, стимулируемых гистамином и простагландином Е2 в слизистой оболочке желудка крыс и их роль в регуляции желудочной секреции // Биохимия. – 1983. – Т.48. – №6. – С.1035-1041. 7. Hissin P. and R. Hilf. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues // Anal. Biochemistry. – 1976. – V.74. – P.214-226. 8. Власова С.Н., Шабунина Е.И., Перслегина И.А. Активность глутатион-зависимых ферментов эритроцитов при хронических заболеваниях печени у детей // Лаб. дело. – 1990. – № 8. – с.19-22. 9. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for quantities of utilizing the principle of protein binding // Analytical Biochemistry. – 1976. – V.86. – P.193-200. 10. Hayes J.D., McLellan L.I. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence againts oxidative stress // Free Radical Res. – 1999. – V.31. – P.273-300. 11. Курилова Л.С., Крутецкая З.И., Лебедев О.Е., Антонов В.Г. Влияние окисленного глутатиона и его фармакологического аналога препарата Глутоксим на внутриклеточную концентрация Са2+ в макрофагах // Цитология. – 2008. – №5. – с.452-461. 12. Campbell-Thompson M., Lauwers G.Y. et al. 17β-Estradiol modulates gastroduodenal preneoplastic alterations in rat exposed to the carcinogen N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine // Endocrinology. – 1999. – V.140. – №10. – P.4886-4894. 13. Lu S.C. Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies // FASEB J. – 1999. – V.13. – P.1169-1183. 14. Carlberg I., Mannervik B. Glutathione reductase // Meth. Enzymol. – 1985. – Vol.113. – P.484-490. 15. Тимошенко М., Гайда Л., Кравченко О., Остапченко Л. Вміст відновленого глутатіону в клітинах слизової оболонки шлунка за умов експериментального гастроканцерогенезу // Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. – 2011. – №14. – С.37-39.

Надійшла до редколегії 19.12.11

УДК: 616.34-002

К. Афіцька, студ., В. Кухарський, канд. біол. наук,
Г. Толстанова, д-р біол. наук

АКТИВАЦІЯ ERK1/2 ТА P-38 MAP-КІНАЗНИХ ШЛЯХІВ У ТОВСТІЙ КИШЦІ ЩУРІВ ЗА ДІЇ СТРЕСУ

Вперше встановлено зміни активності Erk1/2 та p38 MAP-кіназ в слизовій оболонці товстої кишки щурів за дії водно-імобілізаційного стресу різної тривалості. Підвищення рівня гормону стресу кортизолу супроводжувалось збільшенням фосфорилювання Erk1/2 MAP-кіназ та зменшенням фосфорилювання p38 MAP-кінази у слизовій оболонці товстої кишки щурів. Це може свідчити про залучення MAP-кіназних шляхів у механізми розвитку стресових уражень товстої кишки.

For the first time we showed changes of Erk 1/2 and p38 MAP kinases activity in rat colonic mucosa at different stages of immobilization stress combined with water-immersion. Upregulation of stress-hormone cortisol levels was accompanied by increase of Erk1/2 and decrease of p38 phosphorylation in rat colonic mucosa. We suggested that MAP-kinases pathways may be involved in the mechanisms of stress-induced colonic injury.

Вступ. Виразковий коліт – це хронічне запальне захворювання товстої кишки з невизначеною етіологією. Одним з важливих патогенетичних чинників загострення симптомів хвороби та факторів, що зумовлюють її рецидив, є стрес (стрес – це неспецифічна відповідь організму на будь-яку висунуту йому вимогу) [4, 5]. Встановлено прямий взаємозв'язок між стресовими впливами та порушенням імунної відповіді [1], також гострий стрес збільшує проникність кишкового бар'єру з наступною транслокацією бактерій в стінку кишечника, стресові чинники спричинюють розлади в моторній та секреторній функціях кишечника [6].

Узгоджена активація кіназ (протеїнкіназні каскади) є генеральним механізмом сигнальної трансдукції в багатьох клітинних процесах. Мітоген активовані протеїнкіназні (MAP) сигнальні каскади кооперуються у передачі зовнішньоклітинних сигналів до їх внутрішньоклітинних мішеней і таким чином ініціюють стресові і запальні відповіді клітин, їх проліферацію, диференціацію, розвиток та апоптоз. ERK (extracellular signal regulated kinases) інтенсивно активуються мітогенними факторами, факторами росту, нейротрансміттерами, сироваткою і в меншій мірі деякими навколишньосередовищними стресами. MAP-кіназа p38 переважно активується різними клітинними стресами, такими як гіперосмотичний шок, метаболічний стрес, УФ-опромінення, тепловий шок, цитокіни, ішемія та під дією інгібіторів синтезу протеїнів [3]. Hebert M. та співав. [2] показали, що одноразова експозиція імобілізаційного стресу викликає збільшення фосфорилювання p38, JNK 1/2/3 та ERK1/2 в мозку щурів. Рівень експресії мРНК ERK1/2 знижується у тварин за умов експериментальної депресії [11].

Нами показана швидка активація Erk1/2 MAP-кіназного шляху трансдукції сигналу в гострій фазі експериментального коліту та її зниження при хронічному протіканні хвороби [9]. Метою даної роботи було дослідити залучення MAP-кіназних сигнальних шляхів до реакції товстої кишки щурів на дію стресу різної тривалості.

Об'єкт та методи дослідження. Дослідження проводили на білих нелінійних щурах самцях масою 180-200 г. До початку досліду щурів утримували на голоді з вільним доступом до води впродовж 24 годин. Стрес-викликані ураження товстої кишки моделювали за допомогою водно-імобілізаційного стресу тривалістю 20 хв, 1 та 3 год. Для цього щурів експериментальних груп розміщували в металевих перфорованих патронах з прозорим вікном у верхній частині, де знаходилась голова щура. Після цього патрони в вертикальному положенні занурювали в резервуар з водою (t=22°), залишаючи 1/3 частини патрона над поверхнею води, відповідно на 20 хв, 1 і 3 год. Щури контрольної групи не піддавались ніяким маніпуляціям. Щурів умертвляли шляхом цервікальної дислокації, відбирали кров методом кардіопунктури та вирізали 7 см товстої кишки від анального отвору. В сироватці крові визначали рівень кортизолу за хемілюмінесцентним методом, з використанням комерційних наборів (SySmax, DPC, США). Видалену слизову оболонку товстої кишки гомогенізували в лізуючому буфері з додаванням інгібітора протеїназ та фосфатаз (Sigma, США). Концентрацію загальних протеїнів вимірювали за методом Бредфорд з використанням набору "Bio-Rad для білкового аналізу" (Bio-Rad, США). Розділення та визначення протеїнів (50,75 та 100 мкг заг.протеїну/зразок) методом Вестерн блот проводили в 10% SDS поліакриламідному гелі з наступним переносом на Hybond-ECL нітроцелюлозну мембрану (Amersham Biosciences, США) згідно стандартного протоколу фірми Bio-Rad. Поліклональні антитіла проти p38, p-p38, Erk1, Erk 2, pErk та β-актину (1:300 – 1:3000; Santa-Cruz Biotech., США) використовували для визначення рівня відповідних протеїнів в стінці товстої кишки, з наступною інкубацією із вторинним HRP-кон'югованним антитілом (1:10000, Santa-Cruz Biotech., США). Візуалізацію Вестерн блот проводили ECL-реагентом. Оптико-денситометричний аналіз проводили з використанням спеціалізованого програмного забезпечення (програма "Phoretix"). Статистичну обробку результатів проводили за t тестом Стьюдента. Дані представлені у вигляді M±m, статистично значущою вважали різницю $P<0,05$.

Результати та їх обговорення. В результаті проведених досліджень встановлено, що дія водно-імобілізаційного стресу спричиняла значне підвищення рівня гормону стресу кортизолу в сироватці крові. Так, через 20 хвилин дії стресу рівень кортизолу збільшився в 1,88 рази, через 1 годину – в 2,25 раз (гострий стрес), через 3 години рівень кортизолу був вищим за контрольний в 1,92 рази ($p<0,05$), але нижчим за показники в попередній групі. Початок зниження рівня кортизолу через 3 години дії стресу може свідчити про зміни в організмі, що спостерігаються при хронічному стресі.

В дослідженнях на різних ділянках мозку встановлено залучення Erk-1/2 MAP–кіназних сигнальних шляхів в реалізацію стрес реакцій організму [2, 7, 8, 12]. Показано збільшення активності Erk 1/2 в нейронах мигдалини головного мозку щурів у відповідь на одноразову експозицію стресора тривалістю 30, 60 або 120 хв. Причому активовані Erk 1/2 переважно локалізувалися в мітохондріях та аксонах [12]. Підвищення активності Erk 1/2 було показано у блакитній плямі щурів при імобілізаційному стресі [2]. При цьому спостерігалось переважання у вмісті ізоформи ERK1, тоді як ERK2 була найбільш фосфорильованою. Revest J.M. та співав. [7] показали, що блокування MAP-кіназного сигнального шляху в гіпокампі знімало стрес-викликані реакції організму, опосередковані глюкокортикоїдами.

У ссавців дві ізоформи Erk, Erk1 (379 амінокислотних залишків, Mr=44 кДа) і Erk2 (360 амінокислотних залишків, Mr=42 кДа), які на 84% ідентичні за на амінокислотним складом і можуть компенсувати більшість

© Афіцька К., Кухарський В., Толстанова Г., 2012

функцій один одного, хоча у деяких випадках показана їх антагоністична дія [10]. Для їх визначення ми використовували специфічні поліклональні антитіла, що розпізнають субдомен XI Erk-1 та С-кінцевий домен Erk-2. Водно-імобілізаційний стрес не спричинює змін у рівні загальних протеїнів Erk-1 та Erk-2 в слизовій оболонці товстої кишки щурів (рис.1А).

Для оцінки ступеня активації Erk-1/2 сигального шляху ми визначали кількість фосфорильованих форм цих протеїнів. Активування Erk-1/2 здійснюється шляхом подвійного фосфорилювання залишків треоніну (Thr202) і тирозину (Tyr204) в трипептидному мотиві Thr-Glu-Tyr. Фосфорильовані протеїни Erk-1 та Erk-2 димеризуються і в такому стані транспортуються в ядро, де фосфорилюють залишки серину і треоніну ядерних протеїнів, таким чином здійснюючи вплив на транскрипцію. Визначення вмісту фосфорильованих Erk проводилось з використанням моноклонального антитіла, яке розпізнає послідовність, що містить фосфорильований Tyr204 Erk1 та Erk2. Водно-імобілізаційний стрес викликає збільшення фосфорилювання Erk1 на 38% через 20 хвилин дії стресу і на 17% через 1 год дії стресу ($p<0,05$). Через 3 год спостерігається зменшення рівня фосфорилювання Erk1 на 27% відносно показників у контрольній групі. Рівень фосфорилювання Erk2 збільшується на 17% через 20 хв дії стресу, і зменшується на 9% відносно контролю через 1 год дії стресу та на 86,6% через 3 год (рис. 1А).

Можна припустити, що збільшення кількості pErk через 20 хв дії водно-імобілізаційного стресу свідчить про швидку активацію Erk1/2 MAP-кіназного шляху при розвитку гострої стресової відповіді, і що зменшення рівня фосфорилювання за одно і трьох годинної дії стресу може бути пов'язане з адаптацією організму до нього.

Слід відмітити, що фосфорилювання ізоформи Erk1 відбувалось набагато інтенсивніше порівняно з ізоформою Erk2. Цей факт має суттєве значення, враховуючи, що в дослідженнях на мозку показане переважне фосфорилювання ізоформи Erk2 при дії стресу [2]. Це може вказувати на органо-специфічність регуляторних механізмів розвитку стрес реакцій, до яких залучені Erk1/2 сигнальні шляхи.

Отже, підвищення рівня кортизолу (показник реакції організму на стрес) було пов'язано з підвищенням рівня фосфорильованих форм Erk 1/2 за незмінного рівня загальних протеїнів Erk 1/2. В наших попередніх дослідженнях показано швидку активацію Erk1/2 на ранніх етапах розвитку йодоацетамід-зумовленого експериментального коліту у щурів, тоді як, розвиток хронічного коліту у мишей, нокаутованих по гену IL-10, супроводжувався її зниженням [9]. Так як за дії стресу також спостерігається збільшення активації Erk1/2 в слизовій оболонці товстої кишки, ми можемо припустити залучення даного сигнального шляху у механізми стрес-спричиненого рецидиву та загострення симптомів виразкового коліту.

Наступним етапом, ми дослідили вміст загального протеїну p38 та ступінь його фосфорилювання в слизовій оболонці товстої кишки щурів, підданих дії водно-імобілізаційного стресу. Рівень загального протеїну p38 залишався без змін за дії водно-імобілізаційного стресу різної тривалості (рис.1Б). Активування p38 здійснюється шляхом подвійного фосфорилювання залишків треоніну (Thr180) і тирозину (Tyr182) в трипептидному мотиві Thr-Gly-Tyr. Фосфорильований p38 здатний активувати інші кінази та транскрипційні фактори шляхом їх фосфорилювання по залишкам серину і треоніну. Рівень активації p38 визначили за допомогою специфічного первинного антитіла, яке розпізнає даний протеїн, фосфорильований по залишкам амінокислот в положеннях Thr180/Tyr182. Вміст фосфорильованої форми p38 зменшується на 81,5% та 84,5% ($p<0,05$) на фоні одно- і тригодинної дії стресу, відповідно (рис. 1Б).

Отримані дані вказують на пригнічення процесів, що опосередковані p-38-залежними сигнальними шляхами, в слизовій оболонці товстої кишки щурів за дії стресу. Аналогічні дані були отримані Shimizu Y. та співав. [8], які показали відсутність зміни фосфорилювання JNK та p38 і значне підвищення активності Erk1/2 у мозку щурів (блакитна пляма) за умов одноразової експозиції (2 год) імобілізаційного стресу.

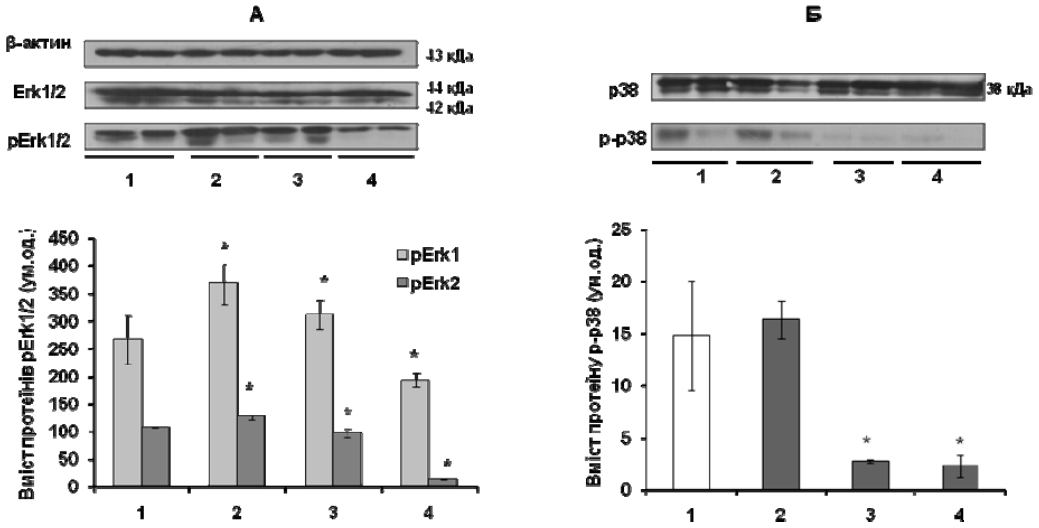


Рис. 1. Результати Вестерн-блот аналізу протеїнів Erk1, Erk2 та їх фосфорильованих форм pErk (А) і p38 з його фосфорильованою формою p-p38 (Б) у клітинах слизової оболонки товстої кишки щурів після дії водно-імобілізаційного стресу різної тривалості, M±m (*-$p<0.05$, відносно показників у контрольній групі)

1 – Контроль;
2 – 20 хвилин після початку дії водно-імобілізаційного стресу;
3 – 1 год після початку дії водно-імобілізаційного стресу;
4 – 3 год після початку дії водно-імобілізаційного стресу.

Висновки. 1.Вперше встановлено зміни активності Erk1/2 та p38 MAP-кіназ в слизовій оболонці товстої кишки щурів за дії водно-імобілізаційного стресу різної тривалості. 2. Підвищення рівня гормону стресу кортизолу супроводжується збільшенням фосфорилювання Erk1/2 MAP-кіназ та зменшенням фосфорилювання p38 MAP-кінази у слизовій оболонці товстої кишки щурів за дії водно-імобілізаційного стресу.

