

Подано експериментальні дані про особливості будови, розвитку та функціонування рослинних і тваринних організмів, флору та фауну України, одержані на основі досліджень, що проводяться науковцями ННЦ "Інститут біології" 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 викладачів, наукових співробітників, аспірантів та студентів.

Подано экспериментальные данные об особенностях строения, развития и функционирования растительных и животных организмов, флору и фауну Украины, полученные на основе исследований, проводимых учеными ОНЦ "Институт биологии" в области физиологии растений и животных, генетики, ботаники, зоологии, микробиологии, вирусологии. Изложены также новые данные биохимических и биофизических основ регуляции в клетках и органах в норме и после воздействия различных физико-химических факторов, приведены результаты новых методических разработок.

Для преподавателей, научных сотрудников, аспирантов и студентов.

Collection of articles written by the scientists of ESC "Institute of Biology" 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. Торгалло, канд. біол. наук (відп. секр.); С. Є. Вакал, асист. (техн. секр.); С. Сабо, д-р біол. наук, проф. (м. Ірвайн, США. Університет Каліфорнії); О.В. Жолос, д-р біол. наук, проф. (Королівський університет Белфаста, м. Белфаст, Великобританія); С. Ю. Морозов, д-р біол. наук, проф. (Московський державний університет ім. М.В. Ломоносова, м. Москва, РФ); М. Шандор, д-р біол. наук, проф. (Західно-Угорський Університет, м. Сомбатгей, Угорщина); С. Юозас, д-р біол. наук, проф. (Інститут ботаніки, м. Вільнюс, Литва); Б. Каленгхем, проф. (м. Кембридж, Великобританія); В.О. Іваниця, д-р біол. наук, проф.; Т.В. Берегова, д-р біол. наук, проф.; Д.Н. Говорун, д-р біол. наук, проф.; Дж. Воллес, д-р біол. наук, проф. (Торонто, Онтаріо, Канада); М.С. Зефіров, д-р біол. наук, проф.; І. Г. Емельянов, д-р біол. наук, проф.; Е.М. Держинський, д-р біол. наук, проф.; І. Ю. Костіков, д-р біол. наук, проф.; О. Я. Склярів, д-р біол. наук, проф.; В.С. Мартинюк, д-р біол. наук, проф.; М. Ю. Макаруч, д-р біол. наук, проф.; В. П. Поліщук, д-р біол. наук, проф.; В. К. Рибальченко, д-р біол. наук, проф.; Н.Ю. Таран, д-р біол. наук, проф.; А.В. Сиволоб, д-р біол. наук, проф.; А.Г. Мойсеєнок, д-р біол. наук, проф., чл.-кор. НАН Білорусії
Адреса редколегії	03127, Київ-127, просп. акад. Глушкова, 2а, ННЦ "Інститут біології"; ☎ (38044) 521 35 98
Затверджено	Вченою радою ННЦ "Інститут біології" 14.04.14 (протокол № 10)
Атестовано	Вищою атестаційною комісією України. Постанова Президії ВАК України № 1-05/1 від 10.02.10
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, 6-р Т.Шевченка, 14, кімн. 43 ☎ (38044) 239 31 72, 239 32 22; факс 239 31 28

ЗМІСТ

Мусієнко М., Остапченко Л., Таран Н., Бацманова Л., Стороженко В. Університет Святого Володимира – Київський державний університет: генезис біологічної науки (1834-1933).....	5
Галкін О., Михальчук М., Казмірчук В., Гурженко Ю. Розробка і порівняльна характеристика різних модифікацій імуноферментного аналізу для визначення специфічних IgE-антитіл.....	15
Дємідов С., Дерев'янка С., Бова Т., Гончар М. Молекулярно-генетична ідентифікація тешовірусів свиней.....	21
Берник О., Дворщенко К., Драницина А., Остапченко Л. Імунобіохімічні показники стану печінки щурів за умов тривалої гіпохлоргідрії шлунку.....	25
Кривдюк І., Бакалець Т., Рябовол О., Мінченко Д. Експресія мРНК GADD34 та GADD45 у клітинах гліоми лінії U 87: вплив блокади сигнального ензиму ERN1 та дефіциту глюкози.....	28
Маслова О., Островська Г. Модифіковані умови культивування як спосіб впливу на морфофункціональні властивості мезенхімальних клітин пуповини людини.....	33
Кондратюк Ю., Маменко П., Коць С. Вплив різних доз мінерального азоту на загальний вміст білка коренів та бульбочок сої, інкульованої штамами <i>Bradyrhizobium japonicum</i> із контрастними симбіотичними характеристиками.....	37
Конограй В. Синтаксономія рослинності класу <i>Lemnetea</i> Кременчуцького водосховища.....	41
Смірнов О., Косик О., Таран Н. Вплив алюмінію на ацидофікуючу активність проростків гречки.....	46
Чумаченко І., Шандренко С. Модифікований метод визначення лабільного заліза в сироватці крові.....	48
Вінник Ю., Цапенко П., Лященко Т., Весельський С. Жовчосекреторна функція печінки щурів за умов гідрокортизонового навантаження.....	51
Бурлова-Васильєва М., Кравченко Н., Савчук О., Мельник В. Рівень фактору Фон Віллербранда за умов атеротромботичного ішемічного інсульту та кардіоемболічного ішемічного інсульту на фоні миготливої аритмії.....	55
Шиндер О., Неграш Ю. <i>SCOPOLIA CARNIOLICA</i> Jacq. (<i>SOLANACEAE</i>) на заході подільської височини: поширення, умови місцезростань і стан популяції.....	57
Мельник М., Мартинюк В., Артеменко О. Вплив слабких наднизькочастотних електромагнітних полів на синтез NO в гладеньком'язових клітинах.....	62
Бондаренко О., Гула Н., Макачук М., Горідько Т. Вплив різних доз N-стеароїлетаноламіну на рівень тривожності алкоголізованих щурів.....	65
Путніков А., Позур В., Святецька В., Закордонець Л. Реакція імунної системи щурів на введення мультипробіотика "Симбітер" на фоні курсового застосування цефтріаксону.....	69
Омельчук О., Проць Б. Раритетні фітоценози річково-долинних коридорів Закарпаття.....	72
Грін С., Савінова І., Науменко Н., Антоненко І. Вплив наднизьких концентрацій гліюксалу та метилгліюксалу на енергетичний та азотистий обмін лімфоцитів <i>in vitro</i>	78
Галушка О., Зазуляк Т., Кузьмінов О., Грушка О., Паздерська І. Експериментальна оцінка впливу лоратадину на вагітних самиць-щурів.....	81
Вовчук І. Вплив катіонів двовалентних металів на активність карбоксипептидази А немалігнізованого та пухлинного яєчника.....	84
Пилипенко С., Короткий О., Берегова Т., Остапченко Л. Вплив мультипробіотика "Алібакт®" на вміст ТБК-активних продуктів і функціонування глутатіонової ланки антиоксидантного захисту в сироватці крові щурів з тривалою шлунковою гіпоацидністю.....	86
Голишкін Д., Рибальченко В., Бичко А., Берегова Т., Фалалєєва Т. Вплив меланіну на електричні характеристики модельних біліпідних мембран (<i>in vitro</i>).....	90
Гарманчук Л. Визначення поглинання глюкози пухлинними клітинами за стандартних умов культивування та під впливом протипухлинних препаратів.....	92

СОДЕРЖАНИЕ

Мусяненко Н., Остапченко Л., Таран Н., Бацманова Л., Стороженко В. Университет Святого Владимира – Киевский государственный университет: генезис биологической науки (1834-1933).....	5
Галкин А., Михальчук М., Казмирчук В., Гурженко Ю. Разработка и сравнительная характеристика различных модификаций иммуноферментного анализа для определения специфических IgE-антител	15
Демидов С., Деревянко С., Бова Т., Гончар М. Молекулярно-генетическая идентификация тешовирусов свиней	21
Берник О., Дворщенко К., Драницина А., Остапченко Л. Иммунобиохимические показатели печени крыс в условиях длительной гипохлоридрии желудка	25
Кривдюк И., Бакалец Т., Рябовол О., Минченко Д. Экспрессия мРНК GADD34 b GADD45 в клетках глиомы линии U87: влияние блокады сигнального энзима ERN1 и дефицита глюкозы	28
Маслова О., Островская Г. Морфофункциональные условия культивирования как способ влияния на морфофункциональные свойства мезенхимальных клеток пуповины человека.....	33
Кондратюк Ю., Маменко П., Коць С. Влияние различных доз минерального азота на общее содержание белка корней и клубеньков сои, инокулированной штаммами <i>Bradyrhizobium japonicum</i> с контрастными симбиотическими характеристиками	37
Конограй В. Синтаксономия растительного класса Lemnetae Кременчугского водохранилища.....	41
Смирнов А., Косык О., Таран Н. Влияние алюминия на ацидофицирующую активность проростков гречихи	46
Чумаченко И., Шандренко С. Модифицированный метод определения лабильного железа в сыворотке крови	48
Винник Ю., Цапенко П., Лященко Т., Весельский С. Желчсекреторная функция печени крыс в условиях гидрокортизоновой нагрузки	51
Бурлова-Васильева М., Кравченко Н., Савчук А., Мельник В. Уровень фактора Фон Виллербранда при атеротромботическом ишемическом инсульте и кардиоэмболическом ишемическом инсульте на фоне мерцательной аритмии	55
Шиндер А., Неграш Ю. <i>SCOPOLIA CARNIOLICA</i> Jacq. (<i>SOLANACEAE</i>) на западе Подольской возвышенности: распространение, условия местообитаний и состояние популяций	57
Мельник М., Мартынюк В., Артеменко А. Влияние слабых сверхнизкочастотных электромагнитных полей на синтез NO в гладкомышечных клетках.....	62
Путников А., Позур В., Святецкая В., Закордонец В. Реакция иммунной системы крыс на введение мультипробиотика "Симбитер" на фоне курсового применения Цефтриаксона	65
Бондаренко О., Гула Н., Макачук М., Горидько Т. Влияние различных доз N-стеароилетаноламину на уровень тревожности алкоголизованных крыс.....	69
Омельчук О., Проць Б. Раритетные фитоценозы речных коридоров Закарпатья	72
Гирин С., Савинова І., Науменко Н., Антоненко І. Действие сверхнизких концентраций глиоксала и метилглиоксала на энергетический и азотистый обмен лимфоцитов <i>in vitro</i>	78
Галушка А., Зазуляк Т., Кузьминов А., Грушка О., Паздерська І. Экспериментальная оценка влияния лоратадина на беременных самок-крыс	81
Вовчук І. Влияние катионов двовалентных металлов на активность карбоксипептидазы А немагналинизированного и опухолевого яичника	84
Пилипенко С., Короткий А., Береговая Т., Остапченко Л. Влияние мультипробиотика "Апибакт®" на содержание ТБК-активных продуктов и функционирование глутатионного звена антиоксидантной защиты в сыворотке крови крыс с длительной желудочной гипoaкцидностью	86
Гольшкин Д., Рыбальченко В., Бычко А., Береговая Т., Фалалеева Т. Влияние меланина на электрические характеристики модельных билипидных мембран (<i>in vitro</i>)	90
Гарманчук Л. Определение глюкозы опухолевыми клетками в стандартных условиях культивирования и под влиянием противоопухолевых препаратов	92

CONTENTS

Musienko M., Ostapchenko L., Taran N., Batsmanova L., Storozhenko V. From St. Volodymyr University to Kyiv State University – the genesis of biological science (1834-1933)	5
Galkin O., Myhalchuk M., Kazmirchuk V., Gurzhenko Yu. Development and comparison of different versions of ELISA for detection of specific IgE-antibodies	15
Demidov S., Derevyanko S., Bova T., Gonchar M. Molecular genetic identification of pigs teschovirus	21
Bernuk O., Dvorschenko K., Dranicina A., Ostapchenko L. Immunobiochemical parameters of rats liver under long-term gastric hypochlorhydria	25
Kryvdiuk I., Bakalets T., Riabovol O., Minchenko D. Expression of GADD34 and GSDD45 mRNA in U87 glioma cells: effect of ERN1 signaling enzyme and glucose deprivation	28
Maslova O., Ostrovska G. Modified culture conditions as an influence on morphofunctional characteristics of human umbilical cord mesenchymal cells	33
Kondratiuk Iu., Mamenko P., Kots S. The influence of different doses of mineral nitrogen on total protein content of roots and nodules of soybean, inoculated by strains of <i>Bradyrhizobium japonicum</i> with contrasting symbiotic features	37
Konogray V. Syntaxonomy vegetation class <i>Lemnetea</i> of the Kremenchug Reservoir Area	41
Smirnov O., Kosyk O., Taran N. Aluminium effect on acidification activity of buckwheat germinating roots	46
Chumachenko I., Shandrenko S. The modified method for blood serum labile iron quantification	48
Vinnuk Yu., Tsapenko P., Lyschenko T., Veselskiy S. Biliary secretion of brats liver in hidro cortizone load	51
Burlova-Vasyliieva M., Kravchenko N., Savchuk O., Melnyk V. Von Willerbrand factor level in patients with atherothrombotic ischemic stroke and cardioembolic ischemic stroke with atrial fibrillation	55
Shynder O., Nehrash J. <i>SCOPOLIA CARNIOLICA</i> Jacq. (<i>SOLANACEAE</i>) in the western part of Podolsk upland: distribution, conditions habitats and population status	57
Melnyk M., Martynuk V., Artemenko O. The influence of weak extremely low-frequency electromagnetic fields on NO synthesis of smooth muscle cells	62
Putnikov A., Pozur V., Svyatetska V., Zakordonets L. The reaction of immune system of rats on multiprobiotic symbiter on the background a course of Ceftriaxone	65
Bondarenko O., Gula N., Makarchuk N., Goridko T. Effect of different doses of N-stearoylethanolamine on anxiety level in rats after alcoholization	69
Omelchuk O., Prots B. Rare Phytocoenoses of the Transcarpathian River Valley Corridors	72
Girin S., Savinova I., Naumenko N., Antonenko I. The influence of glyoxal and methyl glyoxal's ultra-low-concentrations on energy and nitrogen metabolisms of lymphocytes <i>in vitro</i>	78
Galushka A., Zozulyak T., Kuzminov A., Grishka O., Pazderska I. Experimental assessment of loratadine pregnant female rats	81
Vovchuk I. Influence of cations of bivalent metals on activity of carboxypeptidase a non malygnant and tumor ovarium	84
Pilipenko S., Korotkyi O., Beregova T., Ostapchenko L. The influence of multiprobiotic "Apibact®" on the TBA-active products level and functioning of glutathione link of antioxidant defense in blood serum of rats with long-time gastric hypoacidity	86
Golyshkin D., Rybalchenko V., Bychko A., Beregova T., Falalyeyeva T. Influence of melanin on electrical characteristics of model bilipid membranes (in vitro)	90
Garmanchuk L. Definition of glucose uptake by tumor cells under standart cultivation conditions and under the anticancer drugs	92

УДК 94(477)(03)+(092)

М. Мусієнко, д-р біол. наук, проф., акад. НААН України, Л. Остапченко, д-р біол. наук, проф.,
Н. Таран, д-р біол. наук, проф., Л. Бацманова, канд. біол. наук, ст. наук. співроб., В. Стороженко, канд. біол. наук
КНУ імені Тараса Шевченка, Київ

УНІВЕРСИТЕТ СЯТОГО ВОЛОДИМИРА – КИЇВСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ: ГЕНЕЗИС БІОЛОГІЧНОЇ НАУКИ (1834-1933)

Наведено історичний нарис розвитку біологічної науки у Київському національному університеті імені Тараса Шевченка за період з 1834-1933 роки.

Ключові слова: біологічні науки, історія, генезис.

Людина – найцінніший скарб будь-якої землі, будь-якого народу. А людський квіт – її еліта, їхній досвід і спадок є найліпшим об'єктом для вивчення історії, оскільки вона є і творцем її, і складовою – живою клітинкою того величезного організму, ім'я якому народ. Виборовши незалежність, на шляху творення нової держави, ми маємо водночас творити своє майбутнє і відтворювати своє минуле, щоб знати тих, хто закладав її підмурки, творив науку і освіту, культуру і мистецтво. Багатобарвне і змістовне минуле та сучасне нашої Alma mater.