1. Boscolo P. Work stress and innate immune response / Boscolo P., Di Gioacchino M., Reale M. [et al] // Int J Immunopathol Pharmacol. – 2011. – Vol.24. – P.51 – 54. 2.Hebert M. Single and repeated immobilization stress differentially trigger induction and phosphorylation of several transcription factors and mitogen-activated protein kinases in the rat locus coeruleus / Hebert M., Serova L., Sabban E. // Journal of Neurochemistry. – 2005. – Vol.95. – P.484 – 498. 3.Hitti E. The ERK and p38 MAPK pathways as targets for anti-inflammatory therapy / Hitti E., Kotlyarov A. // Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry. – 2007. – Vol.6. – P.85 – 97. 4.Kiank C. Stress-related modulation of inflammation in experimental models of bowel disease and post-infectious irritable bowel syndrome: role of corticotropin releasing factor receptors / Kiank C., Taché Y., Larauche M. // Brain Behav Immun. – 2010. – Vol.24. – N.1. – P.1 – 15. 5. Kuroki T. Imbalance in the stress-adaptation system in patients with inflammatory bowel disease / Kuroki T., Ohta A., Sherriff-Tadano R. [et al] // Biol Res Nurs. – 2011. – Vol.4. – P.391 – 398. 6. Mawdsley J. E. Psychological stress in IBD: new insights into pathogenic and therapeutic implications / Mawdsley J. E., Rampton D. S. // Gut. – 2005. – Vol.54. – P.1481–1491. 7. Revest J.M. The MAPK pathway and Egr-1mediate stress-related behavioral effects of glucocorticoids / Revest J.M., Di Blasi F., Kitchener P. [et al] // Nature neuroscience. – 2005. – Vol. 8. – N.5. – P.664 – 672. 8. Shimizu Y. Cell-type specific signal transduction and gene regulation via mitogen-activated protein kinase pathway in catecholaminergic neurons by restraint stress / Shimizu Y., Sugama S., Degiorgio L.A. [et al] // Neuroscience – 2004. – Vol.129. – N.3. – P.831 – 839. 9. Tolstanova G.New molecular mechanisms of the unexpectedly complex role of VEGF in ulcerative colitis / Tolstanova G., Khomenko T., Deng X. [et al] // Biochem Biophys Res Commun. – 2010. – Vol.399. – N.4. – P.613 – 616. 10. Vantaggiato C. ERK1 and ERK2 mitogen-activated protein kinases affect Ras-dependent cell signaling differentially / Vantaggiato C., Formentini I., Bondanza A. [et al] // Journal of Biology. – 2006. – Vol.5. – N.14 – P.14.1 – 14.15. 11. Wang S. Effect of Chaihu Shugan San and its components on expression of ERK1/2 mRNA in the hippocampus of rats with chronic mild unpredicted stress depression / Wang S., Hu S., Zhang C. // J Cent South Univ(Med Sci). – 2011. – Vol.36. – N.2. – P.93 – 100. 12. Xiao B. Single-prolonged stress induces increased phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase in a rat model of post-traumatic stress disorder / Xiao B., Han F., Wang H.T., Shi Y.X. // Mol Med Report. – 2011. – Vol.4. – N.3. – P.445-449.

Надійшла до редколегії 16.11.11

УДК 612.821:612.82/83

Я. Лисенко, студ., В. Кравченко, канд. біол. наук

ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ ПСИХОФІЗІОЛОГІЧНИХ ФУНКЦІЙ СТУДЕНТІВ, ЩО НАВЧАЮТЬСЯ ЗА ОСВІТНЬО-КВАЛІФІКАЦІЙНИМИ РІВНЯМИ "СПЕЦІАЛІСТ" ТА "МАГІСТР"

Досліджено відмінності властивостей нервової системи, деяких особистісних рис та розвиток вищих психічних функцій у студентів, що навчалися за програмою "магістр" та спеціаліст". Виявлено, що студентам-магістрам притаманна вища функціональна рухливість нервових процесів, більш розвинена довготривала асоціативна пам'ять та вищий коефіцієнт розумового розвитку. Запропоновано проходити когнітивні тренування для підвищення швидкості обробки інформації тим студентам, яким притаманна інертність нервових процесів з метою підвищення рівня успішності.

Differences of nervous system properties, some personality traits and development of mental functions in students, studied on master's and "specialist's" degree were observed. It was showed, that master-degree students have higher mobility of information processing, higher level of long-term associative memory and higher level of IQ test. It was proposed to include cognitive trainings for raising speed of information processing for those students, which have inertness of nervous processes to improve academic performance.

Вступ. Дослідження зв'язку успішності в навчанні з індивідуально-типологічними особливостями прояву властивостей нервової системи є одним з наріжних питань диференційної психофізіології. Незважаючи на велику кількість досліджень в цьому напрямку [3, 9, 12], результати є достатньо суперечливими. Крім того, потрібен аналіз "психофізіологічного профілю" студентів, що навчаються за конкретною спеціальністю, адже відомо, що висока успішність студентів в гуманітарних чи технічних дисциплінах забезпечується завдяки кращому розвитку різних психічних функцій. В той же час сучасні природничі науки вимагають і точності у використанні високотехнічних методів, і значної пластичності мислення для інтерпретації отриманих результатів. Перехід України до дворівневої системи освіти поставив ряд проблем, які необхідно вирішувати для ефективного використання переваг, що надає Болонська система студентам та роботодавцям. Однією з таких проблем є ефективне планування кількості місць в групах, що навчаються за різними освітньо-кваліфікаційними рівнями (ОКР). У магістратуру вступають студенти, що мають вищі середні бали успішності з навчальних дисциплін та активно займаються науковими дослідженнями. Висока академічна успішність та здатність до планомірної наукової роботи, що вимагає розвинених аналітичних здібностей, характерна для студентів з певним індивідуально-типологічним профілем психофізіологічних функцій. Розуміння психофізіологічних відмінностей між студентами, що обирають для навчання програму магістратури або ОКР "спеціаліст" надасть можливість виявляти потенційних магістрантів вже на початкових курсах за допомогою комплексу психофізіологічних тестувань, що може полегшити планування педагогічного навантаження.

Крім того, знання психофізіологічного профілю студента на початкових етапах навчання допоможе викладачам використовувати диференційний підхід у методах викладання, що значно підвищить ефективність засвоєння матеріалу студентами, що відносяться до різних психотипів. Отже, метою даної роботи було дослідити, чи існують психофізіологічні відмінності між студентами, які навчаються на магістрів, та студентами, які навчаються на спеціалістів, і знайти ті критерії, за якими можна було б прогнозувати майбутній вибір програми навчання студентом.

Об'єкт та методи дослідження. В дослідженнях прийняло участь 80 студентів біологічного факультету, що навчалися за спеціальністю "фізіологія". На основі аналізу даних, що набирали впродовж 2005-2009 років було сформовано 2 групи студентів: "спеціалісти" (n=40, з них 34 дівчат) та "магістри" (n=40, з них 31 дівчат) Всі тестування проводились впродовж 1-го семестру 5-го курсу в рамках практикуму з спецкурсу "психофізіологія". Зарахування до магістратури відбувалось на підставі середнього балу академічної успішності впродовж попередніх 4-х років, який у студентів–магістрів перевищував 4,5 бали.

© Лисенко Я., Кравченко В., 2012

Досліджували ряд показників, що характеризують розвиток окремих психічних функцій, індивідуально-типологічні особливості та властивості нервових процесів студентів. Коефіцієнт розумового розвитку визначали на основі адаптованих російськомовних тестів на інтелект, розроблених Г.Айзенком [1]. Оцінку розвитку довготривалої асоціативної пам'яті, стійкості уваги визначали за допомогою методик, описаних в [4]. Властивості нервових процесів (силу нервових процесів, їх врівноваженість та функціональну рухливість), латентні періоди простої і складної сенсомоторних реакцій, точність стеження за рухомим об'єктом, точність короткочасної пам'яті та працездатність головного мозку визначали за допомогою комп'ютерної програми експрес-діагностики функціонального стану нервової системи "Status", розробленої Чайченко Г.М., Н.Б.Філімоновою [7]. Рівень екстраверсії та нейротизму визначали за допомогою бланкового опитувальника Г.Айзенка, рівень особистісної та ситуативної тривожності за опитувальником Ч.Д.Спілбергера [5].

Статистичний аналіз даних проводили за допомогою пакета прикладних програм Statistica 6.0 (StatSoft, USA). Оскільки розподіли більшості показників, отриманих в цих дослідженнях, був відмінним від нормального (за критерієм Лілліфора), при порівнянні залежних вибірок застосували непараметричний Т-критерій знакових рангів Вілкоксона. Критичний рівень значущості міжгрупових відмінностей при перевірці статистичної гіпотези приймався рівним p=0,05. Для опису вибіркового розподілу вказували медіани та міжквартильний розкид (Me [25%; 75%]).

Результати дослідження та їх обговорення. Усі отримані впродовж практикуму показники були розбиті нами на 4 групи:

А. Показники, що характеризують властивості нервової систем (сила нервових процесів, їх врівноваженість та функціональну рухливість (ФРНП), коефіцієнт міжпівкульної асиметрії).

Б. Показники, що характеризують часові параметри протікання нервових процесів (латентні періоди сенсомоторних реакцій).

В. Показники, що характеризують індивідуально-типологічні особливості (рівень екстраверсії, нейротизму, тривожності).

Г. Показники, що характеризують розвиток вищих психічних функцій (пам'ять, увага, мислення).

***Таблиця* 1. Стан психофізіологічних функцій та властивостей нервової системи студентів "спеціалістів" і "магістрів" (Медіана; 25%; 75%)**

Блоки	Показник	Спеціалісти (n=40)	Магістри (n=40)	Рівень значущості p
А.	Коефіцієнт сили нервової системи	0,98 [0,93; 1,1]	1,02 [0,96; 1,1]	0,19
	Градієнт сили нервової системи	1,26 [1,16; 1,44]	1,30 [1,20; 1,49]	0,18
	Функціональна рухливість нервових процесів, інтервал між стимулами, мс	526 [449; 586]	430 [398; 570]	0,07
	Працездатність головного мозку, % помилок	5,5 [4; 8,5]	8,75 [5; 12]	0,06
	Врівноваженість нервових процесів	1,75 [1,33; 3,00]	1,56 [1,00; 2,44]	0,15
Б.	Латентний період простої сенсомоторної реакції, мс	251 [219; 285]	225 [217; 268]	0,7
	Латентний період реакції вибору, мс	395 [369; 432]	370 [363; 414]	0,87
	Точність реакції на рухомий об'єкт	7 [4; 12]	10 [5; 16]	0,22
В.	Рівень екстраверсії, бали	12 [8; 15]	13[9; 15]	0,32
	Рівень нейротизму, бали	13 [8; 17]	15 [11; 17]	0,53
	Рівень особистісної тривожності, бали	44 [32; 47]	42 [36; 49]	0,84
	Рівень ситуативної тривожності, бали	19 [13,5; 34]	23 [8; 31]	0,78
Г.	Вибірковість уваги, бали	7; [6; 8,5]	7; [7; 9]	0,95
	Коефіцієнт розумового розвитку, бали	133 [109; 139]	140 [131; 158]	0,03
	Точність довготривалої пам'яті, % вірних відповідей	68,7 [60; 80]	75 [70; 85]	0,024
	Точність короткочасної пам'яті на цифри, % помилок	18 [11; 23]	15 [12; 18]	0,4

Порівняння показників, що характеризують властивості нервових процесів (блок А табл. 1) не виявило значущих відмінностей в силі нервової системи та врівноваженості процесів збудження і гальмування. Тобто, не зважаючи на очевидні переваги, які надає висока сила та врівноваженість нервових процесів для тривалого засвоєння матеріалу в різноманітних обставинах [3], високої успішності в навчанні досягають студенти і з слабкою чи неврівноваженою нервовою системою. На нашу думку, студенти із слабкою нервовою системою використовують для ефективного засвоєння матеріалу відмінні когнітивні та поведінкові стратегії, які при розумінні специфіки навчання таких осіб викладачем дають високі результати. Зокрема, як пишуть Акімова Т. и Козлова В. [3, с.224], студенти із слабкою нервовою системою добре засвоюють навчальний матеріал при вирішенні однотипних завдань, при використанні покрокових інструкцій, які можна розділити на окремі завдання, завдяки систематизації матеріалу та схильністю до ретельного контролю та плануванню своїх дій. Недостатню зосередженість та відволікання уваги студенти із слабкою нервовою системою компенсують посиленим контролем та перевіркою роботи після виконання. Таким чином, не зважаючи на слабкість процесу збудження, такі студенти часто досягають кращих результатів, ніж студенти із сильною нервовою системою, котрі більш впевнені в своїх результатах і намагаються все вивчити за один раз. Крім того, за даними різних дослідників [3, с.160], сила нервової системи обернено пов'язана із нейротизмом, що означає підвищений його рівень у осіб з слабкою нервовою системою, що певною мірою сприяє більшій відповідальності за результати навчання.

З усіх вроджених властивостей нервової системи ми виявили значну тенденцію (p=0,07) до відмінностей між "спеціалістами" та "магістрами" за показником ФРНП, який відображує швидкість виникнення та зникнення нервових процесів. Отримані дані вказують на вищу лабільність нервової системи магістрів порівняно із студентами спеціалістами. Як видно з табл.1, показник ФРНП був менший у студентів-магістрів, що означає, що їх нервова система швидше (430 мс) порівняно із студентами-спеціалістами (560 мс) аналізує різнопланову інформацію внаслідок швидшого затухання слідових потенціалів в нейронах [3]. Оскільки функціональна рухливість нервових процесів пов'язана з швидкістю адаптації людини до змін навколишнього середовища, можливо, студенти-

магістри є більш успішними за рахунок більш швидкого пристосування до вимог навчального процесу та вищої соціальної мобільності. Показник працездатності головного мозку, який відображує відсоток помилок, що допустив обстежуваний при виконанні тесту на ФРНП у максимально швидкому для нього темпі, був нижчим у спеціалістів, що цілком закономірно, зважаючи на більш повільний темп пред'явлення подразників. Показники ФРНП і ПГМ є обернено залежні та входять до одного фактору [6], що відображує більшу ймовірність помилки при вищому темпі обробки інформації.

В літературі також виявлений зв'язок між успішністю навчання та лабільністю нервової системи [3,12], багатьма авторами показано, що учні з високою рухливістю/лабільністю нервових процесів досягають вищих результатів у навчанні. Зокрема, вони в силу вищої рухливості швидше виконують багатокомпонентні завдання із обмеженням в часі. Зрозуміло, що такі студенти будуть мати перевагу перед студентами з інертними нервовими процесами у результатах підсумкових комп'ютерних тестувань, за допомогою яких часто оцінюється рівень знань з дисципліни. Взагалі поступове витіснення усних форм контролю тестовими завданнями на іспитах на нашу думку сприятиме відбору студентів із високою силою та лабільністю нервової системи, оскільки вони в таких умовах здатні витримати високий темп вирішення завдань і показати високі результати. Натомість для студентів з інертними нервовими процесами потрібно застосовувати інший підхід у перевірці знань – усну чи письмову відповідь за усталеною схемою, із достатнім часом на підготовку, щоб такий студент міг спокійно обдумати формулювання відповіді.

Як видно з даних, представлених в блоці Б табл. 1, часові параметри сенсомоторних реакцій хоч і менші у магістрів, але значуще не відрізняються у студентів, що мають різну успішність. Зважаючи на відмінності у ФРНП, яка вимірює тривалість інтервалу між подразниками, коли можлива їх вірна диференціація, можна стверджувати, що для успішного навчання важлива швидкість роботи "центрального процесора", а не швидкість передачі на периферію, тому час реакції на подразник не є тим критерієм, за яким можна спрогнозувати високоуспішного студента. Згідно даних томографії, на роль центрального процесора при аналізі відповідності стимулу певним критеріям відповідає дорзолатерльна префронтальна кора [10], висока лабільність нейронів якої, ймовірно, і притаманна більш успішним студентам.

Порівняння індивідуально-типологічних характеристик студентів, що навчаються за різними ОКР також не виявило між ними значущих відмінностей. Ми оцінювали ті індивідуальні риси, які мають найбільш досліджене фізіологічне підґрунтя – тривожність, нейротизм і екстраверсію [11]. Як видно з блоку В (табл.1), належність до певного психотипу за Айзенком не пов'язана з успішністю, так як в обох групах біля половини студентів мали рівень екстраверсії та нейротизму вище середнього рівня за цими шкалами (12 балів). Знову ж таки, відсутність відмінностей вказує на те, що кожен психотип досягає високих результатів у навчанні завдяки індивідуальним когнітивним стилям, що дозволяють пристосуватися до стандартних вимог. Скажімо, рівень знань, яких емоційно стабільний інтроверт досягає при ретельному вивченні теоретичного матеріалу самотужки, екстраверт може отримати під час активної дискусії на семінарському занятті чи при колективному опануванні практичних навичок. В літературі стосовно зв'язку особистісних рис із академічною успішністю переважає думка, що високий рівень нейротизму не сприяє отриманню високих результатів в навчанні [9]. В нашому дослідженні високий рівень нейротизму (більше 17 балів) виявлений у 25% студентів обох досліджуваних груп, а от нижній квартиль за цією ознакою був нижчим у студентів-спеціалістів, що підтверджує думку про те, що помірний рівень нейротизму сприяє кращому навчанню, тоді як низький рівень нейротизму свідчить про деяку "безпечність" і недбалість у ставленні до навчання.

Аналіз отриманих даних вказує на те, що основні відмінності між студентами з високою і низькою успішністю навчання стосуються розвитку вищих психічних функцій (табл. 1, блок Г). Так, магістри мали вірогідно вищі результати в тестах на розвиток довготривалої асоціативної пам'яті та розумового розвитку порівняно із студентами-спеціалістами. Це цілком очікувані відмінності, оскільки зрозуміло, що здатність до створення ефективних асоціативних зв'язків при запам'ятовуванні інформації неодмінно надає перевагу при відтворенні цієї інформації під час контрольних робіт та іспитів. Слід зазначити, що точність короткочасної пам'яті не відрізнялася у представників двох груп, що свідчить про те, що високоуспішні студенти використовують більш ефективні методи при кодуванні інформації. В тесті на довготривалу асоціативну пам'ять по суті перевіряється здатність людини за короткий час створити письмову асоціацію (вербальну та образну) до почутої інформації. Подібні навички використовуються при конспектуванні лекцій, добре відомо, що у студентів-відмінників переважно дуже інформативні конспекти, в яких лекційний матеріал стиснутий і систематизований за допомогою схем і лаконічних підписів. Перероблена в такий спосіб інформація набагато краще відтворюється, ніж та, що була записана "дослівно" без створення власних асоціативних зв'язків.

Високі бали в тесті на оцінку розумового розвитку, що були виявлені у студентів магістрів, на нашу думку можуть бути спрогнозовані (при сприятливих соціокультурних факторах) на основі даних про лабільність нервових процесів (ФРНП). Тест на рівень розумового розвитку вимірює так званий психометричний інтелект, який, згідно даних досліджень, на 70% обумовлений біологічним інтелектом (генетичними, фізіологічними та біохімічними чинниками) і на 30% факторами середовища [2]. Одним з найбільш важливих аспектів біологічного інтелекту є швидкість, з якою мозок обробляє інформацію, і яка виявляється в швидкості виконання простих елементарних розумових дій. Зв'язок цієї швидкості з психометричним інтелектом підтверджується багатьма фактами позитивних кореляцій часу різного роду реакцій з КРР. Крім того, чим складніше завдання, час виконання яких вимірюється, тим більше він корелює з рівнем КРР. Звідси Г.Айзенк робить висновок, що оскільки складні інтелектуальні акти включають велику кількість елементарних, а вимоги до швидкості адитивні, то КРР більшою мірою визначається швидкістю, з якою мозок здійснює елементарні операції по обробці інформації. Таким чином, швидкість обробки (по суті лабільність нервової системи) є тією загальною ланкою, яка пов'язує інтелект біологічний та психометричний, хоча останній, окрім вроджених властивостей, обумовлений також впливом культури, виховання в сім'ї, освіти та соціоекономічного статусу.

На нашу думку, розвиток асоціативної пам'яті за допомогою різноманітних мнестичних стратегій та підвищення швидкості обробки інформації шляхом оволодіння методів когнітивного тренування є необхідними кроками для підвищення якості засвоєння знань. Сьогодні надзвичайною популярністю в розвинених країнах користуються програми когнітивного тренування різних мозкових функцій, розроблені з метою підтримки нор-

мальної життєдіяльності людей похилого віку. Численними дослідженнями показано [8], що такі програми значно і стійко покращують пам'ять, увагу, швидкість обробки інформації у старших людей, в яких пластичність нейронів при навчанні вважається зниженою. Розробка і використання таких програм в молодому віці, на нашу думку, зможе значно покращити рівень засвоєння знань майбутніми фахівцями, а виявлення психофізіологічних особливостей конкретного студента допоможе підібрати відповідну програму для покращення "слабких" аспектів роботи нервової системи. Визначення рівня функціональної рухливості нервових процесів студентів сприятиме виявленню потенційно більш успішних студентів, а для тих студентів, яким притаманна інертність нервових процесів, доцільно запропонувати спеціальні програми для розвитку швидкості обробки вербальної та образної інформації. Таке цільове тренування допоможе компенсувати ті переваги в навчанні, що мають студенти з лабільною нервовою системою.

Висновки: Студенти-магістри відрізняються від студентів-спеціалістів кращим розвитком довготривалої асоціативної пам'яті, вищим коефіцієнтом розумового розвитку та вищою функціональною рухливістю нервових процесів. Відсутність відмінностей за особистісними рисами темпераменту вказує на формування індивідуального стилю діяльності, який забезпечує студентам з різними типологічними властивостями однакову успішність в навчанні.

1. Айзенк Г. Новые IQ тесты. – М. Изд-во "Эксмо", 2003. – 192 с. 2. Айзенк Г. Ю. Интеллект: новый взгляд // Вопросы психологии, 1995. – № 1. – С. 111–131. 3. Ильин Е.П. Дифференциальная психофизиология // СПб.: Питер 2001. – 464 с. 4. Кравченко В.І., Чернінський А.О., Макарчук М.Ю. Методичні рекомендації до практичних занять з психофізіології для студентів біологічних факультетів спеціальності "фізіологія людини і тварин" / В.І.Кравченко, А.О.Чернінський, М.Ю.Макарчук – К. : ООО "Геопринт", 2010. – 74 с. 5. Крылов А.А., Маничев С.А. "Практикум по общей, экспериментальной и прикладной психологии" // Практикум по психологии. – СПб.: Питер, 2004. С.295 – 299. 6. Макарчук М., Філімонова Н., Кравець Т. Основні фактори психофізіологічного стану людини // Вісник КНУ імені Тараса Шевченка. Серія "Біологія", вип.53, 2008. – С.63-66. 7. Філімонова Н.Б. Комп'ютерна експрес-методика для визначення психофізіологічного стану людини// В кн.: Матеріали II міжнародної наук.-метод.конф. "Культура здоров'я як предмет освіти". Херсонський держ. пед.ун.-т., – 2000. – С.204-209. 8. Ball K., Edwards J.D., Ross L.A. The impact of speed of processing training on cognitive and everyday functions // J. Gerontol B Psychol Sci Soc Sci. 2007 V. 62 Spec No 1:19-31. 9. Chamorro-Premuzic T., Furnham A. Personality predicts academic performance: Evidence from two longitudinal university sample // Journal of Research in Personality Vol. 37, № 4, 2003, P.319-338. 10. Dove A., Pollmann S., Schubert T. Prefrontal cortex activation in task switching: an event-related fMRI study // Brain Researches. – 2000. – Vol.10. – P.103-119. 11.Gray J.A. Brain systems that mediate both emotion and cognition // Cognition and emotion. – 1990. – Vol.4. – P.269-288. 12. Mizuno K., Tanaka M., Fukuda S. Low visual information-processing speed and attention are predictors of fatigue in elementary and junior high school students // Behavioral and Brain Functions 2011, V.7. – P.20.

Надійшла до редколегії 24.11.11.

УДК 577.352.38

**К. Дворщенко, канд. біол. наук, С. Вакал, асп.,
Л. Гайда, канд. біол. наук, Л. Остапченко, д-р біол. наук**

АНТИОКСИДАНТНІ ЕФЕКТИ МУЛЬТИПРОБІОТИКУ СИМБІТЕР У ПІДШЛУНКОВІЙ ЗАЛОЗІ ЩУРІВ ЗА УМОВ ГІПОАЦИДНОГО СТАНУ

Встановлено, що у підшлунковій залозі щурів за умов тривалого гіпоацидного стану активувались вільнорадикальні процеси: зростав вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів та змінювалась активність ензимів антиоксидантної системи. Мульипробіотик Симбітер сприяв відновленню окисно-антиоксидантного балансу у підшлунковій залозі щурів з тривалою шлунковою гіпохлоргідрією.

It was established that in the pancreas of rats with long-term hypoacidity state free-radical processes are activated: content of lipid peroxidation products increased and activity of antioxidant enzymes changed. Multiprobiotic Symbiter restored the oxidation-antioxidant balance in the rat pancreas with long-term gastric hypochlorhydria.

Вступ. В умовах сучасного життя особливого поширення набули гастроентерологічні захворювання. За даними ВООЗ кількість людей із патологіями шлунково-кишкового тракту (ШКТ) на сьогодні перевищує 20%. Значне місце серед хвороб травної системи займають гіпоацидні стани, які виникають внаслідок порушення секреції гідрохлоридної кислоти (HCl) парієтальними клітинами шлунка. Шлункова гіпохлоргідрія має поліетіологічну природу, вона розвивається за умов таких захворювань, як атрофічний гастрит, рак шлунка, перніціозна анемія, інфікування *H.pylori*, аутоімунні захворювання (синтез антитіл проти парієтальних клітин), довготривале лікування препаратами, які гальмують продукування (антагоністи H_2-рецепторів) або транспорт (інгібітори протонної помпи) HCl в шлунку тощо [12]. Зниження рівня гідрохлоридної кислоти в шлунку може призводити до порушень перетворення пепсиногену в пепсин, пригнічення активації шлункових ензимів, погіршення денатурації і набухання білків, порушення евакуації їжі зі шлунка у дванадцятипалу кишку, розмноження патогенної мікрофлори та розвиток дисбіозів [17].

З літературних джерел відомо, що довготривале лікування пацієнтів з хронічною езофагальною рефлюксною хворобою інгібіторами протонної помпи парієтальних клітин шлунка, є фактором ризику розвитку гострих панкреатитів [18], які супроводжуються порушенням мікроциркуляції в підшлунковій залозі, гіпоксією та некрозом. Первинне ураження панкреоцитів викликає внутрішньопанкреатичну активацію трипсиногену та блокаду секреції ензимів, після чого відбувається швидке вивільнення активних форм кисню (АФК), що призводить до розвитку окисного стресу в клітинах підшлункової залози. Порушення балансу між утворенням АФК та їх нейтралізацією антиоксидантами призводить до виснаження запасів внутрішньоклітинних антиоксидантів та активації вільнорадикальних процесів [11]. Таким чином, патогенез гострого панкреатиту безпосередньо пов'язаний з розвитком окисного стресу у клітинах підшлункової залози. В зв'язку з цим, показники процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) та антиоксидантної системи можуть бути використані в якості маркерів оцінки важкості ушкодження ацинарних клітин.

Відомо, що пробіотичні препарати здатні не тільки лікувати дисбіози, а і безпосередньо зменшувати ураження в ШКТ [7] завдяки їх антиоксидантним властивостям [***5***]. Одними з найбільш ефективних серед пробіотиків є мультипробіотичні препарати групи "Симбітер". Проте майже відсутні дані про їх функціонування в умовах тривалої гіпоацидності та характер впливу на окисно-антиоксидантну рівновагу клітин підшлункової залози. Тому доцільним було дослідити вплив пробіотиків на окисно-антиоксидантний стан підшлункової залози в умовах тривалої шлункової гіпохлоргідрії. Для корекції патологічних змін у клітинах підшлункової залози щурів за умов омепразол-індукованого гіпоацидного стану було обрано мультипробіотик "Симбітер® ацидофільний" кон-

© Дворщенко К., Вакал С., Гайда Л., Остапченко Л., 2012

центрований (Симбітер), основною відмінністю якого від бактеріотерапевтичних засобів попередніх поколінь є наближення його складу до природних мікробіоценозів відкритих біологічних систем організму людини та тварини, які відрізняються полікомпонентністю, широким спектром біологічної активності та взаємовигідними (мутуалістичними) міжпопуляційними відносинами [8].

Тому метою роботи було дослідити дію мультипробіотику Симбітер на окисно-антиоксидантну рівновагу у підшлунковій залозі щурів за умов тривалого гіпоацидного стану.

Об'єкт та методи досліджень. Дослідження проведені на білих нелінійних статевозрілих щурах-самцях масою 160-200 г з дотриманням загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (вересень 2001 року), інших міжнародних угод та національного законодавства у цій галузі. За добу до проведення експерименту тварин піддавали харчовій депривації з вільним доступом до води. В першій групі щурів моделювали гіпоацидний стан за допомогою внутрішньочеревного введення 14 мг/кг омепразолу (Sigma, USA), 1 раз на добу протягом 28 діб. Друга група щурів одночасно з введенням омепразолу отримувала мультипробіотик Симбітер (виробництва ТОВ "О.Д. Пролісок ") перорально в дозі 0,14 мл/кг, розчинений у 0,5 мл води для ін'єкцій. У якості контролю використовували щурів, яким протягом 28 діб вводили внутрішньочеревно 0,2 мл та перорально 0,5 мл води для ін'єкцій.

Визначення біохімічних показників у підшлунковій залозі проводили на наступний день після останнього введення препаратів. Вміст дієнових кон'югатів визначали в гептан-ізопропанольному екстракті спектрофотометричним методом, шиффових основ – флуориметричним методом [2]. Вміст ТБК-активних сполук визначали за реакцією з тіобарбітуровою кислотою [4]. Оцінку активності супероксидисмутази проводили з використанням нітросинього тетразолію [6], каталази – за зменшенням кількості H_2O_2 у розчині після інкубації за оптимальних умов [3]. Активність глутатіонпероксидази визначали за накопиченням окисненного глутатіону, а глутатіон-S-трансферазну активність – за швидкістю утворення хромогенного глутатіонового кон'югату з 1-хлор-2,4-динітробензолом [1]. Активність глутатіонредуктази визначали за перетворенням окисненого глутатіону у відновлену форму з використанням водню нікотинамідних коферментів [1]. Вміст відновленого глутатіону оцінювали згідно методу [13]. Статистичну обробку результатів дослідження проводили загальноприйнятими методами варіаційної статистики з використанням t-критерію Ст'юдента.

Результати та їх обговорення. Одним з ключових біохімічних маркерів окисно-антиоксидантного балансу клітин є рівень продуктів ПОЛ. Чим він вищий, тим більш тривалим та потужним є окисний стрес. Основним джерелом походження продуктів ПОЛ є ненасичені жирні кислоти, що входять до складу мембранних фосфоліпідів. В ході експерименту процеси ПОЛ у підшлунковій залозі щурів оцінювали за вмістом первинних продуктів ліпідної пероксидації – дієнових кон'югатів, проміжних продуктів ПОЛ – ТБК-активних сполук та кінцевих продуктів ПОЛ – шиффових основ.

Встановлено, що у підшлунковій залозі рівень первинних продуктів пероксидації ліпідів у тварин, яким вводили омепразол, збільшувався в 3 рази по відношенню до контролю (табл. 1). За умов введення мультипробіотика Симбітер щурам з гіпоацидним станом вміст дієнових кон'югатів, знижувався в 2,5 рази порівняно з тваринами, яким вводили лише омепразол. Дані результати свідчать про те, що мультипробіотичний препарат Симбітер має здатність індукувати ефективне гальмування початкової стадії процесу пероксидації ліпідів та протидіяти накопиченню первинних продуктів ПОЛ.

Таблиця 1. **Вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів у підшлунковій залозі щурів за умов тривалої гіпоацидності, (M ± m, n=10)**

Досліджуваний параметр / Група тварин	Контроль	Омепразол	Омепразол + Симбітер
Дієнові кон'югати, нМоль х мг білка$^{-1}$	391,12 ± 23,98	1155,11 ± 65,83*	456,51 ± 24,27*/#
ТБК-активні сполуки, нМоль х мг білка$^{-1}$	94,42 ± 7,54	278,47 ± 19,34*	172,91 ± 16,16*/#
Шиффові основи, ум. од. х мг білка$^{-1}$	9,83 ± 0,64	26,36 ± 1,52*	12,01 ± 0,86*/#

*- p<0,05 порівняно з контролем;

#- p<0,05 порівняно з групою тварин, яким вводили омепразол

За умов гіпоацидного стану у підшлунковій залозі щурів вміст проміжних сполук ПОЛ зростав в 3 рази відносно контролю. При сумісному введенні тваринам з блокатором шлункової секреції гідрохлоридної кислоти мультипробіотика Симбітер рівень ТБК-активних сполук у клітинах підшлункової залози зменшувався в 1,6 рази порівняно з групою щурів з гіпоацидним станом (табл. 1). Згідно із вище наведеними даними, під дією препарату Симбітер гальмуються ранні стадії ПОЛ, що проявляється у зниженні вмісту первинних продуктів процесу. Разом з тим, знижується і вміст проміжних продуктів ПОЛ, що є наслідком відновлення порушеного прооксидантно-антиоксидантного балансу клітин підшлункової залози.

Показано, що за умов тривалого введення тваринам омепразолу у підшлунковій залозі рівень кінцевих продуктів ліпопероксидації збільшувався в 2,7 рази по відношенню до контролю. У щурів, яким одночасно з омепразолом вводили мультипробіотик Симбітер, реєстрували зниження вмісту шиффових основ в 2,2 рази по відношенню до тварин з гіпоацидним станом (табл. 1). Отримані дані свідчать про те, що мультипробіотик Симбітер сприяє ефективному блокуванню термінальних стадій ПОЛ, що проявляється стійким зниженням вмісту шиффових основ. Вірогідно, що даний ефект досягається за рахунок пригнічення початкових та проміжних етапів ліпопероксидації.

Встановлене накопичення продуктів ПОЛ у ацинарних клітинах підшлункової залози за умов довготривалої шлункової гіпохлоргідрії пов'язане з надлишковим вмістом вільних радикалів у панкреоцитах, що призводить до порушення окисно-антиоксидантної рівноваги та розвитку окисного стресу. Відповідні процеси можуть інтенсифікуватись у відповідь на розвиток гіпоксії в тканині підшлункової залози, що супроводжується накопиченням значної кількості відновлених форм різних сполук, зокрема, таких коферментів, як НАД·H_2, НАДФ·H_2, ФАД·Н, убіхінонів. Дефіцит кисню на кінцевій ділянці електронного ланцюга дихання може призвести до одноелектронного відновлення кисню до супероксиду. Радикал, що утворюється, відіграє вагому роль у розвитку окисного стресу, оскільки супероксид може пере-

творюватись в більш агресивні радикали, такі як гідроксильний та інші, які можуть спричинити пошкодження багатьох клітинних компонентів.

Накопичення перекисних угруповань у жирнокислотних залишках фосфоліпідів мембран може призвести до змін їх властивостей, таких як проникність, стійкість ліпід-білкових комплексів та спричинити інактивацію ферментів. До найбільш суттєвих змін в клітині при ПОЛ можна віднести накопичення окиснювальних пошкоджень білків, ліпідів, нуклеїнових кислот, що є підгрунтям для розвитку деструктивних змін та функціональних розладів у підшлунковій залозі.