У Київському університеті за 180 років існування його кращі вихованці зробили безцінний внесок у справу розвитку не лише вітчизняної, а й світової науки та культури. Університет пишається тим, що в ньому здобули освіту представники біологічної науки В.А.Беєц (1834-1894), О.М.Бах (1857-1946), Д.К.Заболотний (1866-1929), О.В.Топачевський (1897-1975), І.І. Шмальгаузен (1884-1963), М.Г.Холодний (1882-1953), Д.К. Зеров (1895-1971), Ф.Г.Добжанський (1900-1975) та багато інших вчених, які вписали золоті сторінки в його історію і є гордістю української науки. Нам випала щаслива нагода жити і працювати у рік 80-річного ювілею біологічного факультету Київського національного університету імені Тараса Шевченка, який відзначає свій 180-річний ювілей.

Рівно 180 років тому здійснилася давня мрія української козацької старшини та шляхетства (Костянтин Острозький, Іван Виговський, Іван Мазепа, Кирило Розумовський) про відкриття в Києві університету європейського зразка [4]. Однак, питання заснування Київського університету набуло особливої актуальності лише у ХІХ ст., коли польське повстання 1830-31 рр. змусило царський уряд переглянути свою політику щодо Правобережної України. Адже якщо до польського визвольного руху царизм сприяв її полонізації, то тепер було розпочато русифікацію Правобережної України. Було закрито всі учбові заклади з польською мовою викладання, в тому числі і Волинський ліцей (м. Кременець), матеріальна база якого стала основою при створенні Київського університету. Для університету було обрано місто Київ, яке на думку імператора Миколи І, за давніх літ до заснування університету було призначене, адже воно рівно доро-

гоцінне для всієї Росії, як колиски святої віри наших предків і разом з тим це місто є першим свідком громадянської їх самобутності [14, 15]. Власне цим наголошувалося майбутня роль університету як провідника російської державності серед польського дворянства Правобережної України. Це був шостий університет царської Росії (вже існували Московський, Казанський, Дерптський, Харківський, Петербургський).

Історія університету бере свій початок від 25 грудня 1833 р., коли було підтримано подання управляючого міністерства освіти графа С. С. Уварова про заснування Імператорського Університету Святого Володимира на базі перенесеного до Києва польського Кременецького ліцею. В цей день було затверджено тимчасовий статут і штат університету [14]. А вже 15 липня 1834 р., у день пам'яті святого рівноапостольного князя Володимира, відбулося урочисте відкриття університету в складі двох факультетів – філософського і юридичного. Філософський факультет мав два відділи: історико-філологічний та фізико-математичний. 18 жовтня 1834 р. на посаді першого ректора Університету наказом імператора Миколи І був призначений 29-річний професор ботаніки Московського університету, українець за походженням, Михайло Максимович – історик, фольклорист, видатний вчений-енциклопедист того часу (рис. 1). Він же став і деканом історико-філологічного відділу. Кременецькі професори викладали в новоствореному університеті більшість фізико-математичних та біологічних наук. У 1835 році почалися заняття і на юридичному факультеті. На думку С.С.Уварова університет був покликаний забезпечити моральне й розумове єднання польського юнацтва з російським у Києві, цьому колись першопрестольному місті Росії [11].

Значною проблемою для університету була відсутність власного приміщення. Керівництво навчального закладу було змушене протягом перших восьми років орендувати декілька приватних будівель капітана Корта на Печерську, зовсім не пристосованих до навчального процесу. Будівництво нового приміщення розпочалось 31 липня 1837 р. за проектом професора архітектури Петербурзької академії мистецтв В. Беретті (рис. 1) і було завершено в 1842р.



А



Б

Рис.1. Перший ректор університету М.О. Максимович (портрет за авторством Т.Г. Шевченка) (А) та автор проекту будинку університету та ботанічного саду архітектор В. Беретті (Б)

Під його безпосереднім керівництвом було зведено будівлю у стилі класицизму, яка і досі використовується як головний корпус університету. Майже водночас із відкриттям університету, а саме в 1835 р. на базі колекційних фондів Кременецького ботанічного саду Волинського ліцею був заснований і ботанічний сад. Закладка постійного ботсаду здійснювалась з жовтня 1841 р. під керівництвом Р.Е.Трауфеттера за планом архітектора В.І.Беретті. У вересні 1849 р. було закінчено спорудження оранжерей, а в 1853 р. навколо території саду побудували огорожу. За перші 10 років існування за чисельністю своїх колекцій сад посів перше місце в країні.

Ботанічний сад функціонує і сьогодні. До його структури входить ботанічний музей, створений у 1934 р. На сьогодні в його фондах налічується понад 20000 гербарних зразків, а в експозиціях представлено більше 2000 натурних експонатів вищих і нижчих рослин. У музеї також експонуються наукові праці, рослинні препарати, гербарні зразки та інші предмети, якими користувався акад. С.Г.Навашин.

Одночасно із заснуванням Ботанічного саду була започаткована наукова бібліотека, в фондах якої тепер налічується понад 40000 книг та журналів з питань ботаніки та інших напрямків біології.

Перехід університету до власного великого приміщення і прийняття в 1842 р. університетського статуту зумовило послідовну розбудову кафедральної системи університету. За словами царського міністра освіти графа С.С.Уварова, університет повинен був служити ґрунтовному вивченню російської мови й словесності, знайомству з установами російськими, іншими словами, – русифікації неруських народів. Попечитель Київського учбового округу фон Брадке вважав, що вченість і спеціалізм – розкіш для даного університету, бо його завдання – підготовка освічених і відданих російському уряду вчителів і чиновників.

У серпні 1837 р. цар Микола I особисто приїхав до Києва і заявив на зборах всіх студентів, що йому "потрі-

бні вірні Вітчизні сини престолу, їх безмежна відданість", інакше "він їх заховає туди, куди ворон кісток не заносить". Щодо професури також, за його словами наука наукою, а моральне виховання студентів, його політичний напрямок згідно з думками царя має бути першочерговим [11]. Та всупереч бажанням імперського уряду перетворити Київський університет на форпост російського самодержавства, у його стінах завжди жили і розвивалися прогресивні ідеї.

Упродовж 1830-1860-х рр. університет був одним із центрів польського національно-демократичного руху. Микола I жорстко розправився з учасниками руху і вирішив ліквідувати щойно створений університет. Згодом він обмежився його закриттям на рік, що й було зроблено в березні 1839 року. Всі студенти були виключені, а кременецькі викладачі поляки звільнені. На зміну були запрошені переважно німці, вихованці Дерптського університету. Слід нагадати, що пізніше в 1845-1847 рр. також розгорнуло свою діяльність Кирило-Мефодіївське братство. І як свідчить історія, Київський університет з часом перетворився на визнаний національний науковий і культурний центр України. Коридори й аудиторії червоно-колонного красеня нашої Alma mater за різних часів і суспільно-політичних формацій пронизані чистими, справедливими ідеями першого ректора Михайла Максимовича, його побратимів Тараса Шевченка і Миколи Костомарова, пізніше Михайла Драгоманова, Михайла Грушевського, Івана Огієнка та багатьох інших видатних особистостей, які ввійшли в історію університету своїми сміливими демократичними і національно окресленими вчинками в боротьбі за долю свого народу та майбуття України.

Вже з першого року заснування університету, серед 13 кафедр філософського факультету була кафедра ботаніки та зоології, яку очолили викладачі Кременецького ліцею – поляки В.Г.Бессер та А.Л.Андржейовський, відповідно (рис. 2).



В.Г. Бессер



А.Л. Андржейовський

Рис. 2. Перші завідувачі кафедрами ботаніки (В.Г. Бессер) та зоології (А.Л. Андржейовський) Університету Святого Володимира

Курс ботаніки також охоплював фізіологію рослин. Водночас з В.Г.Бессером, на кафедрі ботаніки органологію та фізіологію рослин викладав доктор філософії П.Я. Корноух-Троїцький. В основі їх лекцій були праця "О системах растительного царства" (1823) та підручники першого ректора Київського університету Св. Володимира М.О. Максимовича "Основания ботаники. Органология" (1828), "Систематика растений" (1831), в

яких розглядалась фізіологічна роль клітин та поняття обміну речовин. Взагалі всі біологічні дисципліни викладали професори бувшого Кременецького ліцею (лекції читались латинською мовою). Пізніше на кафедрі ботаніки працювали Р.Е. Трауфеттер, О.С. Рогович, І.Ф. Шмальгаузен, І.Г. Борщов та Я.Я. Вальц, який започаткував новий напрямок – ботаніка нижчих рослин (рис. 3).



Р.Е. Трауфеттер



О.С. Рогович



І.Г. Борцов



І.Ф. Шмальгаузен

Рис. 3. Видатні ботаніки XX століття Університету Святого Володимира

Згідно Університетського статуту від 18 червня 1863 року у складі розряду природничих наук фізико-математичного факультету існували дві самостійні кафедри, кожна з двома відділеннями: (I) ботаніки з відділеннями: 1 – морфології та систематики рослин; 2 –

анатомії та фізіології рослин та зоології (II) з відділеннями: 1 – порівняльної анатомії та систематики тварин; 2 – анатомії людини та фізіології тварин (рис. 4). Короткочасно (1865 р.) курс анатомії та фізіології рослин читав приват-доцент кафедри ботаніки Я.Я. Вальц.

УНИВЕРСИТЕТСКИЙ УСТАВЪ

1863 ГОДА.

САНКТИПЕТЕРБУРГЪ.
ВЪ ТИПОГРАФИИ ГОСАФАТА ОФРЕДКО.
1863.

Именным Высочайшимъ указомъ, даннымъ Правительствующему Сенату, 18 июня 1863 г.

Объ измененіи Устава и штатовъ ИМПЕРАТОРСКИХЪ Университетовъ.

УКАЗЪ ПРАВИТЕЛЬСТВУЮЩЕМУ СЕНАТУ.

«Признать необходимымъ измѣнить, сообразно современнымъ потребностямъ, дѣйствующіе въ настоящее время въ ИМПЕРАТОРСКИХЪ Университетахъ НАШИХЪ Уставъ и Штаты, МЫ повелѣли на Министра Народнаго Просвѣщенія представить НАМЪ свои по сему предмету предположенія.

Нынѣ, по разсмотрѣніи въ Государственномъ Совѣтѣ составленныхъ въ сдѣлствіе сего проектовъ Устава и Штатовъ, утвердивъ оные и препровождая въ Правительствующій Сенатъ, повелѣваемъ:

1) Уставъ сей и Штаты теперь же ввести въ дѣйствіе въ Университетахъ: С.-Петербургскомъ, Московскомъ, Харьковскомъ, Казанскомъ и Св. Владиміра въ Кіевѣ;

и 2) Отпускъ суммъ на содержаніе означенныхъ Университетовъ въ увеличенномъ, противъ прежняго, размѣрѣ, начать постепенно съ 1-го сентября нынѣшняго года, обращая, на жребъ указанныхъ НАМИ Министромъ Финансовъ и Народнаго Просвѣщенія основанійхъ, дополнителныя по ассигнованію суммъ первоначально на нынѣ существующій въ означенныхъ Университетахъ личный составъ Профессоровъ и Преподавателей, а потомъ уже на прочіи, Уставомъ и Штатами указываемыя потребности.

Правительствующій Сенатъ не оставитъ сдѣлать въ исполненіе сего надлежащее распоряженіе.»

На подлинномъ Собственною ЕГО ИМПЕРАТОРСКАГО ВЕЛИЧЕСТВА рукою написано:

„АЛЕКСАНДРЪ.“

Въ Царскомъ Селѣ.
19-го июня 1863 года.

Рис. 4. Університетський устав імператора Олександра II 1863 року

З 1870 р. кафедру ботаніки Київського університету очолив І.Г.Борцов. Отримавши магістерський ступінь, І.Г.Борцов з 1866 р. почав працювати в Київському університеті як приват-доцент. У 1867 р. він захистив докторську дисертацію, а у 1868 р. був обраний екстраординарним професором. В 1866-1873рр. курс анатомії і фізіології рослин вів І.Г.Борцов, який досліджував фізико-хімічні властивості клітини. Завдяки своїм працям І.Г.Борцов став одним з засновників вітчизняної колоїдної хімії. Отже, перші анатоμο-фізіологічні досліджен-

ня в Університеті Святого Володимира були започатковані І.Г.Борцовим, Я.Я.Вальцем, а з 1873 р. анатомію та фізіологію рослин розпочав читати Й.В. Баранецький. Отримавши у 1870 р. ступінь магістра ботаніки, він був відраджений на два роки за кордон. Там він займався у Галле (в лабораторіях де-Барі та Гейнца), у Вюрцбурзі (у Сакса), у Лейпцігу (у Кнопа).

Повернувшись на Батьківщину, у 1873 р. отримав ступінь доктора ботаніки і був призначений екстраординарним професором Київського університету, а у

1877 р. став ординарним професором кафедри ботаніки. У 1897 р. Й. В. Баранецький був обраний членом-кореспондентом Петербурзької академії наук [6]. Впродовж 1873-1898рр. він читав курс анатомії і фізіології рослин. Й.В.Баранецький заснував першу фізіологічну лабо-

раторію і по праву вважається основоположником фізіології рослин в Україні. Фізіологічна лабораторія мала ряд приладів для дослідження ростових процесів у рослин [1]. Він виконав ряд оригінальних досліджень з фізіології проростання насіння, дихання та фотосинтезу (рис. 5).



Рис. 5. Й.В. Баранецький та його найвидатніші досягнення в фізіології рослин

В 1894 році кафедра ботаніки була розділена на кафедру морфології та систематики рослин (С.Г. Навашин) (рис. 6) та кафедру анатомії і фізіології рослин (Й.В.Баранецький). С.Г.Навашин навчався в Медико-хірургічній академії у Санкт-Петербурзі (1874–1878), згодом у 1881 р. закінчив природниче відділення Московського університету. На запрошення К.А. Тімірязєва з 1881 р. працював на університетській кафедрі фізіології рослин, а потім у Петровській рільницькій та лісовій академії (1884–1889 рр.). Будучи хіміком, самостійно вивчав ботаніку, написав перші свої праці з біології та мікології. У 1888 р. С.Г. Навашин склав магістерський іспит з ботаніки в Петербурзькому університеті. Здобувши звання приват-доцента, читав у Московському університеті курс патології рослин. У 1889–1894 рр. вчений працював у Петербурзькому університеті і 1894 р. захистив магістерську дисертацію на тему "Склеротинія у берези". У 1895 р. відкрив явище халазогамії, а ще через рік у Новоросійському університеті здобув ступінь доктора на основі дисертації "Про звичайну березу і морфологічне значення халазогамії".

В 1894 г. після смерті професора Київського університету Святого Володимира І.Ф.Шмальгаузена С.Г.Навашина було запрошено на вакантну посаду завідувача кафедри морфології і систематики рослин. Водночас за сумісництвом він став директором Ботанічного саду університету. С.Г.Навашин став екстраординарним професором ботаніки Київського університету, а 30 квітня 1895 р. був затверджений ординарним професором. Київський період діяльності виявився

найбільш плідним у його творчому житті. Продовжуючи вивчати хворобу сережок берези, він зробив відкриття, що прославило його ім'я у всьому світі: явище подвійного запліднення у рослин. Упродовж наступних 1894–1915 рр. С. Навашин очолював кафедру морфології й систематики рослин Київського університету Святого Володимира. Саме тут С.Г.Навашин дослідив будову ядра і морфологію хромосом різних видів рослин, відкрив супутники хромосом, розробив основи каріології та вперше вказав на її таксономічне значення [6]. Усі свої фундаментальні дослідження він здійснив на власноручно виготовлених приладах – шедеврах мікротехнічного мистецтва. У серпні 1898 р. На засіданні XX з'їзду природодослідників і лікарів у Києві він вперше повідомив про відкрите ним унікальне явище – подвійне запліднення у покритонасінних рослин. Учений обґрунтував походження ендосперму покритонасінних і явище ксенії. Його лабораторії стали місцем паломництва вчених з усього світу. У 1924 р. С.Г.Навашина було обрано академіком Всеукраїнської академії наук. С.Г.Навашин за час роботи на кафедрі ботаніки (1894-1914) сформував широко відому цитолого-ембріологічну школу, а відкриття подвійного запліднення у покритонасінних рослин на прикладі *Lilium martagon* та *Fritilaria tenella* влітку 1898р. принесло світову славу Київському університету. Його учнями були М. Цінгер, Г. Левитський, В. Фінні, Л. Делоне, М. Холодний [10]. Ученем вченого був і його син Михайло Навашин – цитолог і цитогенетик, який вперше здійснив аналіз хромосом людини [8].