Антиоксидантна система клітин здатна обмежувати процеси ПОЛ на всіх його етапах за рахунок узгодженої роботи ферментативних та неферментативних механізмів контролю. При дослідженні ферментної ланки антиоксидантного захисту встановлено, що за умов тривалої шлункової гіпохлоргідрії в клітинах підшлункової залози активність СОД збільшувалась у 1,9 рази по відношенню до контрольної групи. При сумісному введенні щурам з омепразолом мультипробіотика Симбітер рівень СОД зменшувався в 2,3 рази у порівнянні з тваринами з гіпоацидним станом (табл. 2). Активація СОД може бути пов'язана із підвищенням концентрації супероксидних радикалів, які є субстратом СОД. З іншого боку, в умовах окисного стресу та під дією прозапальних цитокінів у клітинах активуються транскрипційні фактори NF-κB та AP-1, які стимулюють експресію ізоформ СОД. Зокрема, доведено, що активація фактора NF-κB призводить до індукції гена *sod2*, який кодує мітохондріальну ізоформу СОД [15]. Виходячи з того, що в якості біологічного матеріалу використовувались гомогенати підшлункової залози, ми можемо говорити про підвищення сумарної активності цитозольної та мітохондріальної ізоформ СОД, що зокрема і може бути пов'язано саме з індукцією експресії Mn-СОД.

Нормалізація активності СОД в підшлунковій залозі щурів при введенні мультипробіотика Симбітер за гіпоацидних умов може бути пояснена, виходячи із протизапальних властивостей пробіотичних бактерій, які входять до складу препарату. Відповідно, знижуючи інтенсивність запальних процесів в ШКТ, мультипробіотик сприяє гальмуванню окисного стресу та інгібуванню стресових транскрипційних факторів, що проявляється у зниженні сумарної активності ізоформ СОД.

У щурів, яким протягом 28 діб вводили омепразол, активність каталази в підшлунковій залозі знижувалась в 1,3 рази по відношенню до контролю. За умов введення щурам мультипробіотику Симбітер на фоні гіпоацидного стану каталазна активність зростала в 1,4 рази відносно показників "омепразолової" групи щурів та була близькою до контрольних значень (табл. 2). Вище було показно, що активність СОД за умов 28-денного введення омепразолу щурам зростала. Очевидно, що внаслідок більш інтенсивної дисмутації супероксидних радикалів рівень H_2O_2 в підшлунковій залозі мав істотно зрости. З літературних даних відомо, що надлишок перекису водню може інгібувати каталазу внаслідок окиснення радикалів амінокислот її активного центру [19].

Встановлено, що за умов тривалої шлункової гіпохлоргідрії активність глутатіонпероксидази знижувалась в 1,6 рази порівняно з контролем. При сумісному введені мультипробіотика Симбітер та омепразолу даний показник був в 1,4 рази вищим, ніж у групи щурів з гіпоацидним станом (табл. 2). Отже, в умовах омепразол-індукованої гіпоацидності спостерігається падіння сумарної активності ізоформ глутатіонпероксидази та зниження активності каталази, що свідчить про загальне послаблення антипероксидної ємності клітин підшлункової залози.

Таблиця 2. **Активність ензимів антиоксидантної системи у підшлунковій залозі щурів за умов тривалої гіпоацидності, (M ± m, n=10)**

Група тварин / Досліджуваний параметр	контроль	Омепразол	Омепразол + Симбітер
супероксиддисмутаза, ум. од. х хв$^{-1}$ х мг білка$^{-1}$	0,34 ± 0,03	0,65 ± 0,04*	0,28 ± 0,02*/#
каталаза, нМоль х хв$^{-1}$ х мг білка$^{-1}$	5,54 ± 0,32	4,33 ± 0,39*	6,09 ± 0,41#
глутатіонпероксидаза, мкМоль GSSG х хв$^{-1}$ х мг білка$^{-1}$	0,13 ± 0,12	0,08 ± 0,06*	0,11 ± 0,09*/#
глутатіонтрансфераза, мкМоль х хв$^{-1}$ х мг білка$^{-1}$	0,13 ± 0,01	0,24 ± 0,02*	0,15 ± 0,01#
глутатіонредуктаза, нМоль НАДФН х хв$^{-1}$ х мг білка$^{-1}$	1,21 ± 0,09	0,85 ± 0,07*	1,76 ± 0,15*/#
вміст відновленого глутатіону, нМоль х мг білка$^{-1}$	2,18 ± 0,19	0,96 ± 0,09*	1,58 ± 0,14*/#

*- p<0,05 порівняно з контролем;
#- p<0,05 порівняно з групою тварин, яким вводили омепразол

У щурів, яким протягом 28 діб вводили омепразол активність глутатіонтрансферази в підшлунковій залозі зростала в 1,8 рази по відношенню до контролю. При одночасному введенні щурам мультипробіотика Симбітер та омепразолу глутатіонтрансферазна активність знижувалась в 1,6 відносно аналогічних показників "омепразолової" групи (табл. 2). Відомо, що експресія гена даного ензиму залежить від транскрипційного фактора NF-κB, який активується в умовах окисного стресу та під дією прозапальних цитокінів. Згідно даних літератури, при тривалому споживанні інгібіторів протонної помпи у підшлунковій залозі може розвиватись гострий панкреатит, для якого характерне порушення окисно-антиоксидантної рівноваги клітин органа (переважно екзокринної його частини). В таких умовах активація NF-κB є типовим явищем, що може пояснювати встановлене зростання активності глутатіонтрансферази.

Цілком узгоджується із вище наведеною думкою те, що супутнє введення мультипробіотика Симбітер корелює із зниженням активності глутатіонтрансферази до фізіологічного рівня. Бактерії, що входять до складу препарату, мають виражену протизапальну дію на ШКТ хазяїна [7], що сприяє відновленню окисно-антиоксидантної рівноваги підшлункової залози щурів, внаслідок чого стресові транскрипційні фактори гальмуються і концентрація глутатіонтрансферази знижується до фізіологічного рівня.

При тривалій шлунковій гіпохлоргідрії активність глутатіонредуктази у підшлунковій залозі знижувалась в 1,4 рази по відношенню до контролю. При введенні мультипробіотика Симбітер щурам з гіпоацидним станом активність глутатіонредуктази зростала в 2,1 рази порівняно з групою тварин, яким вводили лише омепразол (табл. 2). Зниження активності ензиму в умовах омепразол-індукованої моделі тривалої гіпоацидності свідчить про зменшення здатності клітин підшлункової залози підтримувати необхідний для нормального функціонування рівень відновленого глутатіону (GSH), оскі-

льки функцією глутатіонредуктази є відновлення GSSG до GSH за рахунок розщеплення НАДФН. В той же час, одночасне введення щурам мультипробіотика Симбітер корелювало із дуже високою активністю глутатіонредуктази, що свідчить про посилення здатності клітин до відновлення глутатіону.

Показано, що під дією омепразолу на 28 добу рівень відновленого глутатіона знижувався в 2,3 рази відносно контролю. У тварин, яким разом із омепразолом вводили мультипробіотик Симбітер, даний показник зростав в 1,7 рази у порівнянні із щурами, яким вводили лише омепразол (табл. 2). Зниження вмісту GSH в підшлунковій залозі щурів за умов тривалої гіпоацидності свідчить про розвиток окисного стресу в тканинах даного органа та окиснення SH-групи цистеїнового залишку молекули. Разом з тим, може мати місце інтенсифікація процесу S-глутатіонування білків, що виконує протекторну роль та здійснює редокс-регуляцію функції білків в умовах окисного стресу. Окрім того, падіння концентрації GSH може свідчити про активацію процесів глутатіон-залежного відновлення SH-груп ключових для виживання клітини білків. Підвищення вмісту GSH при введенні мультипробіотика Симбітер пов'язане з частковим відновленням редокс-статусу клітин підшлункової залози щурів та пригніченням вільнорадикальних процесів, що має сприяти нормальному функціонуванню органа в умовах гіпоацидного стану.

Отримані в роботі експериментальні дані свідчать про те, що омепразол призводить до зсуву окисно-антиоксидантного балансу в підшлунковій залозі в бік активації вільнорадикальних процесів, про що вказують зростання вмісту продуктів ПОЛ та зміни активності ключових ензимів системи антиоксидантного захисту. Це пояснюється тим, що при хронічній дії омепразолу відбувається стійке пригнічення активності H^+/K^+-АТФази парієтальних клітин шлунка, що призводить до гіпохлоргідрії та гіпоацидного стану. Зсув pH у лужний бік асоційований із недостатністю бактерицидних властивостей шлункового соку. При цьому має місце колонізація ШКТ умовно-патогенною мікрофлорою, що створює ендогенне джерело стійкої інфекції, внаслідок чого підшлункова залоза перебуває в умовах запалення.

Встановлена дія мультипробіотика Симбітер на показники окисно-антиоксидантного балансу у клітинах підшлункової залози щурів з гіпоацидним станом, може пояснюватись наступними фактами. Відомо, що деякі штами *L. casei* та *L. bulgaricus* здатні впливати на синтез прозапальних цитокінів, зокрема TNF-α [9]. Як наслідок, ні інфікування, ні запалення супутніх органів ШКТ не має розвиватися. Відповідно, при цьому не повинно відбуватися порушення мікроциркуляції в підшлунковій залозі і розвиток окисного стресу у панкреоцитах. Встановлено, що пробіотики індукують синтез відновленого глутатіона, який є важливим компонентом антиоксидантного захисту клітин від продуктів вільнорадикального окиснення [16]. Бактерії, що входять до складу мультипробіотика Симбітер, синтезують антиоксидантні ензими та вітаміни, які безпосередньо нейтралізують утворені АФК [10]. Наявність у складі досліджуваного мультипробіотика таких мікроелементів, як цинк, марганець, мідь, що входять до складу активних центрів ензимів антиоксидантної системи, сприяє більш ефективній роботі антиоксидантного захисту клітин. Також відомо, що пробіотичні бактерії синтезують екстрацеллюлярні полісахариди, які здатні знешкоджувати вільні радикали [14]. Таким чином, мультипробіотику Симбітер властивий широкий спектр антиоксидантних властивостей. Як показали проведені нами дослідження, при введенні мультипробіотика Симбітер спостерігалося зниження рівня продуктів ПОЛ, підвищення вмісту GSH, нормалізація активності антирадикальних та глутатіонзалежних ензимів, що повністю узгоджується із даним гіпотетичним механізмом дії мультипробіотика.

Висновки. Таким чином, за умов тривалого пригнічення секреції гідрохлоридної кислоти омепразолом спостерігається окисне пошкодження мембранного апарату клітин підшлункової залози щурів, що проявляється у підвищенні вмісту продуктів ПОЛ та зміні активності основних ензимів антиоксидантної системи. Встановлені зсуви окисно-антиоксидантної рівноваги у бік окисного стресу є підгрунтям для розвитку функціональних розладів у підшлунковій залозі.

Мультипробіотик Симбітер суттєво відновлює порушений про/антиоксидантний баланс у панкреоцитах щурів з гіпоацидним станом, що дає підстави рекомендувати його в якості ефективного засобу профілактики розвитку окисних пошкоджень клітин підшлункової залози в умовах тривалої гіпоацидності шлункового соку різного ґенезу.

1. Власова С.Н., Шабунина Е.И., Переслегина И.А. Активность глутатионзависимых ферментов эритроцитов при хронических заболеваниях печени у детей // Лаб. дело. – 1990. – Вып. 8. – С. 19–22. 2. Колесова О.Е., Маркин А.А., Федорова Т.Н. Перекисное окисление липидов и методы определения продуктов липопероксидации в биологических средах // Лабораторное дело. – 1984. – № 9. – С. 540-546. 3. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы // Лабораторное дело. – 1988. – Вып. 1. – С. 16-18. 4. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. // Современные методы в биохимии. – М.: Медицина, 1977. – С. 66-68. 5. Ускова М.А., Кравченко Л.В. Антиоксидантные эффекты молочнокислых бактерий – пробиотиков и йогуртовых заквасок // Вопросы питания. – 2009. – Т. 78(2). – С. 18-23. 6. Чевари С., Чаба И., Секей Й. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах // Лабораторное дело. – 1985. – Вып. 11. – С. 678–681. 7. Янковский Д.С., Дымент Г.С. Микрофлора и здоровье человека. – К.:ТОВ "Червона Рута-Турс". – 2008. – 552 с. 8. Янковский Д.С., Дымент Г.С. Мультикомпонентные пробиотики группы "Симбитер": итоги и перспективы биоконструирования и применения в клинической практике // Здоровье женщины. – 2006. – №3. – С.181-188. 9. Borruel N., Carol M., Casellas F. Increased mucosal TNE production in Crohn's disease can be downregulated ex vive by probiotic bacteria // Gut. – 2002. – Vol.51. – P.659-664. 10. Carroll I.M., Andrus J.M., Bruno-Bбrcena J.M. et al. Anti-inflammatory properties of Lactobacillus gasseri expressing manganese superoxide dismutase using the interleukin 10-deficient mouse model of colitis // Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. – 2007. – Vol. 293. – P. G729-G738. 11. Col C., Dinler K., Hasdemir O., Buyukasik O., Bugdayci G. Oxidative stress and lipid peroxidation products: effect of pinealectomy or exogenous melatonin injections on biomarkers of tissue damage during acute pancreatitis // Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International.– 2010. – Vol.9, №1. – P.78-82. 12. Jensen R.T. Consequences of long-term proton pump blockade: insights from studies of patients with gastrinomas // Basic & Clin. Pharmacol. & Toxicol. – 2006. – Vol. 98. – P. 4-19. 13. Kannan R., Tang D., Mackic J., et. al. A simple technique to determine glutathione (GSH) levels and synthesis in ocular tissues as GSH-bimane adduct: application to normal and galactosemic guinea-pigs // Exp. Eye. Res. – 1993. – Vol.56, №1. – P.45-50. 14. Kodali V.P., Sen R. Antioxidant and free radical scavenging activities of an exopolysaccharide from a probiotic bacterium // Biotechnol. J. – 2008. – Vol. 3(2). – P. 245-251. 15. Li X., Stark G. NF-kappa B-dependent signaling pathways // Exp. Hematol. – 2002. – Vol. 30, №4. – P. 285-296. 16. Lutgendorff F., Trulsson L.M., Minnen L.P. Probiotics enhance pancreatic glutathione biosynthesis and reduce oxidative stress in experimental acute pancreatitis // Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. – 2008. – Vol. 295. – P. G1111-G1121. 17. Martinsen T.C., Bergh K., Waldum H.L. Gastric juice: a barrier against infectious diseases // Basic Clin. Pharmacol. Toxicol. – 2005 – Vol. 96 (2). – P. 94-102. 18. Sundstrom A., Blomgren K., Alfredsson L., and Wiholm B.E. Acid-suppressing drugs and gastroesophageal reflux disease as risk factors for acute pancreatitis-results from a Swedish Case-Control Study // Pharmacoepidemiol. Drug Saf. – 2006. – Vol. 15(3). – P. 141-149. 19. Vasudevan P., Weiland R. Deactivation of catalase by hydrogen peroxide // Biotechnology and bioengineering. – 1990. – Vol.36, №9. – P. 783-789.

Надійшла до редколегії 03.01.12

УДК 577.112.7

К. Кубайчук, студ., Д. Мінченко, наук. співроб.,
О. Ратушна, асп., О. Мінченко, проф.

ВПЛИВ ГІПОКСІЇ ТА ІШЕМІЇ НА ЕКСПРЕСІЮ ПРОАНГІОГЕННИХ ГЕНІВ У КЛІТИНАХ ГЛІОМИ U87 З ПРИГНІЧЕННОЮ ФУНКЦІЄЮ ГЕНА ERN1

Встановлено, що пригнічення функції сенсорно-сигнального ензиму ERN1 (від ендоплазматичного ретикулуму до ядра-1), який контролює процеси апоптозу, ангіогенезу та росту злоякісних пухлин, різко знижує рівень експресії генів, відповідальних за активацію ангіогенезу: епірегуліну – EREG та гепарин-зв'язуючого фактора росту, подібного до епідермального фактора росту – HB-EGF, але підвищує – рецептора епідермального фактора росту (EGFR або ERBB) у клітинах гліоми лінії U87. За умов гіпоксії істотно знижується рівень мРНК як EREG, так і HB-EGF, але лише у нативних клітинах гліоми, а у клітинах з виключеною функцією ензиму ERN1 знижується експресія лише гена EREG. В той же час, рівень мРНК ERBB за цих експериментальних умов підвищується в обох типах клітин, але блокада функції ензиму ERN1 різко знижує ефект гіпоксії. Крім того, було показано, що дефіцит глутаміну та глюкози істотно не змінює рівень мРНК ERBB у нативних клітинах гліоми, а у клітинах з виключеною функцією сигнального ензиму ERN1 – збільшує. Разом з тим, експресія генів EREG та HB-EGF збільшується в обох типах клітин гліоми лінії U87 за умов дефіциту глутаміну, а дефіцит глюкози підвищує експресію цих генів лише в клітинах з пригніченою функцією ензиму ERN1. Таким чином, результати даної роботи свідчать про істотне зниження експресії проангіогенних генів EREG та HB-EGF у клітинах гліоми лінії U87 за умов блокади функції сенсорно-сигнального ензиму ERN1, а також про індукцію експресії цих генів за гіпоксії і ішемії та її залежність від функції сигнального ензиму ERN1.