Рис. 6. С.Г. Навашин та його всесвітньовідомі відкриття

Впродовж 1900-1916 року кафедру анатомії та фізіології рослин очолював К.А. Пурієвич. Костянтин Адріанович Пурієвич народився в Житомирі 28 травня 1866 р., закінчив університет Святого Володимира (1889) і працював у ньому до кінця життя. Основні наукові праці К. А. Пурієвича присвячені обміну речовин під час дихання та фотосинтезу рослин. Йому ж належить низка оригінальних досліджень з питання вивчення коефіцієнта дихання у пліснявих грибів. К. А. Пурієвич виявив, що

процес цього дихання має певні закономірності, які залежать від характеру та кількості поживного середовища. Він вивчав проблему фіксації молекулярного азоту мікроорганізмами та зробив висновок, що цей процес можуть здійснювати плісняві гриби *Aspergillus niger* і *Penicillium glaucum*. Впродовж 1906-1933 рр. на кафедрі анатомії та фізіології рослин працював вчений із світовим ім'ям М.Г.Холодний, який провів блискучі дослідження з фітогормоналогії, екології рослин, мікробіології (рис. 7).

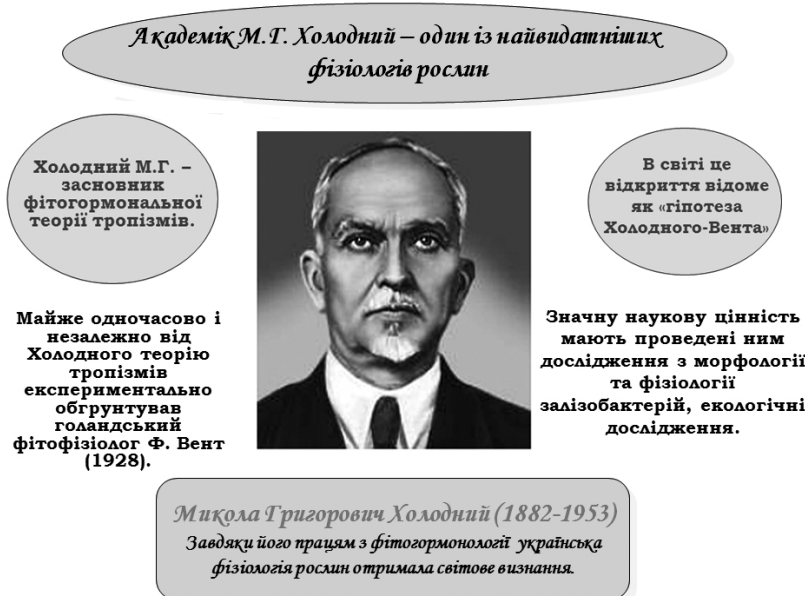


Рис. 7. М.Г. Холодний – видатний вітчизняний фізіолог рослин, засновник фітогормональної теорії тропізмів

Уперше на цій кафедрі з 1912 року М.Г.Холодний вів курс мікробіології. Завідувач кафедри К.А. Пурієвич пропонує йому взяти на себе викладання курсу мікробіології. М.Г. Холодний погоджується за умови творчого відрядження для підготовки даного курсу в одній з кра-

щих на той час лабораторій мікробіології Василя Леонідовича Омелянського в Петербурзькому Інституті експериментальної медицини, де ще працювали старі співробітники та були живі традиції славної епохи видатного вченого-мікробіолога С.М.Виноградського.

Тут він знайомиться також і з відомим мікробіологом, майбутнім президентом Української Академії наук, епідеміологом Д.К. Заболотним. За 2,5 місяці кропіткої, безперервної праці в лабораторії та бібліотеці він засвоїв методику мікробіологічних досліджень, розробив практикум та апробував програму курсу загальної мікробіології.

В осінній семестр 1912 року, продовжуючи виконувати обов'язки асистента кафедри фізіології та анатомії рослин, М.Холодний розпочав читати курс

мікробіології з практичними заняттями для студентів ботаніків та агрономів.

Широко відому наукову ботанічну школу систематиків та флористів нижчих і вищих рослин (Д.К. Зеров, О.В. Топачевський, О.М.Окснер, П.Ф.Оксюк, О.Л.Липа та ін.) створив О.В.Фомін, який впродовж буремних переломних років (1914-1930 рр.) очолював кафедру, ботанічний сад університету і фактично очолював всю ботанічну науку того періоду на теренах сучасної України (Рис. 8).



О.В. Фомін



Д.К. Зеров



Я.С. Модилевський



О.В. Топачевський



О.Л. Липа

Рис. 8. Відомі ботаніки Київського університету XX століття

На кафедрі зоології впродовж різного часу від заснування і до реорганізації університету в 1920р. працювали О.Ф.Міддендорф, Е.Е.Мірам, К.Ф. Кесслер, О.М.Паульсон, О.О.Ковалевський, М.В.Бобрецький, О.О.Коротнєв, В.К.Совинський, О.М.Северцов, М.М. Воскобойников, І.І.Шмальгаузен, С.Ю.Кушакевич, В.П. Поспелов (рис. 9).

Розвиток зоологічної науки в університеті інтенсивно розпочався з досліджень К.Ф. Кеслера, якого заслужено називають основоположником вітчизняної фауністики та О.О.Ковалевського – засновника порівняльної ембріології. Вони започаткували два основні напрямки наукових досліджень зоологів університету другої половини XIX – першої чверті XX ст., а саме фауністичної та морфологічної.

Велика заслуга в розвитку зоології належить М.В.Бобрецькому, який працював в університеті впродовж 1866-1907 рр., пройшовши шлях від студента до декана і ректора. Він автор першого двотомного вітчизняного підручника для університетів "Основания зоологии" в трьох випусках 1884-1887 рр. та однотомного "Учебника зоологии", які витримали низку видань і відіграли вагомe значення в підготовці кадрів біологів.

Впродовж 25 років (1887-1912) працював на кафедрі О.О.Коротнєв, який читав курс загальної зоології і дослідження якого присвячені ембріології, анатомії та філогенетиці тварин. В основному за власний кошт, він організував біологічну станцію на Середземному морі на півдні Франції, на якій проводили свої дослідження не лише вітчизняні, а й вчені багатьох країн світу (існує до тепер в складі Парижського університету [8]).

Майже 40 років (1877-1917) віддав кафедрі В.К.Совинський, другий за внеском після Кеслера дослідник фауни України. Зоологи, які працювали в університеті з дня його відкриття і до реорганізації в 1920 році виконали фундаментальні дослідження в галузі фауністики, систематики і морфології тварин, ентомології та зоогеографії.

Ще один вагомий напрямок зоологічних досліджень – морфологічний, започаткував в університеті видатний вітчизняний вчений О.М.Северцов (1903-1911 рр.), а продовжив його учень М.М.Воскобойников – видатний морфолог, засновник нового функціонального напрямку порівняльної анатомії, який без перерви пропрацював на кафедрі з 1903 по 1942 рік.



О.Ф. Міддендорф



К.Ф. Кесслер



О.М. Северцов



О.О. Ковалевський



О.О. Коротнев



І.І. Шмальгаузен



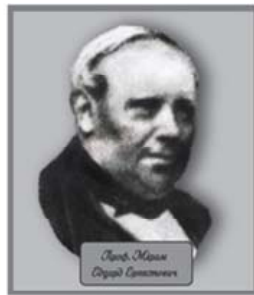
М.М. Воскобойніков

Рис. 9. Відомі вітчизняні зоологи, які працювали в Київському університеті впродовж середини XIX – першої половини XX століття

Світове визнання у галузі порівняльно-ембріологічних досліджень та еволюційного вчення набули роботи вчених університету, корифеїв біологічної науки О.О.Ковалевського, О.М.Северцова та І.І. Шмальгаузена.

У 1841 році в університеті був відкритий медичний факультет, де функціонували кафедри: нормальної анатомії (М.І. Козлов); нормальної фізіології (Е.Е. Мі-

рам); гістології, ембріології та порівняльної анатомії (П.І. Перемежко), фармакології (Ю.П.Лауденбах) [7]. На факультеті успішно працювали О.П. Вальтер, В.Б. Томса, В.О.Бец, О.Л.Рева, С.І.Чир'єв та найвидатніший фізіолог Київського університету В.Ю.Чаговець – основоположник сучасної електрофізіології (рис. 10).



Е.Е. Мірам



О.П. Вальтер



В.Б. Томса



С.І. Чир'єв



В.Ю. Чаговець

Рис. 10. Видатні фізіологи університету II половини XIX – першої половини XX століття

фізіологічний напрямок частково розвивався і на кафедрі фармакології (В.І.Дибковський). Біохімічні дослідження проводились на кафедрах загальної хімії та

фізики і лише за університетським статутом 1884 р. вперше було засновано кафедру медичної хімії з окремою лабораторією для наукової роботи (О.О. Шеффер,

В.Ф. Кістяковський, О.О. Садовень, А.Г. Ракочі). У 1920 р. на базі медичного факультету університету було відкрито Київський медичний інститут, куди перейшла і ця кафедра.

За статутом 1842 р. від існуючої кафедри технології, сільського господарства, лісівництва і архітектури було також виділено самостійну кафедру сільського господарства і лісівництва (І.Ф.Якубовський), яку з 1890 р. реорганізовано в кафедру агрономії (С.М.Богданов), яка проіснувала до 1919 року. Професор С.М. Богданов створив перший в Європі сільськогосподарський ботанічний сад та агротехнічну лабораторію. Він науково обґрунтував методи оцінки доступності ґрунтової вологи для рослин, випередивши в цьому майже на чверть століття американських дослідників Л. Брігса та Г.Шанца. Ці результати стали надбанням світової науки, фундаментом вчення про водний режим рослин.

В різні роки деканами фізико-математичного факультету працювали Р.Трауфеттер (1843-1847 рр.), К. Кеслер (1856-1860, 1861-1862 рр.), К.Пурієвич (1907-1910 рр.).

Таким чином, в різний час з перших років його заснування в університеті працювали талановиті видатні вчені-біологи (М.О.Максимович, Р.Е.Траутфеттер, О.С. Ро-

гович, Ш.Ф. Шмальгаузен, І.Г. Борщов, С.Г. Навашин, Й.В. Баранецький, К.А.Пурієвич, О.В.Фомін, К.Ф. Кесслер, О.О.Ковалевський, О.О.Коротнєв, О.М.Сєверцов, М.М. Воскобойніков, І.І. Шмальгаузен, П.І.Перемержко, М.М. Воскресенський, О.П. Вальтер, В.О. Беє, О.Ф. Міддендорф, С.І. Чир'єв, В.Ю.Чаговець, О.А. Садовень та багато інших), які своїми важливими відкриттями принесли світову славу нашому університету. Навіть цей короткий огляд є свідченням того, що біологи університету Св. Володимира впродовж 1833-1917 рр. зробили вагомий внесок в дослідження флори і фауни України, вивчення окремих груп рослин і тварин, формування наукових шкіл, розвиток нових галузей біологічної науки та підготовку кадрів високого фаху [9].

Надзвичайно складні часи пережив Київський університет Святого Володимира в часи першої світової війни та революційних подій 1917 року. Восени 1915 р. університет, за винятком медичного факультету, був евакуйований до Саратова і повернувся до Києва вже восени 1916р. Цей переїзд завдав багатьох збитків лабораторіям, науковому обладнанню та й всьому колективу університету (рис. 11).



Рис. 11. Університет Святого Володимира (1915 р.)

Особливо гостра класова боротьба розгорнулася після революційних подій 1917 року, в часи Української Народної Республіки (УНР), Гетьманату, Директорії (1917-1919 рр.) та в період німецької, денікінської, більшовицької окупації. Як відомо, до революції в нашій державі не було жодної української школи.

Після ліквідації самодержавства наполегливі вимоги українських студентів і викладачів, пов'язані з відкриттям українознавчих кафедр і запровадженням української мови викладання, змусили нову владу в Петрограді піти на окремі поступки. 27 червня 1917 р. Міністерство народної освіти розробило положення про відкриття в Університеті Святого Володимира чотирьох українознавчих кафедр. 5 вересня 1917 р. відповідне подання Міністерство спрямувало Тимчасовому уряду. 19 вересня 1917 р. уряд прийняв постанову про створення українознавчих кафедр у Київському університеті. Однак у січні 1918 р. політичні події, що розгорнулися в Україні, відтіснили ці проблеми на задній план.

Зі створенням у Києві Центральної Ради у березні 1917 р. десятки викладачів і сотні студентів університету взяли активну участь у боротьбі за незалежність України. Найгероїчнішою сторінкою цих самостійницьких змагань став подвиг студентів Київського університету, здійснений під Крутами. На початку січня 1918 р. на заклик лідерів Української Народної Республіки (УНР) понад триста київських студентів і гімназистів об'єдналися в студентський курінь. Перша сотня добровольців (130 осіб) під командуванням сотника-

студента Андрія Омельченка вела важкі оборонні бої, захищаючи 29 січня 1918 р. важливий залізничний вузол – станцію Крути на Чернігівщині, стримуючи наступ російських більшовицьких частин на Київ.

За часів УНР було відкрито Київський народний університет, що працював в стінах університету Св. Володимира в другу зміну. У період існування Української держави за Гетьмана П.Скоропадського Університет Святого Володимира набув офіційного статусу російського університету Києва. Поряд з ним, у липні 1918 р. було створено Київський український державний університет. Весь цей час на фізико-математичному факультеті працювали кафедри ботаніки, зоології та порівняльної анатомії, штати яких були недоукомплектовані. В надзвичайно важких умовах продовжував свою роботу і зоомузей університету. Під час Першої світової війни у 1915 р. Музей було евакуйовано до Саратова. Після повернення додому він тільки у 1917 р. розпочав відновлювати свою експозицію та наново упорядковувати фондові колекції. Незважаючи на несприятливі матеріальні обставини доби Незалежності експозицію було відновлено і саме улітку-восени 1918 р. в незалежній Українській Державі Музей знову відчинив двері для широкої публіки, яка потужним потоком наповнила експозицію. У добу Незалежності 1917-1921 рр. Музей стає ініціатором багатьох цінних починань у справі вивчення фауни України, видатна роль у цьому належала С.Ю. Кушакевичу.

У лютому 1919 р. більшовики зайняли Київ. Університет Святого Володимира та Київський український державний університет було об'єднано в одну установу – Київський університет – із головним завданням підготовки радянської інтелігенції [2, 12, 13].

З 1919 р. на території радянської України починає діяти Народний комісаріат освіти, що відповідав за розвиток шкільної, середньої та вищої освіти. В університетах скасовувалися всі так звані "буржуазні пережитки", а самі вони втратили будь-яку автономію: було ліквідоване керівництво університетів (ректори, проректори), замість них вводилась посада комісара вузу, крім цього, відмінялись всі вчені ступені та звання. Проте, навіть у такому вкрай обмеженому вигляді університети, на думку керівників Наркомату освіти УРСР, не мали права на існування. Вони були оголошені "буржуазними" центрами, і внаслідок цих реформ у 1920 р. Київський університет (поряд з іншими університетами України) було розформовано. На базі медичного факультету було організовано окремий медичний інститут, юридичний факультет передано Інституту народного господарства.