It was shown that suppression of function of sensor and signaling enzyme ERN1 (endoplasmic reticulum – nuclei-1), which controls apoptosis, angiogenesis and tumour growth, deeply decreases the expression level of genes responsible for angiogenesis activation: epiregulin – EREG and heparin binding epidermal growth factor-like – HB-EGF, but increases epidermal growth factor receptor – EGFR or ERBB in glioma cell line U87. The expression level of EREG as well as HB-EGF essentially decreases in hypoxia in native glioma cells only, but in cells with ERN1 loss of function decreases the expression level of EREG mRNA only. At the same time, the expression level of ERBB mRNA increases in both cell types at this experimental condition, but blockade of ERN1 enzyme function decreases effect of hypoxia. Moreover, it was shown that expression level of ERBB mRNA does not change significantly in native glioma cells at glutamine and glucose deprivation conditions, but in cells with ERN1 loss of function – increases. However, EREG and HB-EGF mRNA expression level increases in both cell types in glutamine deprivation conditions, but glucose deprivation leads to increase of these mRNA expression level only in cells with ERN1 loss of function. Thus, results of this investigation clearly demonstrated that there is significant decrease in the expression level of mRNA pro-angiogenic genes EREG and HB-EGF in U87 glioma cells with sensor and signaling enzyme ERN1 loss of function as well as induction of these genes expression in hypoxia and ischemia in dependence from ERN1 enzyme function.

Вступ. Важливим фактором, що значною мірою визначає інтенсивність росту злоякісних пухлин, є гіпоксія, яка посилює експресію багатьох генів шляхом індукції транскрипційного фактора HIF для забезпечення проліферативних процесів, а також неоангіогенезу [1, 2]. Але у злоякісних пухлинах, як і за умов гіпоксії, індукується адаптивна реакція для виживання клітин, що представляє собою комплекс внутрішньоклітинних сигнальних подій на порушення згортання (фолдингу) протеїнів (Unfolded Protein Response) і їх накопичення у ендоплазматичному ретикулумі, які сприймаються трьома сенсорно-сигнальними системами: активуючого транскрипційного фактора 6 (ATF6), протеїнкінази ендоплазматичного ретикулуму (PERP) та ензиму ERN1 (від ендоплазматичного ретикулуму до ядра-1), який ще називають залежним від інозитолу ензимом-1альфа (IRE-1альфа) [3, 4]. Остання сенсорно-сигнальна система є найбільш важливою ключовою системою. Ензим ERN1 представляє собою трансмембранний протеїн, N-кінцева сенсорна частина якого знаходиться в люмені ендоплазматичного ретикулуму і є не лише сенсором стресу ендоплазматичного ретикулуму, а і медіатором порушення фолдингу протеїнів, а С-кінцева частина – у цитоплазмі [5]. С-кінцева частина ензиму ERN1 має дві каталітичні ділянки: серин/треонін кіназну та ендорибонуклеазну, які є складовими ERN1 сигнального шляху.

Встановлено, що зв'язування не згорнутих протеїнів із сенсорною ділянкою ERN1 ініціює його димеризацію та активацію серин/треонінової кінази, яка відповідає за аутофосфорилювання та димеризацію даного ензиму [5]. Димеризація ERN1 є надзвичайно важливим етапом в активації сигнальної системи ERN1, що індукує ендорибонуклеазний домен ERN1, а це, в свою чергу, ініціює альтернативний сплайсинг пре-мРНК транскрипційного фактора XBP1 (X-бокс зв'язуючого протеїну1), деградацію ряду мРНК та приводить до змін в JNK-сигналюванні [6]. Сплайс-варіант мРНК транскрипційного фактора XBP1, що експресується у відповідь на стрес ендоплазматичного ретикулуму, є меншим за розміром, але кодує синтез більшого за розміром фактора, який змінює експресію великої групи регуляторних генів шляхом зв'язування із специфічними сайтами у промоторних ділянках цих генів [7]. Гени, експресія яких контролюється сплайс-варіантом мРНК транскрипційного фактора XBP1, є відповідальними за згортання протеїнів та посилення виживання клітин в умовах гіпоксії, як і за їх знищення шляхом апоптозу. Разом з тим, є дані, що інгібітор кінази сигнального ензиму ERN1 може активувати ендорибонуклеазну активність ERN1 для захисту клітин в умовах стресу ендоплазматичного ретикулуму, що свідчить про певну незалежність активації ендорибонуклеазної активності ERN1 від його кіназної активності.

Відомо також, що ERN1 сигнальний каскад є важливим для індукованої ішемією експресії ендотеліального фактора росту судин A (VEGFA) і контролює ангіогенез та ріст злоякісних пухлин in vivo [8]. Дослідження, що були проведені на двох експериментальних моделях злоякісних пухлин (імплантація пухлини в мозок мишей та в ембріони курчат), показали, що ERN1 сигнальний шлях пов'язаний не лише з процесом неоваскукляризації і росту пухлин, а також і з процесом загибелі клітин [8]. Разом з тим, відсутні дані про роль численних проангіогенних та антиангіогенних факторів у пригніченні ангіогенезу за умов блокади функції ензиму EERN1.

Варто зазначити, що всі три сигнальні системи стресу ендоплазматичного ретикулуму представлені трансмембранними протеїнами, які здатні зв'язувати не згорнуті протеїни та шаперон BiP (GRP78, HSPA5) своєю сенсорною частиною, яка знаходиться в люмені ендоплазматичного ретикулуму. А в цитозольній частині цих сенсорних ензимів генеруються сигнали, що передаються до ядра і опосередковують відповідь клітини на стрес, яка може бути направлена як на виживання клітин, так і на їх загибель шляхом апоптозу [4 – 6]. Було також показано, що експресія шаперона GRP78 суттєво посилюється у відповідь на стрес ендоплазматичного

© Кубайчук К., Мінченко Д., Ратушна О., Мінченко О., 2012

ретикулуму. Незважаючи на те, що всі ці сигнальні системи реагують по-різному на окремі види стресу ендоплазматичного ретикулуму, вони не є ізольованими і тісно взаємодіють між собою, оскільки їх функціональна роль є спільною і полягає у зміні метаболізму клітини з метою її адаптації до умов стресу або знищення клітини. Разом з тим, стрес ендоплазматичного ретикулуму є одним із факторів, що забезпечує виживання клітин злоякісних пухлин в умовах гіпоксії та активує ріст пухлин [3, 4, 8].

Група генів, що забезпечують неоангіогенез та ріст злоякісних пухлин, є чисельною, але у даній роботі ми дослідили експресію трьох із них, епірегуліну (*EREG*), гепарин-зв'язуючого фактора росту, подібного до епідермального фактора росту (*HB-EGF*, відомого ще як рецептор дифтерійного токсину), та рецептора епідермального фактора росту (*EGFR, ERBB* або *HER1*), що є важливими в регуляції процесу ангіогенезу [9 – 13]. Було також показано, що гіпоксія змінює експресію HB-EGF та індукує ангіогенний тип ендотеліальних клітин, посилюючи експресію гена *PAR2* [10]. Було також встановлено, що активність HB-EGF у клітинах карциноми яєчника індукується його протеолітичним розщепленням металопротеїназою-1 [11]. Більше того, синтез HB-EGF контролюється позаклітинним ATP через P2 пуринергічні рецептори за участі протеїнкінази, що активується мітогеном (MAPK14, p38), та протеїнкінази ERK1/2 сигнальних шляхів [12].

Рецептор епідермального фактора є трансмембранним протеїном, що має тирозинкіназну активність і відноситься до родини ERBB (ErbB). Активація EGFR ініціюється зв'язуванням ліганду з наступною гомо- чи гетеро-димеризацією та аутофосфорилюванням внутрішньоклітинним кіназним доменом, що приводить до активації сигнального каскаду і відповідних змін в експресії генів та проліферації клітин [13].

Епірегулін є членом родини епідермального фактора росту і виявляється як у нормальних тканинах, так і у різних злоякісних пухлинах [14, 15]. Високий рівень експресії фактора росту EREG асоціюється з прогресією різних аденокарцином, в тому числі і гліом, а також утворенням метастазів. EREG зв'язується з EGF рецептором ERBB1 з меншою афінністю порівняно з EGF, але має більший мітогенний потенціал і виражено активує ERBB1-залежний сигнальний шлях [14].

Оскільки роль генів *EREG, HB-EGF* та *EGFR*, що контролюють процеси ангіогенезу та росту злоякісних пухлин, у функціонуванні ERN1-сигнального шляху детально не досліджувалась, то **метою даної роботи** було вивчити вплив гіпоксії та дефіциту глюкози або глутаміну на експресію генів *EREG, HB-EGF* та *EGFR*, а також їх роль у функціонуванні ERN1-сигнального шляху у клітинах гліом, найбільш злоякісних пухлин мозку, що дуже тяжко піддаються лікуванню і є найбільшою проблемою антипухлинної терапії.

Матеріали і методи досліджень. Дослідження проведено на клітинах гліоми лінії U87 та сублінії цих клітин з пригніченою експресією гена *ERN1*, яку було отримано в результаті селекції клонів, стабільно трансфекованих домінант-негативною конструкцією ERN1 у векторі pcDNA3.1+. Як контроль були використані клітини, стабільно трансфековані експресійним еукаріотичним вектором pcDNA3.1+. Клітини отримані від проф. Michel Moenner (Франція) [8]. Ефективність пригнічення функції ензиму ERN1 у клітинах гліоми, трансфекованих домінант-негативною конструкцією ERN1, було перевірено раніше [16]. Для вирощування клітин використовували середовище DMEM, що містило 10 % ембріональної сироватки телят, пеніцилін, стрептоміцин та глютамін, як описано [8]. При дослідженні впливу гіпоксії, клітини гліоми витримували протягом 16 годин в інкубаторі, у якому підтримували концентрацію кисню та диоксиду вуглецю на рівні 3 та 5 %, відповідно. В експериментах по вивченню впливу дефіциту глюкози або глутаміну до клітин гліоми лінії U87 додавали середовище без глюкози або без глутаміну для моделювання ефектів ішемії і витримували протягом 16 годин.

РНК із клітин гліоми виділяли за допомогою реагенту Трізол (Trizol; Invitrogen, США) згідно з протоколом виробника, як описано раніше [16]. Осаджували РНК рівним об'ємом 2-пропанолу. Осади РНК промивали двічі 75 % етанолом і розчиняли у воді, що не містить домішок рибонуклеаз.

Експресію генів *EREG, HB-EGF* та *EGFR*, а також бета-актину, як контрольного гена, досліджували методом кількісної полімеразної ланцюгової реакції (у реальному часі), яку проводили на апараті "Stratagene Mx 3000P cycler" (США), використовуючи ABsolute qPCR SYBR Green Mix (Thermo Scientific, Об'єднане Королівство) та специфічні для цих генів щура пари праймерів (Sigma, США). Для цього тотальну РНК із клітин гліоми використовували як матрицю для синтезу комплементарної ДНК (кДНК) за допомогою набору "QuaniTect Reverse Transcription" (QIAGEN, Німеччина), який забезпечував елімінацію можливих залишків геномної ДНК. Для цього РНК (1 мкг) спочатку короткочасно (протягом 2 хвилин) інкубували з буфером gDNA Wipeout, а потім з Quantiscript зворотною транскриптазою в присутності суміші праймерів (Primers mix) та буферу, що уже містив інгібітор рибонуклеаз і набір чотирьох дезоксирибонуклеотидів при 42^{o}C протягом 15 хвилин. Реакцію зупиняли прогріванням реакційної суміші при 95^{o}C протягом 3 хвилин, і отриману кДНК використовували для проведення кількісної полімеразної ланцюгової реакції.

Для проведення полімеразної ланцюгової реакції було використано такі пари праймерів: для епірегуліну (EREG): 5'- CGTGTGGCTCAAGTGTCAAT -3' і 5'-TGGAACCGACGACTGTGATA -3', які відповідали нуклеотидним послідовностям 341-360 та 575-556 кДНК EREG людини (GenBank номер NM_001432); для рецептора епідермального фактора росту (EGFR): 5'-GGTGCAGGAGAGGAGAACTG -3' і 5'-GGTGGCACCAAAGCTGTATT -3', які відповідали нуклеотидним послідовностям 847-866 та 1116-1097 кДНК EGFR людини (GenBank номер NM_005228) і для гепарин-зв'язуючого фактора росту, подібного до епідермального фактора росту (HB-EGF): 5'-GGTGGTGCTGAAGCTCTTTC -3' і 5'-GCTTGTGGCTTGGAGGATAA -3', які відповідали нуклеотидним послідовностям 293-312 та 520-501 кДНК HB-EGF людини (GenBank номер NM_001945). Розміри ампліфікованих фрагментів в парах нуклеотидних залишків: EREG – 235, EGFR – 270 та HB-EGF – 228.

Відносну кількість транскриптів EREG, HB-EGF та EGFR розраховували по рівню транскриптів бета-актину. Для ампліфікації бета-актину використовували такі праймери: прямий – 5'-GGACTTCGAGCAAGAGATGG -3' та зворотний – 5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG -3'. Прямий праймер починається із 704-го нуклеотидного залишку (5'–позиція), а зворотний – з 937-го нуклеотидного залишку (3'–позиція; GenBank номер X00351).

Для проведення кількісної полімеразної ланцюгової реакції використовували по три незалежно виділених препарати РНК. Аналіз результатів виконували за допомогою спеціальної комп'ютерної програми "Differential expression calculator", а статистичний аналіз – в Excel програмі.

Результати дослідження та їх обговорення

Як видно із даних, наведених на рис. 1, рівень експресії гена *EREG* у клітинах гліоми лінії U87, за даними кількісної полімеразної ланцюгової реакції, різко знижується за умов блокади функції ензиму ERN1 (сублінія клітин гліоми лінії U87 з надекспресією мутантного ERN1) порівняно з контрольними клітинами, які були трансфековані вектором pcDNA3.1+ без вставки. Рівень мРНК епірегуліну у клітинах гліоми також знижується у клітинах під впливом гіпоксії: як у контрольних клітинах гліоми (майже у 4 раза), так і у клітинах з пригніченою функцією сигнального ензиму ERN1. Дослідження експресії гена епірегуліну у клітинах гліоми за умов дефіциту глутаміну показало, що рівень мРНК EREG значно збільшується в обох типах клітин, використаних для цього дослідження: майже вдвічі у контрольних клітинах і більше ніж у сім разів у клітинах без ERN1 активності. В той же час, дефіцит глюкози протягом 16 годин істотно не змінює рівень експресії мРНК епірегуліну у контрольних клітинах гліоми, але майже у 5 разів підвищує рівень експресії цієї мРНК у клітинах з пригніченою функцією ензиму ERN1 (рис. 1).

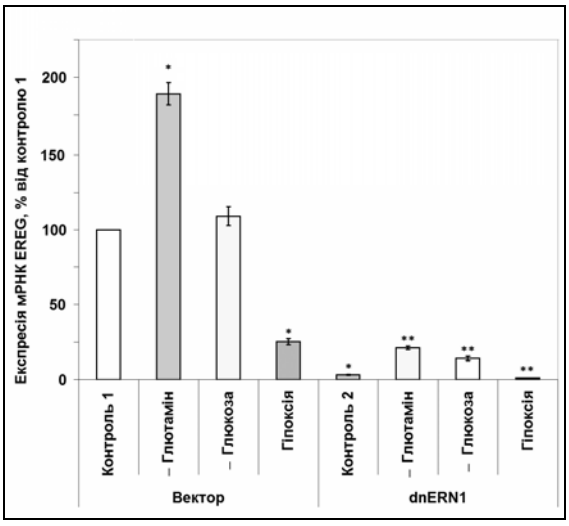


Рис. 1. Вплив гіпоксії та дефіциту глутаміну (– Глутамін) або глюкози (– Глюкоза) на рівень мРНК епірегуліну (EREG) у клітинах гліоми лінії U87, трансфекованих вектором pcDNA3.1 (Вектор) та сублінії цих клітин, трансфекованих домінант/негативною конструкцією сенсорно-сигнального ензиму ERN1 (від ендоплазматичного ретикулуму до ядра-1; dnERN1) у векторі pcDNA3.1

На рис. 1 – 3: Величину експресії генів *EREG, HB-EGF* та *EGFR* визначали за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції (у реальному часі) і нормалізували по рівню транскриптів бета-актину. Зміни в експресії генів *EREG, HB-EGF* та *EGFR* за гіпоксії (3 % кисню протягом 16 годин) та дефіциту глутаміну або глюкози (також протягом 16 годин) у цих клітинах порівнювали з контролем 1, прийнятим за 100 %; *n* = 4. Контроль 1 – це клітини, трансфековані вектором pcDNA3.1, а контроль 2 – клітини, трансфековані dnERN1; * – P < 0,05 порівняно з контролем 1, а ** – P < 0,05 порівняно з контролем 2.

Оскільки епірегулін має виражену проангіогенну дію, то виявлене нами різке зниження рівня експресії мРНК цього фактора у клітинах гліоми за умов блокади функції сигнального ензиму ERN1 узгоджується з даними літератури про роль ERN1 сигнального шляху в ангіогенезі та проліферації гліом [8, 17, 18]. Крім того, отримані нами дані свідчать про опосередкованість експресії гена епірегуліну сигнальним шляхом ERN1. Таким чином, різке зниження рівня експресії гена *EREG* за умов виключення основного сигнального шляху стресу ендоплазматичного ретикулуму шляхом блокади функції сигнального ензиму ERN1 може бути залученим до пригнічення ангіогенезу та росту злоякісних пухлин.

На рис. 2 представлено дані дослідження експресії гена гепарин-зв'язуючого фактора росту, подібного до епідермального фактора росту (*HB-EGF*) у клітинах гліоми. Показано, що блокада функції ензиму ERN1 приводить до багатократного (майже у 6 разів) зниження рівня мРНК HB-EGF. За умов гіпоксії рівень цієї мРНК пригнічується, але лише у контрольних клітинах гліоми, а у клітинах з пригніченою функцією ензиму ERN1 не виявлено істотних змін в експресії гена *HB-EGF*. В той же час, за умов дефіциту глутаміну у середовищі рівень мРНК HB-EGF значно збільшується в обох типах використаних для дослідження клітин гліоми лінії U87, але у контрольних клітинах ці зміни більш виражені порівняно з клітинами без ERN1 активності. Разом з тим, за умов дефіциту глутаміну у середовищі рівень експресії мРНК HB-EGF суттєво не змінюється в контрольних клітинах гліоми, а у клітинах з пригніченою функцією ензиму ERN1 збільшується майже у п'ять разів (рис. 2). Ці дані свідчать про те, що багатократне зниження рівня експресії мРНК проангіогенного гена *HB-EGF* у клітинах гліоми лінії U87 за умов блокади функції сенсорно-сигнального ензиму ERN1 може мати вагомий внесок у пригнічення ангіогенезу та росту злоякісних пухлин, що також узгоджується з даними інших авторів [8, 17].

Багатократне зниження експресії генів *EREG* та *HB-EGF* у сублінії клітин гліоми з заблокованою функцією ензиму ERN1, порівняно з контрольними клітинами, які були трансфековані вектором pcDNA3.1+ без вставки, узгоджується з даними інших авторів, які показали, що ERN1 сигнальний каскад є важливим для регуляції експресії А-форми ендотеліального фактора росту судин, що індукується ішемією, і контролює ангіогенез та ріст злоякісних пухлин in vivo і що пригнічення функції ERN1 істотно сповільнює їх ріст, зменшує рівень ендотеліального фактора росту судин та сповільнює ангіогенез [8]. І зменшення рівня експресії генів, що контролюють ангіогенез, у клітинах гліоми з пригніченою функцією сенсорного ензиму ERN1, безперечно вносить свій вагомий внесок в пригнічення ангіогенезу та росту злоякісних пухлин.

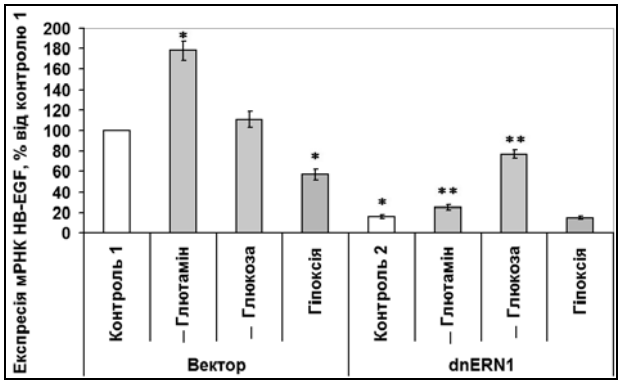


Рис. 2. Вплив гіпоксії та дефіциту глутаміну (– Глутамін) або глюкози (– Глюкоза) на рівень мРНК гепарин-зв'язуючого фактора росту, подібного до епідермального фактора росту (HB-EGF) у клітинах гліоми лінії U87, трансфекованих вектором pcDNA3.1 (Вектор) та сублінії цих клітин, трансфекованих dnERN1 у векторі pcDNA3.1

Результати дослідження експресії мРНК рецептора епідермального фактора росту у клітинах гліоми лінії U87 та в сублінії клітин гліоми з пригніченою функцією гена *ERN1* за умов гіпоксії та ішемії представлені на рис. 3. Показано, що рівень експресії мРНК рецептора епідермального фактора росту у клітинах гліоми лінії U87 з пригніченою функцією сенсорно-сигнального ензиму ERN1 збільшується на 17 % порівняно з контрольними клітинами, які були трансфековані вектором pcDNA3.1+ без вставки. В той же час, рівень експресії мРНК рецептора епідермального фактора росту суттєво не змінюється у контрольних клітинах гліоми за умов дефіциту глутаміну та глюкози, але збільшується у клітинах гліоми з пригніченою функцією сенсорно-сигнального ензиму ERN1. Показано також, що гіпоксія посилює експресію гена *EGFR* в обох типах досліджуваних клітин гліоми лінії U87, але ефект гіпоксії на рівень експресії цієї мРНК є значно більшим: +147 % в контрольних клітинах гліоми і +62 % у клітинах з пригніченою функцією ензиму ERN1, що переконливо свідчить про опосередкованість ефекту гіпоксії на експресію рецептора епідермального фактора росту сигнальною системою ензиму ERN1.

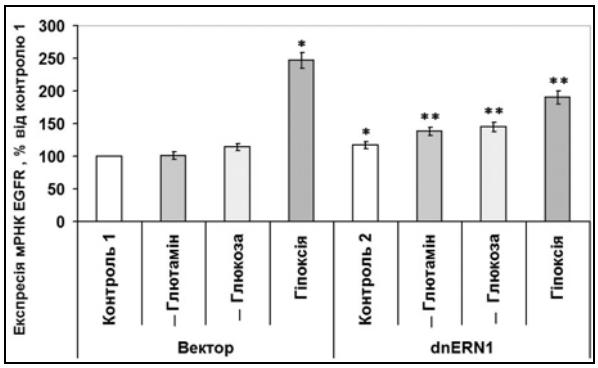


Рис. 3. Вплив гіпоксії та дефіциту глутаміну (– Глутамін) або глюкози (– Глюкоза) на рівень мРНК рецептора епідермального фактора росту (EGFR або ERBB) у клітинах гліоми лінії U87, трансфекованих вектором pcDNA3.1 (Вектор) та сублінії цих клітин, трансфекованих dnERN1 у векторі pcDNA3.1

Рецептор епідермального фактора росту задіяний у контролі процесів росту та диференціації клітин, ангіогенезу та проліферації, але його функції не є однозначними, про що свідчать його альтернативні назви: протеїн 61, що індукує проліферацію клітин (cell proliferation-inducing protein 61) та протеїн 40, що пригнічує ріст клітин (cell growth inhibiting protein 40) [13]. Крім того, відомо декілька альтернативних сплайс-варіантів EGFR, причому варіант 2 може діяти як антагоніст рецептора епідермального фактора росту.

Відомо, що гіпоксія та ішемія є вагомими чинниками стимуляції пухлинного росту і їх вплив на ріст злоякісних пухлин опосередковується адаптивною реакцією для виживання клітин, що є комплексом внутрішньоклітинних сигнальних подій, спрямованих на порушення згортання протеїнів і їх накопичення у ендоплазматичному ретикулумі, головним чином через сенсорну сигнальну систему фактора "від ендоплазматичного ретикулуму до ядра-1" [2, 17, 19]. У зв'язку з цим, отримані нами результати змін експресії генів *EREG, HB-EGF* та *EGFR*, що контролюють процеси ангіогенезу та росту клітин, за умов гіпоксії та ішемії розкривають деякі сторони механізму стимуляції росту пухлинних клітин за цих умов.

Результати даної роботи переконливо свідчать про істотні зміни в експресії генів, що активують ангіогенез, у клітинах гліоми за умов гіпоксії та ішемії, а також за умов пригнічення функції сенсорно-сигнального ензиму ERN1, причому величина ефекту як гіпоксії, так і дефіциту глутаміну або глюкози на експресію цих генів здебільшого залежить від функції ензиму ERN1.

Таким чином, експресія генів, що контролюють процеси ангіогенезу та проліферації, *EREG, EGFR* та *HB-EGF* є важливим фактором контролю росту злоякісних пухлин, а сповільнення їх росту за умов пригнічення функції ензиму ERN1 асоціюється з суттєвим зниженням рівня експресії генів *EREG* та *HB-EGF*, що вказує на залежність експресії цих генів від функціонування ERN1 сигнальної системи. Ці принципово нові дані щодо залежності змін в експресії генів, що контролюють ангіогенез та ріст пухлин, від функції сенсорно-сигнального ензиму ERN1 заслуговують на подальше поглиблене дослідження з метою пошуку можливих

терапевтичних мішеней для селективного блокування про-пухлинної активності IRE1 сигналінгу шляхом дизайну специфічних інгібіторів росту злоякісних пухлин.

Висновки.

1. Встановлено, що пригнічення функції сенсорно-сигнального ензиму ERN1 (від ендоплазматичного ретикулуму до ядра-1) у клітинах гліоми лінії U87 різко знижує рівень експресії генів, що активують ангіогенез: епірегуліну (*EREG*) та гепарин-зв'язуючого фактора росту, подібного до епідермального фактора росту (*HB-EGF*), але підвищує – рецептора епідермального фактора росту (*EGFR* або *ERBB*).

2. Показано, що за умов гіпоксії істотно знижується рівень мРНК як EREG, так і HB-EGF, але лише у нативних клітинах гліоми, а у клітинах з виключеною функцією ензиму ERN1 знижується рівень експресії лише мРНК EREG. В той же час, рівень мРНК ERBB за цих експериментальних умов підвищується в обох типах клітин, але блокада функції ензиму ERN1 різко знижує ефект гіпоксії.

3. Встановлено, що рівень мРНК EREG та HB-EGF збільшується в обох типах клітин гліоми лінії U87 за умов дефіциту глутаміну, а дефіцит глюкози підвищує рівень експресії цих мРНК лише в клітинах з пригніченою функцією ензиму ERN1. Разом з тим, дефіцит глутаміну та глюкози істотно не змінюють рівень мРНК ERBB у нативних клітинах гліоми, а у клітинах з виключеною функцією сигнального ензиму ERN1 – збільшують.

4. Результати даної роботи свідчать про істотне зниження рівня мРНК проангіогенних генів *EREG* та *HB-EGF* у клітинах гліоми лінії U87 за умов блокади функції сенсорно-сигнального ензиму ERN1, а також про індукцію експресії цих генів за гіпоксії та ішемії і її залежність від функції ензиму ERN1.

1. Johnson A. B., Denko N., Barton M. C. // Mutat. Res. – 2008. – Vol. 640. – P. 174 – 179. 2. Denko N. C. // Nature Reviews Cancer. – 2008. – Vol. 8. – P. 705 – 713. 3. Aragón T., van Anken E., Pincus D. et al. // Nature. – 2009. – 457, N 7230. – P. 736 – 740. 4. Fels D.R., Koumenis C. // Cancer Biology & Therapy. – 2006. – 5, N 7. – P. 723 – 728. 5. Korennykh A.V., Egea P.F., Korostelev A.A. et al. // Nature. – 2009. – 457, N 7230. – P. 687 – 693. 6. Hollien J., Lin J.H., Li H. et al. // J. Cell. Biol. – 2009. – 186, N 3. – P. 323 – 331. 7. Acosta-Alvear D., Zhou Y., Blais A. et al. // Molecular Cell. – 2007. – 27. – P. 53 – 66. 8. Drogat B., Auguste P., Nguyen D.T. et al. // Cancer Res. – 2007. – 67. – P. 6700 – 6707. 9. Tolino M.A., Block E.R., Klarlund J.K. // Biochim. Biophys. Acta. – 2011. – Vol. 1810, N 9. – P. 875-878. 10. Svensson K.J., Kucharzewska P., Christianson H.C. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2011. – Vol. 108, N 32. – P. 13147-13152. 11. Koshikawa N., Mizushima H., Minegishi T. et al. Cancer Sci. – 2011. – Vol. 10, N 1. – P. 111-116. 12. Giltaire S., Lambert S., Poumay Y. // J. Cell. Physiol. – 2011. – Vol. 226, N 6. – P. 1651-1659. 13. Inaba N., Fujioka K., Saito H. et al. // Anticancer Res. – 2011. – Vol. 31, N 10. – P. 3253-3257. 14. Citri A., Yarden Y. EGF-ERBB signalling: towards the systems level // Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. – 2006. – Vol. 7. – P. 505-516. 15. McIntyre E., Blackburn E., Brown P.J. et al. // Breast Cancer Res. Treat. – 2010. – Vol. 122. – P. 105-110. 16. Minchenko D.O., Karbovskyi L.L., Ratushna O.O. et al. // Nat. Sci. – 2012. – Vol. 4, N 1. – P. 21-30. 17. Moenner M., Pluquet O., Bouchecareilh M., Chevet E. // Cancer Res. 2007. – 67, N 22. – P. 10631 – 10634. 18. Auf G., Jabouille A., Guérit S. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2010. – Vol. 107, N 35. – P. 1555–15558. 19. Brahimi-Horn M.C., Chiche J., Pouysségur J. // J. Mol. Med. – 2007. – Vol. 85, N 12. – P. 1301 – 1307.

Надійшла до редколегії 03.01.12.

УДК 637.18:637.354

К. Пашук, асп., Г. Насирова, канд. біол. наук,

ВПЛИВ СОЄВОГО ІЗОЛЯТУ НА ПРОТЕОЛІЗ У СИРНОМУ ТІСТІ

Протеоліз відіграє основну роль у формуванні смаку і певної текстури сирів та сирних продуктів. Показано, що у сирних продуктах з ізолятом соєвих білків протеоліз казеїнів упродовж 45 діб визрівання відбувався менш інтенсивно, ніж у контрольних сирах, одночасно також гідролізувались білки сої. Додавання соєвого ізоляту при виробленні сирних продуктів призводило до зменшення рівня розчинного азоту відносно загального, а вміст вільних амінокислот у зрілих сирних продуктах був нижчим у 1,7 рази порівняно з контрольними сирами.

Proteolysis plays the major role in the development of the flavor and certain texture of most rennet-curd cheese varieties. It was confirmed that during 45 days of ripening proteolysis of caseins in cheese analogues with soy protein isolate was less extensive then in classic cheeses and soy proteins simultaneously hydrolyzed. During the cheesemaking period addition of soya isolate led to decries of the water-soluble nitrogen content relatively to total nitrogen content. The content of free amino acids experimental cheese analogues was 1,7 times lower as compared with the classic cheese.

Вступ. Наразі дедалі більшого поширення набуває введення ізолятів соєвих білків як замінників молочних при виробленні різноманітних сирних продуктів [7]. Це пояснюється технологічними властивостями білкових соєвих ізолятів, що мають високу емульгуючу здатність та властивість утримувати сироватку, завдяки чому в'язкість і щільність згустку при їх використанні вище, ніж при використанні сухого молока чи казеїнату натрію, доданих в еквівалентній кількості за білковим вмістом. Крім того, на відміну від соєвого молока, соєвий ізольований білок не містить таких "шкідливих" речовин, як інгібітор трипсину, а також характерних летких сполук, що обумовлюють специфічний неприємний бобовий присмак [1].

Важливим процесом, який відіграє головну роль у формуванні смаку і певної текстури сирів та сирних продуктів, є протеоліз. Було показано, що низький ступінь протеолізу казеїнів при визріванні сирного тіста впливає на консистенцію і може спричиняти таку ваду сиру, як кришливість, а високий – навпаки, призводить до мажучої консистенції готового продукту [2]. Вільні амінокислоти та низькомолекулярні пептиди, що утворюються при розкладанні білків сирного тіста і становлять пул розчинних азотовмісних сполук, обумовлюють основні смакові характеристики сирів [4].

Метою роботи було дослідження особливостей протікання основних біохімічних процесів, зокрема, протеолітичних, при введенні білкового соєвого ізоляту у сирну масу.

Матеріали і методи. Об'єктами досліджень були сирні продукти, які виробляли за технологією твердого сичужного сиру з низькою температурою другого нагрівання "Костромський" із застосуванням заквашувального бактеріального препарату (вир. "Углич"), що містив культури лактобактерій видів *L. lactis, L. cremoris, L. diacetilactis,* а також виду *Leuconostoc mesenteroides* (в подальшому, *Leuconostoc*). Одночасно виробляли контрольні сири без рослинного компоненту.

Як вихідну сировину використовували коров'яче незбиране молоко, в яке додавали соєвий ізолят у кількості 30% від загального вмісту білка. Соєвий ізолят розчиняли безпосередньо у коров'ячому молоці та суміш піддавали пастеризації за температури 72°С.

Масову частку загального та розчинного азоту визначали за методом К'єльдаля [6], фракційний склад білків методом електрофорезу у поліакриламідному гелі за методом Лемлі [3], визначення активної кислотності (pH) – згідно з ГОСТ 26781 [5], визначення загального амінокислотного складу та складу вільних амінокислот – на амінокислотному аналізаторі "Biotronik LC 2000".

Результати та їх обговорення. Суттєві відмінності у фізико-хімічних процесах в залежності від варіанту сировини було виявлено вже на перших етапах виготовлення сирів. Процеси зсідання молочної сировини та утворення сирного зерна у варіантах з соєвим ізолятом протікали повільніше, ніж у контролі, сирне зерно було більш дрібним та м'яким. Кислотність сироватки на по-

© Пашук К., Насирова Г., 2012

чаткових стадіях виготовлення сирів – утворення згустку, становлення сирного зерна та перед формуванням сиру, – була вищою на 2-4°Т від контрольних варіантів.

Після пресування дослідний сирний продукт мав меншу вологість та більш низьку активну кислотність, ніж контрольний. Вміст білка у ньому був більш високий, при цьому кількість розчинних азотовмісних сполук була майже удвічі меншою, ніж у контролі (табл. 1).