Таким чином, весна 1920 р. була останньою в історії університету Святого Володимира. Більшовики ліквідували всі університети. За розпорядженням Наркомосвіти УРСР №38 від 23 липня 1920р. на базі університету, ліквідованого цим же розпорядженням, було створено Вищий інститут народної освіти ім. Драгоманова (ВІНО), який з 1926р. також називався Київський інститут народної освіти (КІНО). В ньому функціонував шкільний факультет, що мав відділ природничих наук з підвідділом органічної природи та циклами: ботанічним, зоологічним та антропологічним [13]. Зокрема, у звіті Вищого інституту народної освіти (ВІНО), датованому 1 вересня 1921 р. йдеться: "... ВІНО ім. Драгоманова поділяється на такі факультети, відділи та цикли:

І. Факультет шкільної освіти: А. Відділ гуманітарний: цикли: 1) філософський, 2) лінгвістичний, 3) літературний, 4) історичний, 5) історії мистецтва, 6) історико-соціальний. В. Відділ природничий: а) Підвідділ фізико-математичний: цикли: 7) математичний, 8) механічний, 9) фізичний, 10) астрономо-геодезичний, 11) геофізичний. б) Підвідділ неживої природи: цикли: 12) хімічний, 13) геологічний. В) Підвідділ живої природи: цикли:

14) ботанічний, 15) зоологічний, 16) антрополого-географічний..." [3].

У радянський час після ліквідації Київського університету до складу створеного натомість Київського інституту народної освіти ввійшов і зоомузей. Проте у складі КІНО зоомузей не розвивався, цього не потребував новий заклад, де читання курсу зоології було значно скорочено. Хронічна нестача у КІНО коштів на зарплату призвела до того, що працівники колишнього університетського зоомузею масово переходили на роботу до Української академії наук, передаючи до зоомузею УАН свої колекційні матеріали. Та незважаючи на майже п'ятнадцятирічній КІНО-поневір'яння, зоомузей вижив як окремий просвітницький та науковий підрозділ і дочекався часів, коли 1933 р. радянська влада змусила була відновити Київський університет (Постанова РНК УРСР про організацію на Україні державних університетів від 10 березня 1933 р.) [3].

Слід відмітити, що майже щороку змінювалася структура ВІНО. Коли вузи змушені були включитися за рішенням партії в боротьбу за колективізацію сільського господарства в 1929 р. було сформовано агробіологічний факультет [14]. В 1930 р. на базі ВІНО було створено три інститути – Інститут соціальної освіти (згодом Київський педагогічний інститут ім. О.М.Горького), Інститут професійної освіти та Фізико-хіміко-математичний інститут. Деякий час Інститут професійної освіти мав в своєму складі агробіологічний факультет. Та не зважаючи на багаторазові реорганізаційні зміни, завжди серед основних дисциплін в навчальних планах були курси ботаніки, анатомія і фізіологія рослин, зоологія хребетних, зоологія безхребетних, анатомія і фізіологія людини [15].

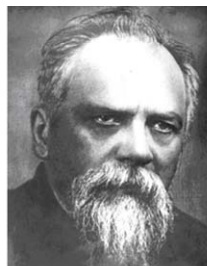
Серед відомих вчених, що успішно працювали у ВІНО, КІНО були – академіки АН УРСР О.В.Фомін, І.І.Шмальгаузен, М.Г.Холодний, професори – В.В.Фінн, Д.К.Зеров, П.Ф.Оксіук, М.М.Воскобойніков, В.М. Артоболевський (рис. 11). Весь цей нелегкий час продовжував працювати М.Г.Холодний. Багато часу приділяв М.Г.Холодний підготовці молодих кадрів, навчальній роботі на кафедрі фізіології та анатомії рослин. Лише за ці роки під його керівництвом закінчили аспірантуру 15 осіб. Це були представники сільської інтелігенції, майбутні вчителі, в основному українці.



О.В. Фомін



В.В. Фінн



В.М. Артоболевський

Рис.11. Відомі вітчизняні вчені, які працювали у ВІНО

В 1925 р. в університеті зазвучала українська мова, спробував викладати українською і М.Г.Холодний. Вже через рік він настільки оволодів нею, що не лише став писати українською свої праці, а й здійснював переклади з російської, німецької та редагування наукової та навчальної літератури. Враховуючи заслуги М.Г. Холодного у справі відродження української культури в після-революційні роки – викладання бездоганною українською мовою, робота над науковою термінологією, редагування підручників, написання науково-популярних

статей для робітників і селян, лекторська діяльність, вагомі успіхи в науковій роботі, визнання їх світовою науковою громадськістю, Київський інститут народної освіти та академік О.В.Фомін рекомендували його кандидатуру для обрання дійсним членом АН УРСР. Як академік з 1929р. він очолив науково-дослідну кафедру фізичної фізіології рослин в системі Академії та керував відділом фізіології рослин Інституту ботаніки в системі УпрНауки, а пізніше, – сектором фізіології рослин в реорганізованому в 1934р. Інституті ботаніки АН УРСР [5].

Проте в навчальних планах ВІНО, КІНО фахові дисципліни були на останньому місці. Було запроваджено хибну лабораторно-бригадну систему навчання, практику "колективного" складання іспитів тощо [12]. Згідно раніше прийнятої хибної постанови Наркомосвіти УРСР вузи повинні займатися лише навчальною роботою, тоді як наукова робота мала бути зосереджена в АН УРСР. Це заважало розвитку наукових досліджень у вузах. У результаті кардинальної реформи вища освіта України почала суттєво відрізнялася від вищої школи в радянській Росії. Зокрема, у РРФСР університети, хоч і втратили своє значення, ліквідовані не були і працювали у Москві, Ленінграді та інших російських містах. Тому уніфікація стала одним із найважливіших завдань політики радянської влади в освітній галузі на рубежі 1920-30-х рр. Необхідно було перебудувати всю вищу систему освіти за єдиним російським зразком.

Відсутність класичної університетської освіти призвела також до зменшення кількості наукових і професорсько-викладацьких кадрів, втрати університетських освітніх і наукових традицій та падіння загального рівня вищої освіти, адже за весь період після закриття університетів їм не було знайдено рівноцінного заміника. Загалом, стала очевидно неспроможність радянської влади успішно організувати діяльність вищих навчальних закладів, не спираючись на позитивний досвід революційної вищої освіти.

В поліпшенні якості роботи вищої школи в УРСР вагомою стала Постанова ЦВК СРСР від 19 вересня 1932 р. та РНК СРСР від 11 жовтня 1932 р. "Про учбові програми і режим у вищій школі і технікумах". Для її виконання було розпочато роботу щодо підвищення рівня теоретичної і практичної фахової підготовки випускників вузів. Та найважливішим був той факт, що Постанова передбачала відтворення університетів у тих республіках, де вони були відсутні, в тому числі і в Україні. Зокрема, у "Постанові РНК УРСР про організацію в Україні державних університетів", датованій 10 березня 1933 р. йдеться: "...1. Організувати на Україні у віданні Народного Комісаріату освіти УРСР державні університети як вищі навчальні заклади, що готують висококваліфікованих фахівців загальнонаукових дисциплін та викладачів у середніх навчальних закладах... 2. Відкрити університети в Харкові, Києві, Одесі та Дніпропетровську від 1 вересня 1932 року, організуючи їх на базі фізико-хімічних інститутів та інститутів профосвіти, що є в цих містах у складі таких факультетів:...б) Київський університет: фізико-математичний, природничий, хіміч-

ний, географічний, філософсько-історичний та літературно-лінгвістичний..." [3].

Згідно з даною Постановою колегія Наркомосвіти УРСР ухвалила з вересня 1933 року відкрити в Києві на базі Інституту професійної освіти та Фізико-хіміко-математичного інституту Київський державний університет (в складі 6 факультетів, серед яких був і біологічний (природничий). Водночас було відкрито Харківський, Одеський та Дніпропетровський університети. Перед ними ставилося завдання підготовки через аспірантуру викладачів для вищої школи, науковців для науково-дослідних інститутів, заводських наукових лабораторій і дослідних станцій. Ці вищі навчальні заклади мали зосередити підготовку наукових кадрів для всіх найважливіших галузей науки.

Тринадцятирічний період різноманітних експериментів з вищою освітою в Україні закінчився. Живучи в постійних злиднях, переслідувані й репресовані за абсурдними звинуваченнями, професорсько-викладацький склад Університету зумів відновити університетську освіту. У 1934 р. Київський державний університет відзначив свій 100-річний ювілей. На той момент було відновлено його структуру, розпочато активну наукову та педагогічну діяльність.

Список використаних джерел

1. Гамалія В.М. Розвиток мікології та фітопатології в Київському університеті у другій половині XIX ст. Вісник НТУ"ХПІ", 2013, №10 (984, – с.13-20)-?
2. Історія Київського університету. – К., 1959. – Вид.КДУ, с. 617.
3. Киевский университет : документы и материалы. 1834-1984 / [сост. В. А. Замлинский; ред. кол. : М. У. Белый, Л. В. Губерский, И. И. Ляшко и др.]. – Киев, 1984. – 191 с.
4. Миловидов Л. Проекти університету у Києві у другій половині XVIII ст. "Київські збірники історії й археології, побуту й мистецтва". – К., 1931.
5. Мусієнко М.М. Золоті імена України, народжені університетом імені Святого Володимира: Микола Григорович Холодний. Укр.Ботан. журн., 2003. – Т.60. – №3. – с.326-347.
6. Навашин С.Г. Автобіографія. Журн. Рус. Бот.об-ва., 1928. – Т.18. – №1-2. – с.7-14.
7. Нариси історії біологічного факультету. – К., 2004, Фітосоціоцентр, 276 с.
8. НАРОДЖЕНІ УКРАЇНОЮ. Меморіальний альманах. У 2-х т. – К.: ЄВРОІМДЖ, 2002. – Т.2. – С. 210–211.
9. Розвиток науки в Київському університеті за 100 років. – К.: вид.КДУ, 1935. – 325 с.
10. Романець О.В. Наукова школа С. Г.Навашина в галузі цитогенетики Наука і наукознавство, 2013. – №3. – с. 112-121.
11. Селецкий П.Д. Записки, ч.1, 1821-1846 гг. – К., 1884.
12. ЦДАРЖ УРСР, ф.166, оп.18, 1932, спр.155, арк.31.
13. ЦДАРЖ УРСР, ф.166, оп.3, 1920, спр.324, арк.82.
14. ЦДІАЛ, ф.733, оп.69, 1833 р., спр.111, арк.64.
15. ЦДІАЛ, ф.744, "Височайші" укази, рескрипти і "найпідданіші" доповіді по міністерству народної освіти(колекція), оп.1, 1833.

Надійшла до редколегії 17.03.14

Н. Мусієнко, д-р биол. наук, проф., акад. НААН України, Л. Остапченко, д-р биол. наук, проф.,
Н. Таран, д-р биол. наук, проф., Л. Батманова, канд. биол. наук, ст. науч. сотр., В. Стороженко, канд. биол. наук
КНУ імені Тараса Шевченка, Київ

УНІВЕРСИТЕТ СВЯТОГО ВЛАДИМИРА – КИЕВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ: ГЕНЕЗИС БИОЛОГИЧЕСКОЙ НАУКИ (1834-1933)

Приведены исторический очерк развития биологической науки в Киевском национальном университете имени Тараса Шевченко за период с 1834-1933 годы.

Ключевые слова: биологические науки, история, генезис.

M. Musienko, Dr. of Sci., Prof., Academician of National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine,
L. Ostapchenko, Dr. of Sci., Prof., N. Taran, Dr. of Sci., Prof., L. Batsmanova, PhD, Senior Research Scientist, V. Storozhenko, PhD
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv

FROM ST.VOLODYMYR UNIVERSITY TO KYIV STATE UNIVERSITY – THE GENESIS OF BIOLOGICAL SCIENCE (1834-1933)

The historical overview of the development of biological science at the Kiev National Taras Shevchenko University for the period 1834-1933 years was given.

Key words: biological science, history, genesis.

УДК 571.27 + 57.083.322 + 616-056.3

О. Галкін, канд. біол. наук, М. Михальчук, студ.
Національний технічний університет України "Київський політехнічний інститут", Київ,
В. Казмірчук, д-р мед. наук
Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, Київ,
Ю. Гурженко, д-р мед. наук
Інститут урології НАМН України, Київ

РОЗРОБКА І ПОРІВНЯЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РІЗНИХ МОДИФІКАЦІЙ ІМУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛІЗУ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ СПЕЦИФІЧНИХ ІgE-АНТИТІЛ

Розробка та порівняльне дослідження різних модифікацій імуноферментного аналізу (ІФА) для визначення специфічних ІgE-антитіл. Біохімічний синтез кон'югатів антитіл та антигенів, ІФА. Проведено теоретичне обґрунтування доцільності використання ІФА для виявлення специфічних ІgE-антитіл; здійснено наукову розробку та порівняльну характеристику двох модифікацій ІФА для виявлення специфічних імуноглобулінів класу ІgE до профіліну пилку берези Bet v 2 та білку теплового шоку Chlamydia trachomatis HSP-60: непрямого варіанту й ІgE-"пастки" (з і без використання системи авідин-біотинового підсилення сигналу). Доведено, що за показниками інформативності аналізу (специфічність, чутливість, відтворюваність) непрямий ІФА не забезпечує ефективне визначення специфічних ІgE-антитіл; показано, що модифікація ІФА ІgE-"пастка" характеризується задовільними аналітичними показниками аналізу як з, так і без авідин-біотинового підсиленням сигналу.

Ключові слова: ІgE, антитіла, імуноферментний аналіз, алергени.

Вступ. Алергічними захворюваннями (АЗ) страждає від 10% до 30% населення Землі [1-3]. Дослідження останніх 30 років показали, що поширеність алергопатології у світі безперервно збільшується [4]. Для України частота АЗ в середньому у 30% населення залежно від стану природного навколишнього середовища, клімату, розвитку виробництва у певних регіонах [5].

Роль імунної системи полягає в захисті організму від патогенних бактерій, вірусів та інших мікроорганізмів. Захисна реакція необхідна для забезпечення опірності організму при початковому контакті з патогенами, а також виробленні специфічної імунної відповіді. Всім алергічним реакціям (гіперчутливість негайного типу) передують безсимптомна фаза початкового контакту, під час якої утворюються специфічні імуноглобуліни класу Е (ІgE-антитіла). При повторному контакті з алергенами, що запускають реакцію, ці ІgE-антитіла реагують з алергенами і призводять до вивільнення медіаторів (з опасистих клітин або мастоцитів), таких як гістамін, лейкотрієни, простагландини тощо, які призводять до розвитку симптомів алергії [6, 7].

Як правило, специфічна діагностика алергії проводиться на основі збору даних сімейного та особистого анамнезу, за результатами шкірного тесту і провокаційних проб. Для підтвердження діагнозу і виявлення патогенетичних механізмів захворювання ключову роль відіграють лабораторні методи дослідження [8, 9].

Загальний імуноглобулін Е (ІgE) не вважається лабораторним маркером atopічних захворювань. Atopічний (ІgE-залежний) механізм може лежати в основі кропив'янки, деяких форм васкулітів тощо. Алергічні реакції на деякі лікарські засоби також розвиваються за ІgE-залежним механізмом. При всіх перерахованих вище станах синтез високих титрів специфічних антитіл класу ІgE може призводити до підвищення рівня загального ІgE в сироватці. Крім atopічних захворювань, загальний ІgE сироватки крові значно підвищується при паразитарних інвазіях та мікозах [9].

Проведення ефективних лікувально-профілактичних заходів у пацієнтів з алергічними захворюваннями має здійснюватися з урахуванням достовірної інформації про те, на які конкретно алергени відзначається сенсibilізація у хворого [10]. У випадку прояву алергічної реакції доцільно визначення алергічного агента, що став причиною реакції, шляхом виявлення специфічних антитіл класу ІgE в сироватці крові [5, 11, 12]. Цей підхід також можна використовувати для визначення безсимптомної сенсibilізації. У зв'язку з цим особливої актуальності набуває достовірна специфічна діагностика

алергії з визначенням причинних алергенів у кожному конкретному випадку [5].

Очевидно, що для вирішення завдання специфічної лабораторної діагностики алергії необхідні адекватні in vitro методи для виявлення ІgE-антитіл до конкретних алергенів, серед яких найбільш поширеним є імуноферментний аналіз (ІФА). Разом з тим, в літературі [5, 13-16] описані різні модифікації ІФА для виявлення специфічних ІgE людини. Різні фірми-виробники також пропонують для використання в лабораторній службі імуноферментні діагностичні набори, засновані на різних варіантах ІФА.

Метою роботи була розробка та порівняльна характеристика різних модифікацій імуноферментного аналізу для визначення специфічних ІgE-антитіл.

Матеріали і методи. Алергени (антигени). У даній роботі використовували такі алергени. Рекомбінантний алерген пилку берези *Betula verrucosa* – профілін rBet v 2 (INDOOR Biotechnologies Inc., США), отриманий у *E. coli*, молекулярна маса 14 кДа, очищений афінною хроматографією на полі-L-проліні та іонообмінною хроматографією, чистота в електрофорезі у поліакриламідному гелі (ПААГ) з додецилсульфатом натрію (ДСН) – не менше 90% [17]. Рекомбінантний білок теплового шоку *Chlamydia trachomatis* rHSP-60 (ТОВ "Агробіомед", Росія), отриманий у *E. coli*, молекулярна маса 60 кДа, очищений імуноафінною хроматографією, чистота в електрофорезі в ПААГ з ДСН – не менше 90%.

Моноклональні антитіла до ІgE людини. Моноклональні антитіла (МКАТ) були раніше отримані за короткостроковою схемою імунізації (7-8 днів): антиген вводили в подушечки задніх лапок мишей у сумарній дозі 50 мкг ІgE на тварину, перші дві ін'єкції здійснювали з повним ад'ювантом Фрейнда (Sigma, США), а третю – без ад'юванта. Гібридизацію проводили з використанням лімфоцитів, отриманих з регіонарних лімфатичних вузлів мишей. Детально дані дослідження описані раніше [18,19]. У складі імуноферментного кон'югату використовували МКАТ 165C12 (ізотип ІgG1, титр в культуральній рідині 1:1000, константа афінності $2,0 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$), а для сорбції (антитіла "захоплення") використовували МКАТ 164H10 (ізотип ІgG1, титр в культуральній рідині 1:1000, константа афінності $2,8 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$).

Контрольна панель сироваток. Для розробки та порівняльної характеристики різних варіантів ІФА нами попередньо були сформовані контрольні панелі сироваток. Для оцінки ІФА для визначення ІgE-антитіл до профіліну Bet v 2 використовували 10 сироваток пацієнтів з полінозом (сезонний алергійний ринокон'юнктивіт), що виявляється в кінці квітня – початку травня (період

цвітіння берези та інших дерев), і рівнем загального IgE до 500 МО/мл. У якості позитивних зразків для характеристики ІФА для визначення IgE до білка теплового шоку *Ch. trachomatis* використовували 10 сироваток, позитивних на IgG-антитіла до HSP-60, а з вмістом загального IgE не менше 50 МО/мл. Панель негативних сироваток була отримана від 20 донорів, які не мають в анамнезі алергічних захворювань; кожен зразок був негативним на IgG-антитіла до HSP-60, а рівень загального IgE не перевищував 20 МО/мл. Контрольні зразки були атестовані за II Міжнародним стандартом WHO 75/502.

Біотинування білків. Біотинування антитіл та алергенів (антигенів) проводили за J. Goding [20]. До 0,9 мл розчину антитіл у концентрації 1 мг/мл, після діалізу протягом 12 годин проти 0,1 М карбонатно-бікарбонатного буфера pH 8,6, додавали 0,1 мл диметилсульфоксиду, що містить 0,1 мг N-гідроксисукцинімідного ефіру амінокапроїдбіотину. Після чотирьох годин інкубації в темноті при кімнатній температурі. Для зупинки реакції додавали 1 М розчин хлориду амонію (20 мкл на 1 мг антитіл) і діалізували проти фосфатно-сольового буферного розчину (ФСБ), що містить 0,1% азиду натрію, з метою видалення ефіру біотину, що не зв'язався, при +4 °C протягом 12-14 годин. Біотинування алергенів (антигенів) проводили за аналогічною схемою.

Отримання олігомерного кон'югату стрептавідин-пероксидаза проводили за базовою методикою [21] з модифікаціями [22]. 40 мг пероксидази хрому (лужна ізоформа) (Sigma, США) розчиняли в 2 мл води, додавали 200 мкл 0,25 М NaIO₄ та інкубували при кімнатній температурі 20 хв у темноті. До розчину додавали 1/3 об'єму сухого сефадексу G-15 та перемішували 10 хв у темноті при кімнатній температурі. Отриману суспензію центрифугували 5 хв зі швидкістю 4000 об/хв при кімнатній температурі. Супернатант відбирали, а осад сефадексу G-15 промивали 0,5 мл води і знову центрифугували. Супернатант об'єднували і діалізували проти 0,1 М боратного буфера (pH 9,4) 2 год при 4 °C. Для амінування пероксидази хрому (ПХ) до 1 мл окисленої пероксидази (концентрація приблизно 10 мг/мл) додавали етилендіамін до концентрації 25 мМ і аскорбат натрію до концентрації 2,5 мМ, інкубували 2 год при кімнатній температурі і діалізували ніч проти 0,1 М боратного буфера, pH 9,4, при 4 °C. Спектрофотометрично визначали концентрації амінованої й окисленої ПХ, змішували у співвідношенні 3:1, 1:1 і 1:3 за масою та інкубували 2 год при кімнатній температурі. Додавали стрептавідин, віддіалізований проти 0,1 М боратного буфера, pH 9,4, у співвідношенні пероксидаза : стрептавідин 2:1 – 10:1 за масою та інкубували 3 год при кімнатній температурі в темноті. Потім додавали аскорбат натрію до концентрації 2,5 мМ, інкубували 2 год при кімнатній температурі і діалізували проти ФСБ ніч при 4 °C. Кон'югат використовували без подальшого фракціонування.

Синтез пероксидазного кон'югату антитіл. Кон'югування МКАТ з ПХ проводили у ваговому співвідношенні антитіл до ферменту 2:1 методом періодатного окислення за P. Tijssen [21] з модифікаціями. Пероксидазу хрому (Sigma, США) розчиняли в 0,1 М бікарбонатному буфері (pH 8,3) до концентрації 15 мг/мл та додавали рівний об'єм водного розчину періодату натрію з концентрацією 14 мМ. Для окислення ПХ суміш інкубували 2 год при кімнатній температурі. Отриманий розчин окисленої ПХ змішували з розчином антитіл, попередньо віддіалізованих проти 0,1 М карбонатного буфера (pH 9,2). Суміш переносили в хроматографічну колонку й додавали 1/3 частину сухого сефадексу G-25,

інкубували 30 хв при кімнатній температурі. Розчин кон'югату елюювали з колонки і додавали 1/20 об'ємної частини водного розчину NaBH₄ (5 мг/мл). Для зупинки реакції суміш залишали на 30 хв при кімнатній температурі, додавали ще 3/20 частини розчину NaBH₄, інкубували 60 хв. Отриманий розчин пероксидазного кон'югату МКАТ діалізом переводили в 0,02 М фосфатний буфер, що містить 0,15 М NaCl.

Синтез пероксидазних кон'югатів рекомбінантних білків-алергенів. Кон'югування рекомбінантних білків rBet v 2 і rHSP-60 з ПХ проводили шляхом N-гідроксисукцинімід ефір-малеїмід опосередкованим методом [23, 24]. Для цього використовували гетеробіфункціональний реагент – сульфо-сукциніміділ-4-(N-малеїмідометил)-циклогексан-1-карбоксилат (Sulfo-SMCC). Реакцію проводили за G. Hermanson [23] з невеликою модифікацією. З препаратів рекомбінантних білків rBet v 2 та rHSP-60 видаляли компоненти буфера за допомогою гель-фільтрації на колонці з сефакрилом S-300. На першій стадії кон'югації проводили активацію пероксидази sulfo-SMCC, sulfo-SMCC, що не прореагував, та інші низькомолекулярні продукти видаляли шляхом гель-фільтрації на колонці з сефакрилом S-300. На другій стадії кон'югації проводили реакцію maleїмідної групи, приєднаної до активованої ПХ, з сульфгідрильними групами рекомбінантних білків. Білок, що не прореагував, та інші низькомолекулярні продукти видаляли шляхом гель-фільтрації на колонці з сефакрилом S-300 (2,5 × 100 см). Отриманий розчин кон'югату білків-алергенів діалізом переводили у 0,02 М фосфатний буфер, що містить 0,15 М NaCl.

Твердофазний імуоферментний аналіз. Процедура конкретної модифікації аналізу була об'єктом розробки, разом з тим, ряд етапів аналізу був однаковим, а саме: для відмивання лунок планшетів використовували фосфатно-сольовий буфер з додаванням 0,05% твін-20 (ФСБТ), pH 7,2-7,4; між різними етапами аналізу планшет тричі відмивали ФСБТ і один раз деіонізованою водою; в якості субстрату використовували 0,003% розчин перекису водню в 0,15 М цитратному буфері, pH 5,0, а в якості хромогену – орто-фенілендіамін; реакцію зупиняли 2 М сірчаною кислотою; оптичну густину при довжині хвилі 492 нм/630 нм вимірювали на спектрофотометрі.

Процес адсорбції антигенів оцінювали за інтенсивністю реакцій з контрольними специфічними і негативними сироватками. Для кількісної оцінки аналізу використовували індекс позитивності (ІП) – відношення середньої оптичної густини (ОГ) позитивних контрольних зразків до граничного значення (ГЗ) оптичної густини; ГЗ розраховували як суму середнього арифметичного ОГ негативних зразків і трьох середньоквадратичних відхилень значень ОГ негативних зразків.

Статистичну обробку результатів проводили з використанням t-критерію Ст'юдента. Дослідження проводили із дотриманням міжнародних та національних біоетичних рекомендацій.

Результати та їх обговорення. Теоретична характеристика різних модифікацій ІФА для виявлення специфічних IgE-антитіл. Перший *in vitro* тест для визначення специфічних до алергенів імуноглобулінів класу E – радіоаллергосорбентний тест (РАСТ) – був запропонований в 1967 році [25]. Деякий час по тому з'явилися аналоги РАСТ на основі імуоферментного аналізу. Однак чутливість цих методів була обмежена низькою сорбційною здатністю твердої фази (використовувалися, як правило, прості целюлозні диски). Процедура інкубації кожної стадії займала від 3-х до 18-ти годин, автоматизація була мало ймовірна, застосовувався напівкількісний спосіб оцінки результатів (у

класах), та й утилізація радіоактивних відходів була проблематичною [26].

У 1990-і роки були розроблені тест-системи другого покоління, які широко використовуються в практиці до цього часу, для напівавтоматизованого кількісного визначення специфічних IgE. У таких тест-системах застосовуються різноманітні технології детекції, різні носії, екстракти алергенів і типи антитіл. Використання наборів від різних фірм-виробників з різними характеристиками призвели до отримання суперечливих результатів аналізів, що в свою чергу викликало низку запитань та невдоволення практичних лікарів. Тому однією з основних методичних проблем визначення IgE-антитіл є питання відповідності результатів лабораторного тестування з клінічною симптоматикою і алергологічним анамнезом [26, 27].

Тест-системи другого покоління за технологічними параметрами можна поділити на ті, в яких алерген іммобілізований на твердій фазі [13, 16], і системи в яких алерген знаходиться в рідкій фазі [14, 15]. При викорис-

танні твердофазних алергенів складність представляє тип твердої фази, що забезпечує максимальну сорбційну ємність і доступність алергену для молекул IgE. Крім того, можливо припустити, що при сорбції алергену на тверду фазу можуть відбуватися його конформаційні зміни, що, у свою чергу, може негативно позначатися на специфічності подальшої реакції "антиген-антитіло". Отже системи з рідкими алергенами мають незаперечну перевагу. На рис. 1 наведені описані в літературі модифікації ІФА для виявлення специфічних IgE-антитіл. У рамках поставленого завдання нами була проведена розробка та порівняльна характеристика чотирьох модифікацій ІФА для виявлення IgE людини до алергену пилку берези – профіліну Bet v 2, який опосередковує алергічні реакції і перехресну реактивність між неспорідненими рослинами [28, 29], і білку теплового шоку *Ch. trachomatis* (heat shock protein 60, HSP-60), який будучи консервативним внутрішньоклітинним білком опосередковує перехресну реактивність між філогенетично віддаленими видами [30, 31].

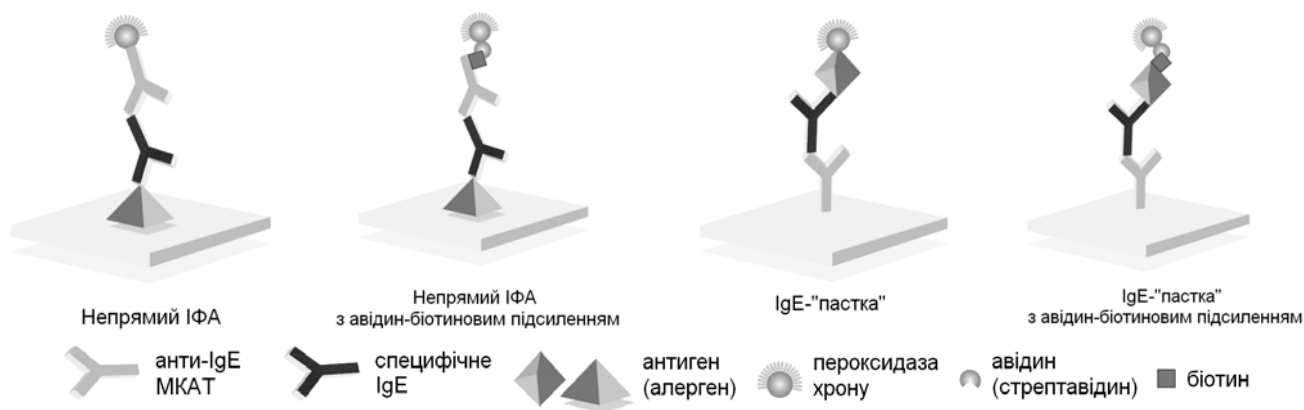


Рис. 1. Модифікації ІФА для виявлення специфічних IgE-антитіл

Розробка та характеристика непрямого ІФА. Оскільки чутливість ІФА залежить від цілого ряду фізико-хімічних факторів (температура, йонна сила і рН реакційного середовища, концентраційні співвідношення компонентів і тривалість їх взаємодії), при конструюванні тест-систем використовували емпіричний підбір оптимальних параметрів постановки тесту.

Конструювання імуноферментного набору включало пошук оптимальних параметрів тест-системи, від яких залежать чутливість і специфічність проведеної реакції. Важливими чинниками у розробці тест-системи були вибір типу твердої фази, а також визначення умов адсорбції на твердій фазі, тобто встановлення оптимальної концентрації антигену, складу сенсibilізуючого буфера, умов відмивання не зв'язаних компонентів, часу і температури зв'язування імуноглобулінів з поверхнею лунок полістиролових планшетів, робочої дози імуноферментного кон'югату. Для розробки використовували полістиролові 96-лункові планшети серії Nunc виробництва Thermo Scientific, США. Для конструювання непрямого ІФА нами був обраний планшет типу MaxiSorp, призначений для сорбції гідрофільних білків-антигенів з невисокою молекулярною масою; даний вид планшета характеризується високою сорбуючою здатністю (600-650 нг IgG/см²).

Для підбору оптимальних умов сорбції оцінювали інтенсивність імуноферментної реакції при різних концентраціях антигену в розчині. Нестача антигенів призводить до зниження чутливості тесту, а надлишок до перевитрати дорогого реагенту. На достовірність результатів ІФА впливає неспецифічне зв'язування реагентів з вільними сайтами полістиролових планшетів. У

наших експериментах ми досліджували різні кількості антигенів в інтервалі 1 ÷ 20 мкг/мл. Найбільш оптимальний рівень насичення поверхні планшетів досягався при концентрації профіліну rBet v 2 рівної 10 мкг/мл і концентрації білка rHSP-60 рівною 5 мкг/мл, при цьому з сироватками негативної панелі антигени реагували негативно. Разом з тим, значення індексу позитивності для сироваток позитивної панелі були досить низькі, а саме: при виявленні IgE антитіл до Bet v 2 середнє значення ІП складало 1,52 (ІП_{мін} = 0,94, ІП_{макс} = 1,74), а при виявленні IgE антитіл до HSP-60 середнє значення ІП складало 1,12 (ІП_{мін} = 0,82, ІП_{макс} = 1,25) (рис. 2). Отримані дані свідчили про недоцільність подальшої оптимізації умов проведення аналізу через його вкрай низьку вихідну інформативність (чутливість і специфічність). Причиною отриманих результатів, швидше за все, є конкуренція за сорбований на твердій фазі антиген між антитілами різних класів. Враховуючи той факт, що абсолютна концентрація IgE антитіл навіть у сироватках людей з алергічними захворюваннями на 2-3 порядки нижче вмісту антитіл класу IgG, непрямий ІФА не забезпечує належного рівня виявлення специфічних антитіл. Можливо припустити, що використання даної модифікації ІФА буде більш ефективним за участю авідин-біотинового підсилення (АБП) сигналу аналізу.