***Таблиця* 1. Фізико-хімічні та біохімічні показники сирного тіста після пресування**

Показник	Контрольний сир	Сирний продукт із соєвим ізолятом
Активна кислотність, од. pH	5,75 ± 0,02	5,64 ± 0,02
Масова частка сухих речовин, %	50,09 ± 0,05	51,16 ± 0,05
Масова частка загального азоту*, %	6,09 ± 0,08	6,67 ± 0,06
Масова частка загального білка*, %	38,85 ± 0,51	42,57 ± 0,38
Масова частка загального розчинного азоту*, %	0,256 ± 0,010	0,225 ± 0,013
Відносний вміст розчинного азоту, %	4,20	3,37

* у перерахунку на сухі речовини

Через 45 діб зрілі сирні продукти з 30% соєвою домішкою мали щільну консистенцію і рисунок, характерний для сирів з низькою температурою другого нагрівання. Хоча смак та запах дослідних продуктів був менш виражений, ніж контрольних, але неприємних присмаків, притаманних сої, не відзначено.

Показники активної кислотності зрілих сирних продуктів були дещо нижчими (на 0,02 од. pH),ніж контрольних сирів, а масова частка сухих речовин була на 3,3% вищою порівняно з контрольним варіантом (табл. 2).

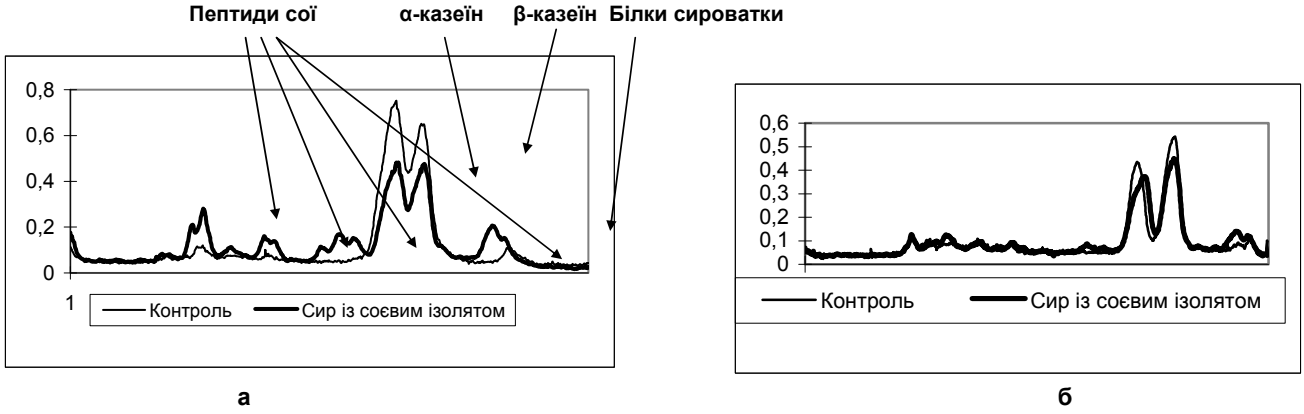
***Таблиця* 2. Фізико-хімічні та біохімічні показники зрілих сирних продуктів**

Показник	Контрольний сир	Сирний продукт із соєвим ізолятом
Активна кислотність, од. pH	5,15 ± 0,05	5,13 ± 0,03
Масова частка сухих речовин, %	58,18 ± 0,21	60,11 ± 0,13
Масова частка загального азоту*, %	6,00 ± 0,14	6,85 ± 0,10
Масова частка загального білка*, %	38,28 ± 0,89	43,70 ± 0,64
Масова частка загального розчинного азоту*, %	1,048 ± 0,12	0,842 ± 0,05
Відносний вміст розчинного азоту, %	17,47	12,29

* у перерахунку на сухі речовини

Як можна бачити, у зрілому сирному продукті із соєвим ізолятом масова частка загального білка була у середньому на 14,2% вищою від контрольного варіанту. Однак, якщо вміст загального розчинного азоту відносно загального азоту у сирній масі після пресування складав 3,37% у досліді та 4,20% у контролі, через 45 діб визрівання цей показник збільшився у досліді в 3,65 разів, тоді, як у контролі – в 4,16 разів.

Особливості протікання протеолітичних процесів при визріванні сирних продуктів досліджували, аналізуючи фракційний склад білків на етапі після пресування та у зрілих сирних продуктах (рис. 1).



а б

Рис. 1. Денситограма білків сирних продуктів, вироблених з додаванням соєвого ізоляту та контрольних сирів:
а – після пресування; б – 45 діб визрівання

За отриманими даними, у контрольних сирах сумарний вміст казеїнів після пресування становив 83,5% від загального вмісту білків, під час визрівання вміст казеїнів зменшувався на 15,2%, переважно за рахунок розщеплення α-казеїну.

У дослідних сирних продуктах після пресування сумарний вміст казеїнів дорівнював 52,9% від загального вмісту білків, а у зрілих сирах – 60,7%. При цьому протеоліз казеїнів відбувався менш інтенсивно, ніж у контролі, одночасно упродовж визрівання активно гідролізувались також білки соєвого ізоляту.

Додавання соєвого компоненту до молочної сировини відбивалось на накопиченні вільних амінокислот. Зміни у спектрі вільних амінокислот на початку (після пресування) та наприкінці визрівання (через 45 діб) досліджуваних сирних продуктів надано у табл. 3.

***Таблиця* 3. Динаміка вмісту вільних амінокислот у сирних продуктах та контрольних сирах типу "Костромський" (мг/100 г сиру)**

Амінокислота	Сири після пресування		Зрілі сири	
	Контроль	Сирний продукт	Контроль	Сирний продукт
Треонін	-	-	27,168	14,085
Валін	-	0,159	6,189	2,883
Метионін	-	-	0,954	0,306
Лейцин	0,297	0,696	42,063	20,067
Фенілаланін	0,426	0,738	50,619	28,218
Лизин	8,4	15,615	22,932	16,446
Глутамінова кислота	20,124	31,428	51,156	35,385
Пролін	9,444	12,327	16,587	11,163
Аланін	-	-	8,43	4,581
Аспарагінова кислота	0,945	0,387	3,105	0,411
Тирозин	6,429	9,075	37,281	28,551
Гістидин	2,409	3,78	32,217	16,14
Сумарна кількість вільних амінокислот: з них незамінних:	48,474 9,123	74,205 17,208	298,701 149,925	178,236 82,005

З наведених даних можна бачити, що вміст вільних амінокислот, низький на початку визрівання, значно збільшувався у зрілих продуктах: у дослідному варіанті з соєвим ізолятом у 2,4 рази, а у контрольному – у 6,2 рази порівняно з етапом після пресування. При цьому у зрілих сирних продуктах рівень вільних амінокислот був нижчим у 1,7 рази, а вільних незамінних амінокислот – у 1,8 рази, порівняно з контрольними сирами. Це відбивалось на менш вираженому смаку зрілих сирних продуктів.

Висновки. Додавання соєвого ізоляту при виробленні сирних продуктів за технологією твердого сичужного сиру "Костромський" уповільнювало процеси зсідання молочної сировини та утворення сирного зерна, яке було більш дрібним та м'яким.

Масові частки сухих речовин та загального білка, показники активної кислотності у зрілих сирних продуктах майже не відрізнялись від контролю, тоді, як відносний вміст розчинного азоту був нижчий на 17,7% від контрольних сирів. При цьому рівень вільних амінокислот у зрілих сирних продуктах був нижчим у 1,7 рази, а вільних незамінних амінокислот – у 1,8 рази порівняно з контрольними сирами.

У сирних продуктах упродовж визрівання протеоліз казеїнів відбувався менш інтенсивно, ніж у контрольних сирах, одночасно також гідролізувались білки соєвого ізоляту.

1. Atia M., Wenshui X., Guonong Z. Effect of soy protein supplementation on the quality of ripening Cheddar-type cheese // Intern. J. Dairy Technology. – 2004. – V. 57, I. 4 – P. 209. 2. Fenelon M.A., O'Connor P., Guinee T.P. The effect of fat content on the microbiology and proteolysis in Cheddar cheese during ripening // J. Dairy Science. – 2000. – V. 83. – P. 2173-2183. 3. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. – 1970. – v.227. – P.680-685. 4. Гудков А.В. Сыроделие: технологические, биологические и физико-химические аспекты. – 2003. – С. 47-56. 5. ГОСТ 26781-85 Молоко. Метод измерения pH. 6. ДСТУ ISO 968:2006 Молоко. Визначення вмісту азоту. 7. Зобкова З.С., Фурсова Т.П., Мырив В.Н. Молочные продукты с соевым белком // Молочная промышленность. – 1996. – № 7. – С. 17-20.

Надійшла до редколегії 27.01.12

УДК 612.017.2+612.273+612.766.1:796

О. Лисенко, канд. біол. наук

ВПЛИВ КОНЦЕНТРАЦІЇ CO_2 І O_2 НА СТРУКТУРУ ДИХАЛЬНОЇ РЕАКЦІЇ ЗА УМОВ ФІЗИЧНИХ НАВАНТАЖЕНЬ РІЗНОГО ХАРАКТЕРУ

Представлені результати дослідження особливостей впливу концентрації CO_2 і O_2 на структуру дихальної реакції організму та ефективності діяльності дихальної системи за умов фізичних навантажень різного характеру енергозабезпечення.

The results of study of the influence of CO_2 and O_2 on the structure of the respiratory reactions and the efficiency of the respiratory system of physical loads having different energy-supply character.

Вступ. Напружене фізичне навантаження характеризується вираженими гіпоксичними явищами в організмі. Регулярна повторюваність реакцій компенсації гіпоксії в процесі ряду років спортивного тренування певним чином змінює загальну реакцію організму на дію різних факторів. Специфіка умов конкретного виду м'язової діяльності чітко відображається на рівні і динамічних характеристиках реакції кардіореспіраторної системи (КРС) на дію гіперкапнической і гіпоксичних зрушень дихального гомеостазису як у стані спокою, так і в умовах напружених фізичних навантажень [1, 3, 6, 7, 10, 11]. Як відомо, управління легеневою вентиляцією здійснюється в основному завдяки стимуляції із медулярних і артеріальних хеморецепторів, що приводять об'єм дихання згідно з метаболічними потребами організму [2, 8, 9, 11]. Під час фізичного навантаження співвідношення, встановлені для умов відносного спокою, різко порушуються, а також змінюється порівняльний внесок цих зрушень у формування рівня легеневої вентиляції і дуже різноманітна послідовність їх прояву в процесі розвитку вентиляторної відповіді на м'язову діяльність різного характеру. На сьогоднішній час не достатньо досліджень змін внеску дихального об'єму та частоти дихання в формування рівня легеневої вентиляції за умов фізичних навантажень, а також залежності структури дихальної реакції від співвідношення аеробних та анаеробних гліколітичних процесів в енергозабезпеченні фізичного навантаження.

Мета роботи полягала у визначенні впливу концентрації CO_2 і O_2 на структуру дихальної реакції організму, а саме, на співвідношення дихального обєму і частоти дихання у формуванні рівня легеневої вентиляції умов фізичних навантажень різного характеру енергозабезпечення.

Об'єкт і методи. Дослідження проводилися в лабораторних умовах в змагальному періоді підготовки за участю 319 кваліфікованих спортсмена (КМС-МС), які тривалий час спеціалізувалися в обраному виді спорту (легка атлетика, триатлон, веслування на байдарках и каное, веслувальний слалом, баскетбол, хокей, біатлон, лижні гонки та ін.). Використовувався діагностичний ергоспірометричний комплекс "Oxycon Pro" ("Jager", Німеччина). Досліджувалися показники газообміну, зов-

© Лисенко О., 2012

нішнього дихання, центральної гемодинаміки, ацидемічних зрушень крові і фізичної працездатності спортсменів за умов тестового навантаження. Як модель навантаження "змішаного" (аеробного і анаеробного) енергозабезпечення використовували тестове навантаження ступенезростаючої потужності тривалістю 14-20 хвилин до моменту досягнення індивідуальних меж споживання O_2 (рівень "критичної" потужності) – до моменту "довільної відмови від роботи" [3, 4, 8, 10, 11]. Тест виконувався на тредмілі LE-200 C (Німеччина) при постійній швидкості руху і при постійній зміні потужності (кожні 2 хвилини) на 17 Вт.

В реальному масштабі часу (breath by breath) визначали основні характеристики реакції КРС: легеневу вентиляцію (V_E), частоту дихання (f_T), дихальний об'єм (V_T), концентрацію CO_2 і O_2 у видихуваному (F_EO_2, F_ECO_2) і в альвеолярному повітрі (F_AO_2, F_ACO_2), споживання O_2 (VO_2), виділення CO_2 (VCO_2), газообмінне відношення ($RQ=VCO_2 \cdot VO_2^{-1}$), вентиляційні еквіваленти для O_2 ($EQO_2=V_E \cdot VO_2^{-1}$) і для CO_2 ($EQCO_2=V_E \cdot VCO_2^{-1}$), кисневий пульс ("$O_2$-пульс"$=VO_2 \cdot ЧСС^{-1}$) та ін. З огляду на те, що виміри проводилися у відкритій системі, показники зовнішнього дихання приведені до умов BTPS, а газообміну – до умов STPD. Статистичне опрацювання результатів проводили з використанням комп'ютерної програми "Microsoft Excel" з визначенням основних статистичних показників.

Тестування проводилося після дня відпочинку при стандартизованому режимі харчування і питного режиму. Спортсмени були інформовані про зміст тестів і дали згоду на їхнє проведення.

Результати та їх обговорення. При зіставлені динаміки основних характеристик структури дихальної рекції (легеневої вентиляції – V_E, дихального обєму – V_T, частоти дихання – f_T) та концентрацій O_2 і CO_2 в кінці видиху ($F_{ET}O_2$, $F_{ET}CO_2$, %) при однакових рівнях механічної потужності фізичної работи (W, Вт) за умов виконання навантаження ступенезростаючої потужності у кваліфікованих спортсменів виявлені певні відмінності, що пов'язані з характером ацидемічних зрушень внутрішнього середовища організму та з різним співвідношення аеробних і анаеробних процесів в енергозабезпеченні на різних рівня потужності тестового навантаження. Так, як видно з рис. 1., для $F_{ET}O_2$ на початку роботи відмічається поступове зниження внаслідок збільшення ефективності утилізації O_2 із альвеолярного повітря до рівня порогу аеробного обміну (точка порогу аеробного обміну – АП на рис. 1.). З підвищенням в енергозабезпеченні фізичної роботи внеску анаеробних гліколітичних процесів (після перевищення рівня порогу аеробного обміну – АнП) відмічається поступове підвищення $F_{ET}O_2$, що можливо пов'язано з збільшення компенсаторної гіпервентиляції. Вважають, що гранично інтенсивна робота викликає відносну гіпервентиляцію і може навіть підвищити O_2 в альвеолярному повітрі, збільшуючи тим самим альвеолярно-артеріальний градієнт [1, 6, 7-9, 11]. При цьому відмічається збільшення вентиляційного еквіваленту для O_2, який свідчить про зниження ефективність легеневої вентиляції.

Для концентрації CO_2 в кінці видиху ($F_{ET}CO_2$, %) під час виконання тривалої фізичної роботи з поступовозростаючою потужністю відмічається протилежна динаміка. Як видно на рис. 1. на початку роботи в аеробній зоні до рівня порогу аеробного обміну (АП) відмічається поступове підвищення $F_{ET}CO_2$, що може відображати поступове підвищення в енергозабезпеченні активності анаеробних гліколітичних процесів і як результат збільшення поступового виведення "не метаболічного" CO_2 із організму (підвищення рівня VCO_2) при адекватному підвищенню рівню легеневої вентиляції, тому і не відмічається в цей період збільшення вентиляційного еквіваленту для CO_2. В подальшому відмічається стабілізація величини $F_{ET}CO_2$ в зоні ізокапнічного буферування.