Розробка та характеристика непрямого ІФА з авідин-біотиновим підсиленням. Конструювання імуноферментного набору проводили на основі результатів попередніх експериментів з розробки непрямого ІФА. З метою зниження неспецифічної взаємодії на етапі інкубації досліджуваних зразків ми знизили температу-

ру інкубування до 20-25 °C (кімнатна температура) і збільшили тривалість до 2 ч. На наступному етапі, нами були оптимізовані умови реакції біотинування анти-IgE-антитіл з IgE-антитілами позитивних сироваток. Найкращі результати були отримані при використанні фосфатно-сольового буферного розчину з 0,05% твіну-20, рН 7,2-7,4, з додаванням негативної сироватки людини (20%) і казеїну (100 мг/мл) (табл. 1). Аналогічний буферний розчин був використаний і для інкубації кон'югату стрептавідин-пероксидаза. Розроблений ІФА забезпечував негативний результат при тестуванні всіх сироваток негативною панелі. Значення ІП для сироваток позитивної панелі було дещо вище, ніж у випадку ІФА без АБП: при виявленні IgE антитіл до Bet v 2 середнє значення ІП склало 1,71 (ІП_{min} = 1,05, ІП_{max} = 1,97), а при виявленні IgE антитіл до HSP-60 середнє значення ІП склало 1,24 (ІП_{min} = 0,98, ІП_{max} = 1,48) (рис. 2).

Розробка та характеристика ІФА модифікації IgE-"пастка". Даний варіант ІФА передбачає фіксацію на твердій фазі IgE людини із сироватки незалежно від їх специфічності. З цією метою МКAT 164Н10 проти IgE людини [18] в 0,05 М карбонат-бікарбонатному буферному розчині (КБР), рН 9,6, протягом 12 год при 4 °C сорбували на поверхні полістиролових планшетів Nunc MediSorp (згідно з паспортними даними планшети призначені для сорбції гідрофільних білків, зокрема імунно-

глобулінів, характеризуються сорбційною здатністю в діапазоні 500-600 нг IgG/см² і забезпечують низьку неспецифічну активність при тестуванні сироваток та плазми крові людини). Концентрація анти-IgE МКAT була обрана на підставі попередньої серії експериментів [19] і становила 2 мкг/мл. Подальші умови проведення аналізу були вибрані на підставі результатів попередніх етапів дослідження (наведено в табл. 2). Розроблений ІФА IgE-"пастка" забезпечував негативний результат при тестуванні всіх сироваток негативною панелі, а значення ІП для сироваток позитивної панелі було відчутно вище, ніж у випадку непрямих варіантів ІФА. Так при виявленні IgE антитіл до Bet v 2 середнє значення ІП склало 3,22 (ІП_{min} = 1,66, ІП_{max} = 4,21), а при виявленні IgE антитіл до HSP-60 середнє значення ІП склало 2,45 (ІП_{min} = 1,44, ІП_{max} = 2,96) (рис. 2).

Для даної модифікації ІФА було проведено визначення чутливості аналізу: зразки IgE людини із концентрацією 0; 0,1; 0,5; 1; 5 МО/мл (атестовані за II Міжнародним стандартом WHO 75/502) інкубували у лунках планшети із іммобілізованими анти-IgE МКAT, а утворений комплекс виявляли за допомогою кон'югату анти-IgE-ПХ. Границя чутливості аналізу для виявлення специфічних до профіліну Bet v 2 та білку теплового шоку *Ch. trachomatis* IgE-антитіл не перевищувала 0,5 МО/мл.

Таблиця 1. Оптимізація параметрів інкубації біотинільованих реагентів у непрямому ІФА з авідин-біотиновим підсиленням сигналу

Склад розчину для розведення кон'югату	К+середнє	К-середнє	ГЗ
ФСБТ, рН 7,2-7,4	0,982±0,320	0,364±0,084	0,371
ФСБТ + негативна сироватка (20%), рН 7,2-7,4	0,975±0,358	0,295±0,077	0,304
ФСБТ + негативна сироватка (20%) + казеїн (100 мг/мл), рН 7,2-7,4	1,002±0,298	0,224±0,070	0,232

Розробка та характеристика ІФА модифікації IgE-"пастка" з авідин-біотиновим підсиленням сигналу. Конструювання імуноферментного набору проводили на основі результатів попередніх експериментів з розробки непрямого ІФА з АБП, а також ІФА модифікації IgE-"пастка". Умови підготовки та проведення аналізу представлені в табл. 2. Розроблений ІФА IgE-"пастка" з АБП забезпечував негативний результат при тестуванні всіх сироваток негативною панелі, а значення ІП для сироваток позитивної панелі було вище, ніж в аналогічному варіанті ІФА, але без авідин-біотинового підсилення: при виявленні IgE антитіл до Bet v 2 середнє значення ІП склало 3,89 (ІП_{min} = 1,79, ІП_{max} = 5,02), а при виявленні IgE антитіл до HSP-60 середнє значення ІП склало 2,92 (ІП_{min} = 1,98, ІП_{max} = 3,56) (рис. 2). Для даної модифікації ІФА також було проведено визначення чутливості аналізу: зразки IgE людини із концентрацією 0; 0,1; 0,5; 1; 5 МО/мл інкубували у лунках планшети із іммобілізованими анти-IgE МКAT, а утворений комплекс виявляли за допомогою біотинільованих анти-IgE МКAT. Границя чутливості даного варіанту ІФА склала 0,1 МО/мл.

Порівняльна характеристика різних модифікацій ІФА. Результати робіт з розробки та характеристики різних модифікацій ІФА для виявлення специфічних антитіл класу IgE до профіліну пилку берези Bet v 2 і білку теплового шоку *Ch. trachomatis* HSP-60 представлені в табл. 2 і на рис. 2. Отримані дані свідчать про непридатність непрямого варіанту ІФА, навіть з використанням системи авідин-біотинового підсилення сигналу, для виявлення специфічних IgE-антитіл до алергенів як рослинного, так й інфекційного походження. У даних дослідженнях, навіть при оптимізації умов аналізу, були отримані негативні результати при тестуванні ряду сироваток позитивної панелі; при тестуванні нега-

тивних зразків були зафіксовані значні "фонові" сигнали (високі значення граничного значення, рис. 2). Головною причиною незадовільних характеристик інформативності непрямого варіанту ІФА, на нашу думку, є недостатній рівень фіксації специфічних IgE-антитіл на твердій фазі через концентраційної конкуренції зі специфічними антитілами інших класів, перш за все IgG, присутніх у сироватках крові. Використання IgE-захоплення для виявлення специфічних IgE-антитіл забезпечувала задовільні показники інформативності ІФА: не було зафіксовано хибнонегативних результатів при тестуванні сироваток позитивної панелі, "фонові" сигнали були значно нижче, ніж у випадку непрямих варіантів аналізу, рівень граничного значення (cut off) був нижче в 4-7 разів. Індеси позитивності для варіантів ІФА IgE-захоплення були достовірно значно вищими у порівнянні із аналогічними показниками для непрямого ІФА (рис. 2), а саме: при виявленні специфічних IgE-антитіл до Bet v 2 ІП для варіантів IgE-захоплення був у 2,12 та 2,27 разів вище (з і без використання системи АБП, відповідно); при дослідженні антитіл класу IgE до HSP-60 *Ch. trachomatis* ІП для варіантів IgE-"пастки" також більш ніж удвічі відрізнялися від таких же показників непрямого ІФА – були у 2,19 та 2,35 разів вище (з і без використання системи АБП, відповідно).

Проведені дослідження щодо встановлення границі чутливості аналізу модифікацій на основі IgE-"пастки" засвідчили, що даний показник знаходиться у діапазоні 0,1÷0,5 МО/мл, що, у свою чергу, є цілком зіставним (має такий самий порядок) із аналогічним показником різних комерційних діагностичних наборів, зокрема "СПЕЦ-IgE-ИФА" (Хема, Росія) та "CARLA-SYSTEM" (RADIM diagnostics, Італія) [32]. Слід зазначити, що обидва досліджених варіанту IgE-захоплення (з і без авідин-біотинового підсилення сигналу) можна визнати

еквівалентно придатними для виявлення специфічних антитіл класу IgE.

Для розробки готових діагностичних наборів та їх серійного випуску важливим є доступність сировини для виготовлення позитивних контрольних зразків, технологічність і простота їх отримання та стандартизації.

Для всіх вивчених варіантів ІФА в якості позитивного стандарту повинні використовуватися людські антитіла до конкретного антигену (алергену). Очевидно, формування пулу сироваток (плазми) людини для наступних виділення і очищення специфічних IgE в промислових масштабах є вкрай складним завданням.

Таблиця 2. Умови підготовки та проведення різних модифікацій ІФА

Характеристика	Модифікації ІФА			
	Непрямий	Непрямий з АБП	IgE-"пастка"	IgE-"пастка" з АБП
Тверда фаза	Nunc MaxiSorp	Nunc MaxiSorp	Nunc MediSorp	Nunc MediSorp
Імобілізуючий розчин	ФСБ, pH 7,2-7,4	ФСБ, pH 7,2-7,4	КБР, pH 9,6	КБР, pH 9,6
Біокомпонент імуносорбенту	rBet v 2 / rHSP-60	rBet v 2 / rHSP-60	анти-IgE МкАт	анти-IgE МкАт
Концентрація білка для сорбції, мкг/мл	10 / 5	10 / 5	2	2
Умови сорбції	12 год, 4 °C	12 год, 4 °C	12 год, 4 °C	12 год, 4 °C
Тривалість і температура інкубації зразків	1 год, 37 °C	2 год, 20-25 °C	1 год, 37 °C	1 год, 37 °C
Розчин для інкубації біотинільованих реагентів	–	ФСБТ + сироватка + казеїн, pH 7,2-7,4	–	ФСБТ + сироватка + казеїн, pH 7,2-7,4
Умови інкубації біотинільованих реагентів	–	1 год, 37 °C	–	1 год, 37 °C
Імуноферментний кон'югат	анти-IgE МкАт + ПХ	Стрептавідин + ПХ	rBet v 2 / rHSP-60 + ПХ	Стрептавідин + ПХ
Умови інкубації імуноферментного кон'югату	1 год, 37 °C	1 год, 37 °C	1 год, 37 °C	1 год, 37 °C

Примітка: вказані умови проведення аналізу для виявлення IgE антитіл до Bet v 2 / HSP-60.

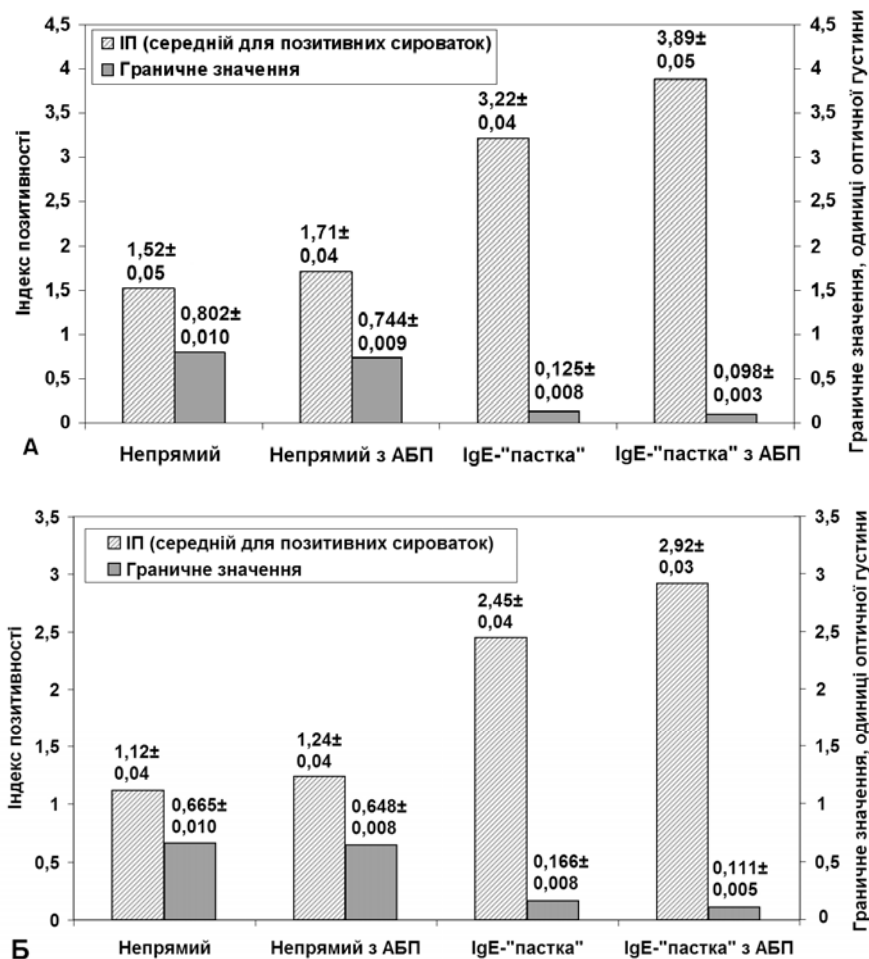


Рис. 2. Порівняльна характеристика аналітичних характеристик різних модифікацій ІФА для виявлення специфічних антитіл класу IgE до профіліну пилку берези Bet v 2 (А) та HSP-60 *Ch. trachomatis* (Б) (представлені середні значення показників аналізу за результатами тестування контрольних панелей сироваток у 4-х повторях, $p < 0,05$)

Висновки. Проведена розробка двох базових модифікацій ІФА для виявлення специфічних антитіл класу IgE до алергену рослинного (профілін пилку берези Bet v 2)

та інфекційного (білок теплового шоку *Chlamydia trachomatis* HSP-60) походження: непрямого варіанту й IgE-"пастки" (з і без використання системи авідин-

біотинового підсилення сигналу). На підставі порівняльної характеристики даних модифікацій за показниками інформативності аналізу непрямий ІФА не є перспективним для визначення специфічних ІgЕ-антител у сироватках (плазмі) крові людини. Модифікація ІФА ІgЕ-"пастка" забезпечує задовільні аналітичні характеристики як з, так і без авідин-біотинового підсилення сигналу. Перспективним видається створення гібридних позитивних контрольних зразків для використання в діагностичних тест-системах з метою виявлення специфічних антител класу ІgЕ до алергенів різного походження.

Список використаних джерел

1. Хаитов Р.М., Ильина Н.И. Аллергология и иммунология. Национальное руководство. Краткое издание. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. – 640 с.
2. Bochner B.S., Rothenberg M.E., Boyce J.A. et al. // Advances in mechanisms of allergy and clinical immunology in 2012 // J. Allergy Clin. Immunol. – 2013. – Vol. 131, 3. – P. 661-667.
3. Burks A.W., Calderon M.A., Casale T. et al. Update on allergy immunotherapy: American Academy of Allergy, Asthma & Immunology/European Academy of Allergy and Clinical Immunology/PRACTALL consensus report // J. Allergy Clin. Immunol. – 2013. – Vol. 131, 5. – P. 1288-1296.
4. Лусс Л.В. Этиология, патогенез, проблемы диагностики и лечения аллергического ринита // Рус. мед. журн. – 2003. – Т. 11, № 12. – С. 718-729.
5. Прилуцкий А.С., Кайдашев И.П., Проценко Т.В. и др. Определение специфического ІgЕ к различным алергенам // Клиническая иммунология. Аллергология. Инфектология. – 2011. – № 2. – С. 80-82.
6. Ройт А., Бростовф Дж., Мейл Д. Иммунология. – М.: Мир, 2000. – 592 с.
7. Якобисяк М. Імунологія / Переклад з польської за ред. проф. В.В.Чоп'як. – Вінниця: Нова книга, 2004. – 672 с.
8. Казмирчук В.Є., Ковальчук Л.В. Клінічна імунологія і алергологія. – Вінниця: Нова книга, 2006. – 526 с.
9. Митин Ю.А. Лабораторная диагностика аллергических заболеваний: Методические рекомендации. – СПб: Светлица, 2010. – 144 с.
10. Garcia-Ara M.C., Boyano-Martinez M.T., Diaz-Pena J.M. et al. Cow's milk-specific immunoglobulin E levels as predictors of clinical reactivity in the follow-up of the cow's milk allergy infants // Clin Exp Allergy. – 2004. – Vol. 34. – P. 866-870.
11. Bindels J.G., Hoijer M. Allergens: latest developments, newest techniques // Bull Int Dairy Fed. – 2000. – Vol. 351. – P. 31-32.
12. Sampson H.A. Food allergy // J. Allergy Clin. Immunol. – 2003. – Vol. 111, 2. – P. 540-547.
13. Kurup V.P., Sussman G.L., Yeang H.Y. et al. Specific IgE response to purified and recombinant allergens in latex allergy // Clinical and Molecular Allergy. – 2005. – Vol. 3. – P. 11-20.
14. Santos A.B.R., Rocha G.M., Oliver C. et al. Cross-reactive IgE antibody responses to tropomyosins from Ascaris lumbricoides and cockroach // J Allergy Clin Immunol. – 2008. – Vol. 121, 4. – P. 1040-1046.
15. Ye Y.-M., Hur G.-Y., Park H.-J. et al. Association of specific IgE to Staphylococcal superantigens with the phenotype of chronic urticaria // J. Korean Med. Sci. – 2008. – Vol. 23. – P. 845-851.
16. Патент РФ 2436100, МПК (2006.01) G01N33/53, A61P37/08. Способ определения специфических ІgЕ-антител к стафилококку в сыворотке крови больного аллергическими заболеваниями, имеющего

гиперчувствительность к аллергенам стафилококка, с применением тест-системы для определения специфических ІgЕ-антител к стафилококку, выделенная из стафилококка активная аллергенная субстанция (ААС) и способ диагностики стафилококковой аллергии / Федосеева В.Н., Камышева В.А., Миславский О.В. и др.; ФГБУ "Государственный научный центр "Институт иммунологии" ФМБА России, Федосеева В.Н., Мартынов А.И., Камышева В.А. – № 2010111254/15; Заявл. 25.03.2010; Опул. 20.09.2010.

17. Susani M., Jertschin P., Dolecek C. et al. High level expression of birch pollen profilin (Bet v 2) in Escherichia coli: purification and characterization of the recombinant allergen // Biochem Biophys Res Commun. – 1995. – Vol. 215. – P. 250-263.
18. Галкин О.Ю., Савченко А.А., Нікітіна К.І. та ін. Одержання та дослідження властивостей нових моноклональних антител до ІgЕ людини // Український біохімічний журнал. – Т. 85, № 5. – 2013. – С. 81-85.
19. Galkin A.Yu., Dugan A.M. Elaboration of immunoenzymatic test-kit for total human IgE assay and investigation of its analytical properties // International Journal of Immunology. – 2013. – Vol. 1, No. 1. – P. 1-6.
20. Goding J. Monoclonal antibodies. Principles and practice. – San Diego: Academic press, 1996. – 492 p.
21. Tijssen P. // Lab. Techniques in Biochem. and Molecular Biology. – 1985. – Vol. 15. – P. 674.
22. Павлова І.С., Любавина І.А., Жердев А.В. и др. Простые иммунохимические методы определения пестицидов на основе биотин-стрептавидиновой системы // Биоорганическая химия. – 1997. – Т. 2. – № 10. – С. 832-833.
23. Hermanson G.T. Bioconjugate techniques. – San Diego: Academic Press, 2000. – 760 p.
24. Galkin O.Yu. Approaches to the synthesis of conjugates for enzyme immunoassay test-systems and evaluation of their use for diagnostics of infectious diseases // Український журнал клінічної та лабораторної медицини. – 2010. – Т. 5, № 4. – С. 54-60.
25. Wide L., Bennich H., Johansson S.G. Diagnosis of allergy by an in vitro test for allergen antibodies. – Lancet. – 1967. – Vol. 2. – P. 1105-1107.
26. Bernstein I., Li J., Bernstein D. et al. Allergy diagnostic testing: an updated practice parameter // Ann All Asthma Immunol. – 2008. – Vol. 100. – P. 1-148.
27. Cox L., Williams P.B., Sicherer S. et al. Pearls and pitfalls of allergy diagnostic testing: report from the American College of Allergy, Asthma and Immunology/ American Academy of Allergy, Asthma & Immunology. Specific IgE Test Task Force // Ann. All. Asthma. Immunol. – 2008. – Vol. 101. – P. 580-592.
28. Valenta R., Duchene M., Ebner C. et al. Profilins constitute a novel family of functional plant pan-allergens // J. Exp. Med. – 1992. – Vol. 175. – P. 377-385.
29. Villalta D., Asero R. Sensitization to the pollen pan-allergen profilin. Is the detection of immunoglobulin E to multiple homologous proteins from different sources clinically useful? // J. Investig. Allergol. Clin. Immunol. – 2010. – Vol. 20 (7). – P. 591-595.
30. Flückiger S., Limacher A., Glaser A.G. et al. Structural aspects of cross-reactive allergens // Recent Res. Devel. Allergy Clin. Immunol. – 2004. – Vol. 5. – P. 57-75.
31. Patel K.K., Anderson E., Salva P.S. et al. The prevalence and identity of Chlamydia-specific IgE in children with asthma and other chronic respiratory symptoms // Respiratory Research. – 2012. – Vol. 13. – P. 32-42.
32. Liccardi G., Dente B., Triggiani M. et al. A multicenter evaluation of the CARLA system for the measurement of specific IgE antibodies vs. other different methods and skin prick tests // J. Investig. Allergol. Clin. Immunol. – 2002. – Vol. 12 (4). – P. 235-241.

Надійшла до редколегії 16.09.13

А. Галкин, канд. биол. наук, М. Михальчук, студ.
Национальный технический университет Украины "Киевский политехнический институт", Киев,
В. Казмирчук, д-р мед. наук
Национальный медицинский университет имени А.А. Богомольца, Киев,
Ю. Гурженко, д-р мед. наук
Институт урологии НАМН Украины, Киев

РАЗРАБОТКА И СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАЗЛИЧНЫХ МОДИФИКАЦИЙ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ІgЕ-АНТИТЕЛ

Разработка и сравнительное исследование различных модификаций иммуноферментного анализа (ИФА) для определения специфических ІgЕ-антител. Биохимический синтез конъюгатов антител и антигенов, ИФА. Проведено теоретическое обоснование целесообразности использования ИФА для выявления специфических ІgЕ-антител; осуществлено научную разработку и сравнительную характеристику двух модификаций ИФА для выявления специфических иммуноглобулинов класса ІgЕ к профилину пыльцы березы Bet v 2 и белка теплового шока Chlamydia trachomatis HSP-60: непрямого варианта и ІgЕ-"захвата" (с и без использования системы авидин-биотинового усиления сигнала). Доказано, что по показателям информативности анализа (специфичность, чувствительность, воспроизводимость) непрямого ИФА не обеспечивает эффективное определение специфических ІgЕ-антител; показано, что модификация ИФА ІgЕ-"захват" характеризуется удовлетворительными аналитическими показателями анализа как с, так и без авидин-биотинового усиления сигнала.

Ключевые слова: ІgЕ, антитела, иммуноферментный анализ, алергены.

O. Galkin, PhD., M. Myhalchuk, B.Sc.
National Technical University of Ukraine "Kyiv Polytechnic Institute", Kyiv,
V. Kazmirchuk, Dr.Med.Sc.
O.O. Bogomolets National Medical University, Kyiv,
Gurzhenko Yu., Dr.Med.Sc.
Institute of Urology of NAMS of Ukraine, Kyiv

DEVELOPMENT AND COMPARISON OF DIFFERENT VERSIONS OF ELISA FOR DETECTION OF SPECIFIC IgE-ANTIBODIES

Development and comparative study of different modifications of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of specific IgE-antibodies. Biochemical synthesis of conjugates of antibodies and antigens, ELISA. Results: theoretical rationale for the use of ELISA for the detection of specific IgE-antibodies has been done; development and comparative characteristics of two ELISA modifications for the detection of specific IgE to birch pollen profilin (Bet v 2) and heat shock protein of Chlamydia trachomatis (HSP-60): indirect and IgE-"capture" variants (with and without use of avidin-biotin signal amplification) has been implemented. It is proved that in terms of analysis informative indicators (specificity, sensitivity, reproducibility) indirect ELISA does not provide effective determination of specific IgE-antibodies; it is shown that IgE-"capture" ELISA is characterized by satisfactory analytical performance analysis as with or without avidin-biotin amplification.

Keywords: IgE, antibodies, ELISA, allergens

УДК 578.2

С. Демідов, д-р біол. наук, проф., С. Дерев'янка, канд. біол. наук, ст. наук. співроб.,
Т. Бова, канд. біол. наук, М. Гончар, зав. лаб. ПЛР
КНУ імені Тараса Шевченка, Київ

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНА ІДЕНТИФІКАЦІЯ ТЕШОВІРУСІВ СВИНЕЙ

*За результатами вірусологічних, генетичних та серологічних досліджень штами ентеровірусів свиней Ч-2372, Б-652, П-642, Д-32, Д-33, Д-34, І-59, Р-501, Г-95, П-142, В-151, та Г-31, виділені на території України, рекласифіковано у відповідності до вимог Міжнародного комітету з таксономії вірусів і віднесено до роду *Teschovirus* виду *Porcine teschovirus*. Встановлено високу видову специфічність оригінальних олігонуклеотидних праймерів для ідентифікації тешовірусів свиней, що відкриває перспективи розробки діагностичних тест-систем на основі молекулярно-генетичних методів.*

Ключові слова: тешовіруси свиней, рекласифікація, праймери, полімеразна ланцюгова реакція.

Вступ. Тешовіруси свиней є етіологічними агентами ряду інфекційних хвороб, які завдають значних економічних збитків свинарській галузі. Однією з найнебезпечніших є ензоотичний енцефаломієліт (хвороба Тешена) свиней. Це контагіозне вірусне захворювання, яке супроводжується негнійним запаленням мозку та його оболонок, паралічами і парезами. Серед інфекційних хвороб свиней вірусної етіології, що реєструються в Україні, частка хвороби Тешена становить 24 % [2].

Збудником хвороби Тешена є вірус 1-го серотипу, який згідно сучасної міжнародної класифікації належить до родини *Picornaviridae*, роду *Teschovirus*, виду *Porcine teschovirus* [14].

Найчутливіші до тешовірусів є поросята у 2-6 – місячному віці, рідше свині 7-10 – місячного віку. Клінічні ознаки хвороби у тварин старшого віку реєструються в поодиноких випадках. Залежно від тривалості епізоотичного процесу захворюваність свиней нервовою формою становить 14 – 90 %, а летальність – від 75 до 90 % [6, 8].

Ефективність боротьби з хворобою Тешена, насамперед, залежить від своєчасного проведення протиепізоотичних заходів і, зокрема, постановки діагнозу. Діагноз ставиться на основі клініко-епізоотологічного обстеження свинопоголів'я, результатів патолого-анатомічних та лабораторних досліджень. Лабораторна діагностика включає ізоляцію вірусу в культурі клітин з наступним типуванням його в реакції нейтралізації вірусу (РН) або імунофлюоресценції та виявлення вірусспецифічних антитіл у сироватках крові тварин. Для цього в Інституті сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН розроблено набір діагностиків ензоотичного енцефаломієліту (хвороби Тешена) свиней в реакції нейтралізації вірусу [6]. Цей метод і на сьогоднішній день є еталоном і основним тестом, однак він довготривалий, трудомісткий, потребує використання культури клітин, дорогих живильних середовищ. Крім того, постійно існує небезпека контамінації культури клітин мікрофлорою. У результаті тривалість постановки діагнозу збільшується з 10-ти до 30 діб.

Останні досягнення молекулярної біології відкривають перспективи розробки діагностичних засобів для ідентифікації вірусів на основі полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). В 1999 р. на основі вивчення структури геному Міжнародний комітет з таксономії вірусів [9-12] рекласифікував ентеровіруси свиней. За рішенням комітету ентеровіруси свиней, які відносились до родини *Picornaviridae* і роду *Enterovirus*, рекласифіковані в межах цієї ж родини в два окремих роди: *Teschovirus* з видом *Porcine teschovirus* (PTV) і власне під *Enterovirus* з видами *Porcine enterovirus A* та *Porcine enterovirus B* (PEV) (табл. 1.). До виду *Porcine teschovirus* віднесено 11 серотипів вірусів, до виду *Porcine enterovirus A* – один серотип, виду *Porcine enterovirus B* – два серотипи [3]. У 2009 році Міжнародний комітет з таксономії вірусів рекласифікував вид *Porcine enterovirus A* в окремий рід *Sapelovirus* вид *Porcine sapelovirus* (PSV) [15].

У зв'язку з рекласифікацією ентеровірусів свиней виникає необхідність у розробці нових високо специфічних методів ідентифікації вірусів, визначення таксономічного положення раніше виділених в Україні епізоотичних, референтних та виробничих штамів ентеровірусів свиней у відповідності до положень Міжнародного комітету з таксономії вірусів.

Метою нашої роботи було дослідження РНК вірусів в полімеразній ланцюговій реакції зі зворотною транскрипцією (ЗТ) за використання нових штучно синтезованих, оригінальних, олігонуклеотидних праймерів та проведення генетичної рекласифікації штамів ентеровірусів свиней, виділених на території України.

Матеріали і методи. В досліді використано штами ентеровірусів свиней (згідно тривіальної класифікації Романенка В.П. [7]) Ч-2372, Б-652, П-642, Д-32, Д-33, Д-34, І-59, Р-501, Г-95, П-142, В-151, та Г-31, виділені від свиней співробітниками лабораторії вірусології і зберігаються в колекції штамів вірусів Інституту сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН.

Таблиця 1. Сучасна класифікація тешо-, ентеровірусів свиней

Рід	Вид	Серотип	Еталонні штами вірусів
<i>Teschovirus</i>	<i>Porcine teschovirus</i>	1	Talfan, Teschen 199, Tirol, DS1520/93
		2	T80, O3b
		3	O2b
		4	PS36
		5	F26
		6	PS37
		7	F43
		8	UKG 173/74
		9	VIR 2899/84
		10	VIR 460/88
		11	Dresden
<i>Sapelovirus (Enterovirus)*</i>	<i>Porcine sapelovirus (Porcine enterovirus A)*</i>	8	V13
<i>Enterovirus</i>	<i>Porcine enterovirus B</i>	9	UKG 410/73
		10	LP 54

Примітка: * – переіменовано у 2009 році за рішенням Міжнародного комітету з таксономії вірусів.

Для контролю використовували еталонні штами тешовірусів свиней 11-ти серотипів, ідентифіковані за сучасною міжнародною класифікацією [10]: Teschen 199, O 3b, O 2b, PS 36, F 26, PS 37, F 43, UKG 173/74, VIR 2899/84, VIR 460/88, Dresden та штам сапеловірусів свиней V 13, штами ентеровірусів свиней групи В UKG 410/73 та LP 54, які були люб'язно надані професором Мальте Даубером (Інститут вірусної діагностики ім. Ф. Леффлера Федерального центру вірусних хвороб тварин, Німеччина). Гіперімунні кролячі сироватки крові до цих еталонних штамів, отримували за модифікованою нами схемою [5].

Для контролю специфічності полімеразної ланцюгової реакції використовували вірусомісні суспензії вірусу парагрипу-3 штам ЗКСМ, вірусу класичної чуми свиней штам К, вірусу діареї великої рогатої худоби штам ВК-1, вірусу трансмісивного гастроентериту свиней штам ВС-1, суспензії тканин та органів свині (головного та спинного мозку, легень, селезінки), культури клітин.