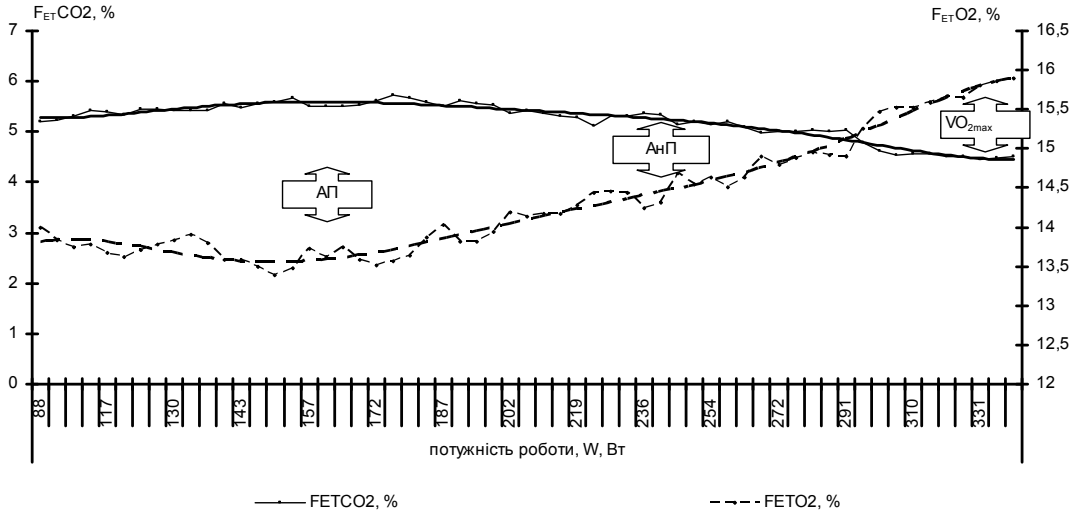


Рис. 1. Динаміка концентрації O_2 ($F_{ET}O_2$, %) і CO_2 ($F_{ET}CO_2$, %) в кінці видиху при однакових рівнях механічної потужності фізичної работи (W, Вт) за умов виконання фізичного навантаження ступенезростаючої потужності у кваліфікованих спортсменів: АП –аеробний поріг, АнП –анаеробний поріг, VO_{2max} – досягнення максимального рівня споживання кисню

Після перевищення порогу анаеробного обміну (АнП) при подальшому підвищенні активності анаеробних гліколітичних процесів із збільшенням інтенсивності фізичного навантаження відмічається зниження $F_{ET}CO_2$. Як уже зазначалося зі збільшенням потужності фізичної роботи спостерігається прогресивний приріст виділення CO_2, як метаболічного, так і "неметаболічного" походження, що утворився при буферированні ацидемічних зрушень в організмі, пов'язаних з утворенням молочної кислоти. Зменшення концентрації CO_2 є результатом різкого збільшення рівня легеневої вентиляції внаслідок прогресуючого ступеню ацидозу, що приводить до *збільшення хеморецепторної стимуляції, збільшення активності артеріальних хеморецепторів.* Зниження pCO_2 можна розглядати як стійкий компенсаторний механізм підтримання кислотно-лужного стану крові у відповідь на надходження в кров лактату, що підтримує концентрацію водородних іонів на

високому рівні. К*омпенсаторна гіпервентиляція* приводить до виведення CO_2 через легені, що спричинює вимивання CO_2 із організму, що приводить до зниження ємкості бікарбонатної буферної системи, підвищення pH при деякому зниженні $PaCO_2$, збільшення дефіциту буферних основ, тобто розвитку респіраторного алкалозу та розвитку рухової гіпокапнії, яку вважають лімітуючим фактором фізичної працездатності і функцій кардіореспіраторної системи [1, 5, 6, 9, 10]. Зріст рівня легеневої значно більший ніж рівень виведення CO_2, що відображається на збільшенні вентиляційного еквіваленту для CO_2 в цей період фізичної роботи.

Вміст CO_2 в альвеолярному повітрі змінюється не однонаправлено, оскільки його виділення із організму залежить від рівня газообміну і від розмірів буферування молочної кислоти в бікарбонатній системі крові. Зв'язування молочної кислоти бікарбонатами приводить к виділенню додаткового по відношенню до даного метаболічного рівня кількості CO_2 і появі при навантаженнях середньої інтенсивності незначної гіперкапнії, а потім, в міру збільшення інтенсивності фізичного навантаження і появі некомпенсованого метаболічного ацидозу – гіпокапнії, як наслідок надлишкової легеневої вентиляції (гіпервентиляції). Деякі автори розглядають залежність V_E-$F_{ET}CO_2$ як відображення двох компонентів реакції, спрямованої на виведення надлишку CO_2 з організму [5]: 1) *метаболічного* – збільшення F_ECO_2 при відносно невеликому рівні легеневої вентиляції; 2) *вентиляторного* – збільшення рівня легеневої вентиляції при низьких значеннях CO_2. Таким чином, концентрація O_2 і CO_2 в конці видиху ($F_{ET}O_2$, $F_{ET}CO_2$, %) відображає ацидемічні зрушення внутрішнього середовища організму при напруженому фізичному навантаженні з різним співвідношення аеробних і анаеробних процесів в енергозабезпеченні. При цьому, виявлено пряма залежність концентрації O_2 в конці видиху від потужності тестового навантаження ($r=0,919$, $p<0,05$) та негативна залежність для концентрації CO_2 в конці видиху ($r=-0,808$, $p<0,05$).

В подальшому було проаналізовано особливості впливу змін $F_{ET}CO_2$ та $F_{ET}O_2$ на основні параметри діяльності дихальної системи. На рис. 2. представлена динаміка рівня легеневої вентиляція, дихального обєму та частоти дихання, що характеризують зміни в структурі дихальної реакції у кваліфікованих спортсменів за умов виконання фізичної роботи ступенезростаючої потужності, що моделює різне співвідношення аеробних та анаеробних процесів в енергозабезпеченні при різних рівнях потужності.

При співставленні даних представлених на рис. 1. та на рис. 2. звертає на себе увагу можливість виділення різних періодів навантаження (фаз), що характеризуються різним ступенем приросту основних параметрів діяльності кардіореспіраторної системи, який можна охарактеризувати кутом нахилу (табл. 1.).

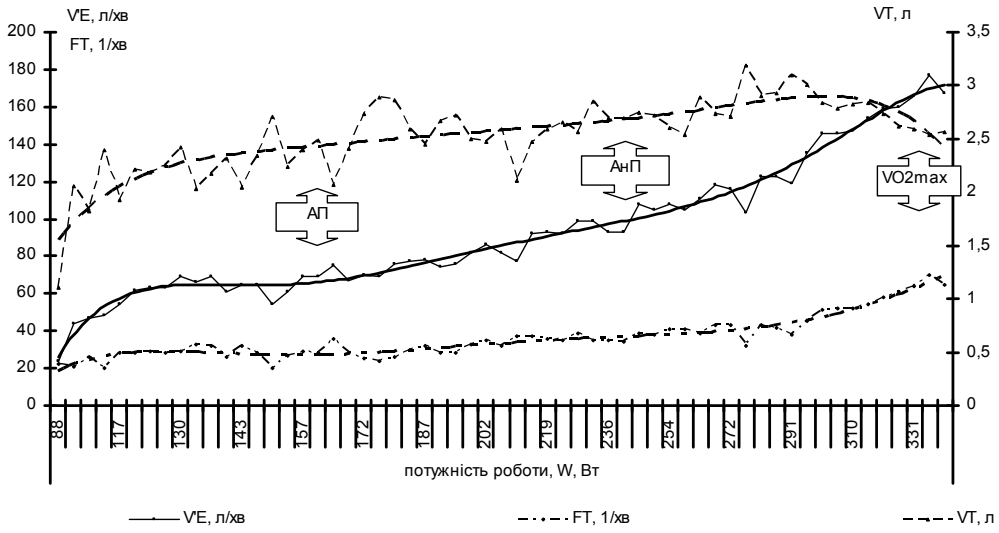


Рис. 2. Динаміка рівня легеневої вентиляції (V_E, л·хв$^{-1}$), дихального обєму (V_T, л) і частоти дихання (f_T, хв$^{-1}$) при однакових рівнях механічної потужності фізичної работи (W, Вт) за умов виконання навантаження ступенезростаючої потужності у кваліфікованих спортсменів: АП –аеробний поріг, АнП –анаеробний поріг, VO_{2max} – досягнення максимального рівня споживання кисню

***Таблиця* 1. Періоди фізичної роботи, що характеризуються різним приростом основних параметрів функціонування кардіореспіраторної системи**

Період	Характеристика періоду	Зміни основних характеристик КРС
1	Період на початку роботи, що характеризується стрімким збільшенням показників фізіологічної реакції	значний приріст рівня легеневої вентиляції (52^0), дихального об'єму ($57,5^0$), частоти дихання (26^0) змін по величині $F_{ET}O_2$ та $F_{ET}CO_2$ не відмічається
2	Період відносно стійкого стану, що характеризується стабільністю, невеликою варіативністю фізіологічних показників	не змінюється рівень легеневої вентиляції (0^0), зменшення частоти дихання (-4^0), приріст дихального об'єму ($8,5^0$). збільшення $F_{ET}CO_2$ (9^0), зниження $F_{ET}O_2$ (-13^0), що свідчить про розвиток гіперкапнії в цей період виконання фізичної роботи.
3	Період постійного поступового збільшення фізіологічних показників	приріст рівня легеневої вентиляції (17^0) в основному за рахунок продовження збільшення величини дихального об'єму ($8,5^0$) та початку збільшення частоти дихання (7^0). збільшення $F_{ET}O_2$ (19^0), зниженням $F_{ET}CO_2$ (-6^0).

Закінчення табл. 1

Період	Характеристика періоду	Зміни основних характеристик КРС
4	Період стрімкого збільшення фізіологічних показників	після значного зниження $F_{ET}CO_2$ (-12^0) відмічається різке збільшення дихального об'єму (12^0), збільшення $F_{ET}O_2$ (32^0), рівня легеневої вентиляції (37^0). не значний приріст частоти дихання (7^0).
5	Період, який може характеризуватися як стабільністю параметрів фізіологічних показників і/або їх зниження	при досягненні біля максимальних рівнів споживання O_2 відмічається подальше збільшення рівня легеневої вентиляції, але вже за рахунок приросту частоти дихання (25^0). В період, коли відмічається значне збільшення частоти дихання величина дихального об'єму після короткого стійкого стану починає вірогідно знижуватися (31^0).

Слід відмітити, що зміни рівня легеневої вентиляції співпадають зі змінами $F_{ET}O_2$, змінам величини дихального об'єму передують зміни $F_{ET}CO_2$, а змінам частоти дихання – зміни $F_{ET}O_2$. Звертає на себе увагу різна ступінь змін $F_{ET}O_2$, $F_{ET}CO_2$ при тестових навантаженнях різного характеру енергозабезпечення, що можливо і зумовлює різний їх вплив на діяльність дихальної системи. Так, за умов фізичної роботи ступінчатозростаючої потужності відмічається збільшення $F_{ET}CO_2$ та зменшення $F_{ET}O_2$ в аеробній зоні виконання фізичної роботи, а також зменшення $F_{ET}CO_2$ та збільшення $F_{ET}O_2$ із збільшенням в енергозабезпеченні анаеробних гліколітичних процесів. Більш виражені зміни для концентрації CO_2 у кінці видиху ніж для концентрації O_2. Так, $F_{ET}CO_2$ змінюється від початкового рівня на 28,16% – 67,83%, а зміни $F_{ET}CO_2$ в межах 2,03% – 8,19%. Більша величина змін для концентрації CO_2 можливо залежить від змін рівня активності анаеробних гліколітичних процесів в енергозабезпеченні та механізмів компенсації прогресуючого ацидозу, а концентрація O_2 – більш постійна величина і, можливо в більшій мірі впливає за умов роботи ступенезростаючої потужності на зміни основних параметрів дихальної реакції.

Аналіз змін величини коефіцієнтів парної кореляції для рівня легеневої вентиляції свідчить про поступове збільшення взаємозв'язку V_E з $F_{ET}O_2$ і $F_{ET}CO_2$ від умов навантаження малої інтенсивності ($F_{ET}O_2$ r=0,302, $F_{ET}CO_2$ r=-0,112, p<0,05) до умов максимальної реалізації аеробних можливостей ($F_{ET}O_2$ r=0,607, $F_{ET}CO_2$ r=-0,593, p<0,05). Тобто, більш високим значенням рівня легеневої вентиляції відповідають більш низькі значення $F_{ET}CO_2$, що пояснюється тим, що чим вище рівень легеневої вентиляції при роботі з однаковим рівнем метаболізму, тим нижче $F_{ET}CO_2$.

Різні за характером закономірності виявлені для величини дихального об'єму та частоти дихання. Так, для величини дихального об'єму за умов стану відносного спокою та навантажень аеробного характеру відмічається найбільший взаємозв'язок з $F_{ET}CO_2$ (r = 0,402, p<0,05), а також з $F_{ET}O_2$ (стан відносного спокою r=-0,206, на рівні порогу аеробного обміну r=0,491, p<0,05). Для частоти дихання відмічаються обернені закономірності – поступове збільшення взаємозв'язку f_T з $F_{ET}O_2$ і $F_{ET}CO_2$ від стану відносного спокою ($F_{ET}O_2$ r=0,258, $F_{ET}CO_2$ r=-0,287, p<0,05) до умов максимальної реалізації аеробних можливостей ($F_{ET}O_2$ r=0,678, $F_{ET}CO_2$ r=-0,528, p<0,05). При цьому, для величини дихального об'єму відмічається пряма залежність з $F_{ET}CO_2$ та обернена для $F_{ET}O_2$, а для частоти дихання, навпаки – пряма залежність з $F_{ET}O_2$ та обернена для $F_{ET}CO_2$.

Висновок. З підвищенням $F_{ET}O_2$ відмічається збільшення рівня легеневої вентиляції та частоти дихання в поєднанні із зниженням величини дихального об'єму. Найбільший взаємозв'язок величини дихального об'єму з $F_{ET}O_2$ відмічається в аеробній зоні виконання фізичного навантаження до порогу аеробного обміну. Із збільшенням активності анаеробних гліколітичних процесів в енергозабезпеченні відмічається послаблення взаємозв'язку V_T з $F_{ET}O_2$, що супроводжується збільшенням зв'язку $F_{ET}O_2$ з f_T та V_E.

Обернені закономірності відмічаються для $F_{ET}CO_2$ з основними параметрами дихальної реакції. Так, збільшення $F_{ET}CO_2$ в аеробній зоні виконання фізичного навантаження, що є наслідком процесів дихальної компенсації незначного збільшення ступеню ацидозу, відмічається збільшення величини дихального об'єму, яке супроводжується зниженням частоти дихання. Після перевищення рівня порогу анаеробного обміну (поява некомпенсованого метаболічного ацидозу) відмічається зменшення $F_{ET}CO_2$, що супроводжується збільшенням легеневої вентиляції за рахунок збільшення частоти дихання при зниженні величини дихального об'єму. При цьому, ступінь впливу $F_{ET}CO_2$ на V_T поступово зменшується із збільшенням активності анаеробних гліколітичних процесів в енергозабезпеченні, а для f_T та V_E, навпаки, збільшується.

За звичайних умов більш сильні впливи на дихання спричинює гіперкапнічний фактор. Так, для концентрації CO_2 в кінці видиху ($F_{ET}CO_2$) відмічається найбільший ступінь взаємозв'язку з основними параметрами діяльності дихальної системи а умов виконання навантаження аеробного характеру (при виконанні фізичної роботи ступеннезростаючої потужності на рівні аеробного порогу, а також навантаження малої та середньої інтенсивності,) ніж для $F_{ET}O_2$. При підвищенні інтенсивності навантаження та при максимальних аеробних навантажень збільшується внесок гіпоксичного фактору – більше значення набуває $F_{ET}O_2$, ніж $F_{ET}CO_2$.

1. Абрикосова М.А., Баскин К.А., Иоффе Л.А., Карпман В.Л., Любина В.Г. Напряжение CO2 в крови и альвеолах легких при мышечной работе различной интенсивности // Актуальные вопросы физиологии мышечной деятельности. – М., 1978. – С.74-85. 2. Бреслав И.С., Глебовский В. Д. Регуляция дыхания. – Л.: Наука, 1981. – 280 с. 3. Волков Н.И., Дардури У., Сметанин В.Я. Градации гипоксических состояний у человека при напряженной мышечной деятельности // Физиология человека. – 1998. – Т. 24, №3. – С. 51-63. 4. Лактатный порог и его использование для управления тренировочным процессом: Метод. рекомендации / Под ред. Мищенко В.С. – Киев: Абрис, 1997. – Вып.4. – 62 с. 5. Левинский С.В., Малкиман И.И. Формирование функционального состояния систем дыхания и терморегуляции при работе в атмосфере с повышенным содержанием двуокиси углерода // Физиология человека. – 1990. – Т.16, №1. – С.133-140. 6. Мищенко В.С., Лисенко Е.Н., Виноградов В.Е. Реактивные свойства кардиореспираторной системы как отражение адаптации к напряженной физической тренировке в спорте. – К., 2007. – 351 с. 7. Cautero M., di Prampero P. E. Tarn E., Capelli C. Alveolar oxygen uptake kinetics with step, impulse and ramp exercise in humans // European Journal of Applied Physiology. – 2005, December. – Vol. 95 (5-6). – P. 474-485. 8. Dekerle J, Baron B, Dupont L, Vanvelcenaher J, Pelayo P. Maximal lactate steady state, respiratory compensation threshold and critical power // Eur J. of Appl. Physiol. – 2003 May. – Vol. 89 (3-4). – P. 281-288. 9. Khoo M.C.K. A model-based evaluation of the single-breath CO2 ventilatory response test // J. Appl. Physiol. – 1990. – № 68. – P. 393 – 399. 10. Morton R.H. Critical power test for ramp exercise // Europ. J. of appl. Physiol., Berlin. – 1994. – Vol.69, №5. – P.435-438. 11. Wasserman K., Hansen J., Sue D. Principles of Exercise testing and interpretation. – Lea and Feliger, Phyladelphia, 1987. – 274 p.

Надійшла до редколегії 15.12.11

Наукове видання

ВІСНИК

КИЇВСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОГО УНІВЕРСИТЕТУ ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

БІОЛОГІЯ

Випуск 61

Друкується за авторською редакцією

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

Автори опублікованих матеріалів несуть повну відповідальність за підбір, точність наведених фактів, цитат, економіко-статистичних даних, власних імен та інших відомостей. Редколегія залишає за собою право скорочувати та редагувати подані матеріали. Рукописи та дискети не повертаються.

Формат 60x84$^{1/8}$. Ум. друк. арк. 6,5. Наклад 300. Зам. № 212-5976.
Гарнітура Arial. Папір офсетний. Друк офсетний. Вид. № Б 2.
Підписано до друку 29.02.12

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@univ.kiev.ua
http: vpc.univ.kiev.ua
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 1103 від 31.10.02