У дослідах використовували перещеплювані лінії культур клітин нирки ембріону свині (СНЕВ) та нирки новонародженого сірійського хом'яка (ВНК-21). Усі штами пройшли адаптацію до культури клітин СНЕВ та ВНК-21 шляхом трьох послідовних пасажів.

З метою визначення біологічної активності вірусу *in vitro* готували 10-кратні розведення вірусомісної культуральної суспензії на фізіологічному розчині або на розчині Хенкса. Моношар культури клітин СНЕВ або ВНК-21 відмивали розчином Хенкса, вносили по 0,1 см³ кожного розведення вірусу в 4 пробірки і додавали 0,9 см³ підтримуючого середовища. Пробірки інкубували при температурі 37 °С. Облік результатів цитопатичної дії (ЦПД) вірусів у культурах клітин проводили на 4-7 добу. Титр вірусів вираховували за методом Ріда Л. і Менч Х. [14] і виражали кількістю тканинних цитопатичних доз (ТЦД) в одному см³. За титр вірусу приймали його найбільше розведення (в логарифмах), яке викликало дегенерацію моношару культури клітин в 50 % пробірок. Статистичну обробку результатів проводили за методикою Ашмаріна Н.П. [1].

Типування проводили у реакції нейтралізації вірусу в чутливій культурі клітин з використанням кролячих антисироваток до еталонних штамів тешо-, сапело- та ентеровірусів свиней 14 серотипів. У реакції нейтралізації використовували 100 ТЦД₅₀ виділеного вірусу та 10 нейтралізуючих доз антисироваток. Нейтралізуючі дози сироватки визначали діленням її титру на 10.

Рибонуклеїнову кислоту тешовірусів, сапеловірусів і ентеровірусів свиней виділяли з досліджуваних проб за використання набору "РНК-сорб-В" (Центральний науково-дослідний інститут епідеміології, м. Москва), в основі якого покладено метод сорбції на силікагелі. З виділеної РНК отримували кДНК за допомогою реакції ЗТ. ПЛР проводили на чотирьохканальному ампліфікаторі "Терцик" НВФ "ДНК-Технологія" (Росія, м. Москва). Реакційна суміш об'ємом 25 мкл вміщувала: 67 ммоль трис-НСІ (рН 8,8), 16,6 mM (NH₄)₂SO₄, 2,0 ммоль MgCl₂, 0,01% твін-20, по 100 мкмоль дАТФ, дГТФ, дТТФ, дЦТФ, 2 ммоль (НВФ "ДНК Технологія") кожного з пари специфічних праймерів, 2 од. Taq-полімерази, 5 мкл зразків кДНК.

В реакції використовували наступні пари праймерів [4]:

Sense Primer: **TeschoF51 -5'** –
CCAGCAGCCTCTGTTCAGAAAG
 Antisense Primer: **TeschoR51 -5'** –
GC(A/G)TACTTGATGAGGCCCATC

Для попередження випаровування у кожний зразок поверх реакційної суміші нашаровували по 30 мкл мінеральної олії. Ампліфікацію (помноження) специфічних ділянок кДНК інфекційних агентів проводили за параметрами, представленими в табл. 2.

Детекцію продуктів реакції проводили за допомогою електрофорезу у 1,5 % агарозному гелі, забарвленому бромідом етидію з використанням трис-боратного буфера (НВФ "ДНК-Технологія") при градієнті напруги 10 В/см. Результати оцінювали при перегляді гелю після електрофорезу на транслюмінаторі під УФ-світлом за наявності (або відсутності) червоно-помаранчевих фрагментів ДНК певного розміру. У результаті отримали продукт ампліфікації розміром 650 нуклеотидних пар. Специфічність ампліфікованого фрагмента ДНК визначали за його розміром відносно фрагментів стандартних маркерів.

Для визначення специфічності сконструйованих праймерів використовували вірусомісні суспензії культур клітин з титром тешо-, сапело- і ентеровірусів свиней 5,0-8,5 lg ТЦД₅₀/см³, вірусомісні суспензії головного та спинного мозку з титром 2,0-5,5 lg ТЦД₅₀/см³, віруси інших таксономічних груп (вірус парагрипу-3, вірус класичної чуми свиней, вірус діареї великої рогатої худоби, вірус трансмісивного гастроентериту свиней), суспензії культури клітин СНЕВ, спинного і головного мозку, селезінки, легень свиней.

Таблиця 2. Температурні і часові параметри ампліфікації специфічної ділянки кДНК

№ циклу	Температура ампліфікації, °С	Час, хв.	Кількість циклів
1	95	5	1
2	94	1	5
	58	1	
	74	1	
3	94	0,5	35
	58	0,5	
	73	0,5	
4	72	5	1
5	Зберігання		

Результати та їх обговорення. Досліджувані штамів вірусів проявляли цитопатичну дію в чутливих культурах клітин через 24-48 годин після інокуляції. Інфекційна активність досліджуваних виробничих та лабора-

торних штамів вірусів, виділених на території України, в культурах клітин СНЕВ та ВНК-21 коливалась в межах від 7,0 до 8,5 lg ТЦД₅₀/см³ (табл.3).

Таблиця 3. Інфекційна активність досліджуваних штамів вірусів, виділених на території України

Штам	Призначення штаму	Титр вірусу (-lg ТЦД ₅₀ /см ³)
Ч-2372	контрольний	8,5
П-642	вакцинний	8,0
Б-652	діагностичний	8,0
Г-95	лабораторний	7,5
В-151	лабораторний	7,0
Р-501	діагностичний	7,0
И-59	діагностичний	8,5
Г-31	вакцинний	8,5
Д-32	лабораторний	8,0
П-142	лабораторний	8,0
Д-33	лабораторний	7,5
Д-34	вакцинний, діагностичний	8,0

В реакції нейтралізації штамів вірусів Ч-2372, П-642, Б-652, Г-95, Р-501, И-59, П-142, Д-32, Д-33, Д-34 взаємодіяли з сироваткою крові до штаму Teschen 199 PTV-1, штам вірусу В-151 – з кролячою сироваткою до штаму F

26 PTV-5 (табл. 4). Штам Г-31 нейтралізувався сироватками крові до штамів Virchow 199, VIR 460/88, Dresden PTV-1, PTV-10, PTV-11 відповідно.

Таблиця 4. Результати типування штамів тешовірусів свиней, виділених на території України

Антисироватка Штам	PTV-1	PTV-2	PTV-3	PTV-4	PTV-5	PTV-6	PTV-7	PTV-8	PTV-9	PTV-10	PTV-11	PEV-8	PEV-9	PEV-10
Ч-2372	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
П-642	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Б-652	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Г-95	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
В-151	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Р-501	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
И-59	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Д-32	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
П-142	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Г-31	+	–	–	–	–	–	–	–	–	+	+	–	–	–
Д-33	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Д-34	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

Таким чином, досліджені штамів вірусів, виділені на території України, за антигенними властивості належать до родини *Picornaviridae*, до роду *Teschovirus*, виду *Porcine teschovirus*, з них 10 – до першого серотипу, 1 – до п'ятого серотипу, 1 – має антигенні зв'язки з еталонними штамми 1, 10, 11 серотипів.

ПЛР проводили з використанням оригінальних штучно синтезованих праймерів. Для визначення специфічності праймерів проведено молекулярно-генетичні дослідження еталонних штамів тешовірусів свиней (табл.5). Встановлено, що праймери фланкують ділянку молекули РНК довжиною 650 нуклеотидних залишків, починаючи з 5271 по 5908 нуклеотид (AF296096) [13].

Це відповідає ділянці геному тешовірусів, яка кодує РНК-залежну РНК-полімеразу. Їх ідентичність для всіх тешовірусів свиней за результатами аналізу банку генів становила 100% (95,5%).

У результаті проведених досліджень РНК штамів вірусів, виділених в Україні, встановлено, що всі вони утворюють продукт ампліфікації довжиною 650 нуклеотидів і за своїми генетичними властивостями належать до роду *Teschovirus* виду *Porcine Teschovirus*. Продукти ампліфікації утворювались як з РНК, виділеною із зразків вірусів накопичених в культурі клітин, так і в суспензіях головного та спинного мозку.

Таблиця 5. Специфічність полімеразної ланцюгової реакції

Зразок	Результат полімеразної ланцюгової реакції
1	2
Позитивний контроль	
Штам Teshen 199 PTV -1	Продукт 650 пар нуклеотидів
Штам 03b PTV -2	Також
Штам -3 02b PTV -3	—
Штам PS36 PTV -4	—
Штам F26 PTV -5	—
Штам PS37 PTV -6	—
Штам F43 PTV -7	—
Штам UKG 173/74 PTV -8	—
Штам VIR 2899/84 PTV -9	—
Штам VIR461/88 PTV -10	—
Штам Dresden PTV -11	—
Досліджувані штами	
Штам Ч-2372 PTV-1	Продукт 650 пар нуклеотидів
Штам П-642 PTV -1	Також
Штам Б-652 PTV -1	—
Штам Г-95 PTV -1	—
Штам В-151 PTV -5	—
Штам Р-501 PTV -1	—
Штам І-59 PTV -1	—
Штам Д-32 PTV -1	—
Штам П-142 PTV -1	—
Штам Г-31 PTV -1, 10, 11	—
Штам Д-33 PTV -1	—
Штам Д-34 PTV -1	—
Суспензія головного мозку Ч-2372 PTV -1	—
Суспензія головного мозку М-2323 PTV -1	—
Суспензія спинного мозку Д-33 PTV -1	—
Негативний контроль	
Штам V13 PSV A-8	—
Штам UKG 410/73 PEV B-9	—
Штам LP54 PEV B-10	—
Вірус парагрипу-3 штаму ЗКСМ	—
Вірус класичної чуми свиней штаму К	—
Вірус діареї великої рогатої худоби штаму ВК-1	—
Вірус трансмісивного гастроентериту свиней штаму ВС-1	—
Головний мозок свині	—
Спинний мозок свині	—
Легені свині	—
Селезінка свині	—
Культура клітин СНЕВ	—

РНК сапеловірусів та ентеровірусів свиней В, вірусу парагрипу, вірусу класичної чуми свиней, вірусу діареї великої рогатої худоби, вірусу трансмісивного гастроентериту продуктів ампліфікації в ЗТ ПЛР із зазначеними праймерами не утворювали. Крім того, зразки культури клітин СНЕВ, органів і тканин свиней у полімеразну ланцюгову реакцію із зазначеними праймерами не всту-

пали, що підтверджує високу специфічність праймерів.

На рис.1 наведена електрофореграма продуктів ампліфікації, де показано результати досліджень 16 зразків, з яких 15 – матеріал, інфікований штамами тешо-, сапело- та ентеровірусів свиней, 1 – суспензія культури клітин СНЕВ. В 12 зразках виявлено РНК тешовірусів свиней.

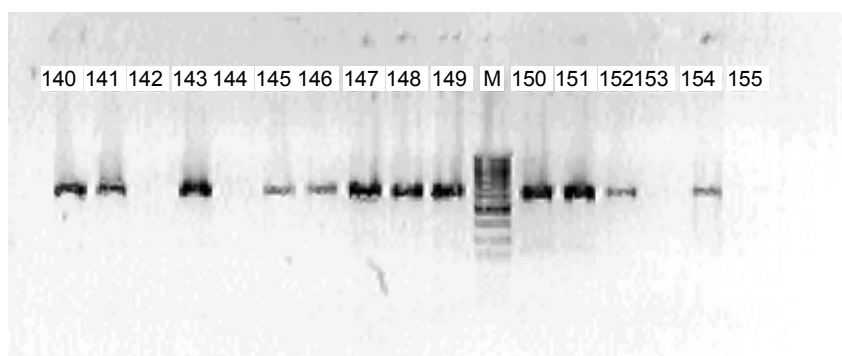


Рис. 1. Електрофореграма продуктів ампліфікації ЗТ ПЛР:

М – маркери розмірів, пари нуклеотидів;

140, 141, 143, 145-149, 150-153, 154 – штами тешовірусів свиней;

142 – штаму сапеловірусу; 144, 153 – штами ентеровірусу свиней В;

155 – культура клітин СНЕВ.

Отже, встановлено високу специфічність одержаних праймерів, підтверджено їх видоспецифічність. Дослі-

джувані пари праймерів не вступали у взаємодію з РНК вірусів інших таксономічних груп. Продуктів ампліфікації

з культурою клітин СНЕВ та суспензіями органів свиней також не спостерігали.

Висновки. Таким чином, на підставі проведених генетичних досліджень, штами ентеровіруси свиней Ч-2372, Б-652, П-642, Д-32, Д-33, Д-34, І-59, Р-501, Г-95, П-142, В-151, та Г-31, які були виділені на території України, рекласифіковано і віднесено згідно з сучасною міжнародною класифікацією до роду *Teschovirus* виду *Porcine Teschovirus*. Результати дослідження вірусів у реакції нейтралізації та полімеразної ланцюгової реакції збігаються, що відкриває перспективи розробки діагностичних тест-систем на основі молекулярно-генетичних методів за використання розроблених олігонуклеотидних праймерів.

Список використаних джерел

1. Ашмарин Н.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. – Л.: Медицинская литература, 1965. – 240 с.
2. Бабкін М.В. Структурний аналіз інфекційних хвороб свиней в Україні в сучасних умовах / Бабкін М.В., Прохорятова О.В., Явніков Н.В., Годовський О.В. // Ветеринарна медицина: Міжвід. тем. наук. зб. – Харків, 2006. – Вип. 86. – С. 25-30.
3. Дерев'яно С.В., Сорока В.І. Класифікація ентеровірусів свиней: сучасний стан та проблеми Ветеринарна медицина. – 2002. – № 80. – С. 195–200.
4. Пат. 51560 Україна, МПК (2009) С12Н 15/11. Спосіб виявлення РНК тешовірусів методом зворотно-транскрипційної полімеразної ланцюгової реакції / Дерев'яно С.В., Головка А.М., Кацимон В.В., Сорока В.І., Бова Т.О. – № u200913732; заявл. 28.12.2009; опубл. 26.07.2010, бюл. № 14.

5. Пат. 58734 Україна, МПК G01N 33/53 (2006.01). Спосіб одержання гіперімунної сироватки крові до вірусів тварин і рослин / Бова Т.О., Волкова І.В., Дерев'яно С.В. – № u201011151; заявл. 17.09.2010; опубл. 26.04.2011, бюл. № 8.

6. Рекомендації з діагностики, профілактики та ліквідації тешо- та ентеровірусних енцефаломієлітів свиней / [Укладачі В.І. Сорока, А.О. Бокун, С.В. Дерев'яно та ін.]. – Чернівці: Інститут сільськогосподарської мікробіології НААН, 2006. – 28 с.

7. Романенко В.Ф. Классификация энтеровирусов свиней / Романенко В.Ф., Прусс О.Г., Бабич Н.В. и др. // Вісник аграрної науки. – 1993. – № 1. – С. 94–101.

8. Романенко В.Ф., Сорока В.І. Особенности эпизоотологии энзоотического энцефаломиелита (болезни Тешена) свиней // Общая эпизоотология: иммунологические, экологические и методологические проблемы: 36. наук. праць – Харьков, 1995. – С. 92-95.

9. Agol V.I., Paul A.V., Wimmer E. Paradoxes of the replication of picornaviral genomes // Virus Res. – 1999. – Vol. 62, № 2. – С. 129–147.

10. Fauquet C.M. Viruses Taxonomy: Eighth Report of the International Committee for the Taxonomy of Viruses / Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J. et al. – New-York; San Diego: Academic Press, 2005. – P. 657–673.

11. Kaku Y., Sarai A., Murakami Y. Genetic reclassification of porcine enteroviruses // J. Gen. Virol. – 2001. – Vol. 82. – P. 417–424.

12. Kaku Y. Unique characteristics of a picornavirus internal ribosome entry site from the Porcine teschovirus-1 Talfan / Kaku Y., Chard L. S., Inoue T., Belsham G. J. // Journal of Virology. – 2002. – Vol. 76, № 22. – P. 11721–11728.

13. Porcine teschovirus 11 strain Dresden polyprotein gene, complete cds [Електронний ресурс]: Офіційний сайт GenBank. – Режим доступу: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/AF296096>.

14. Reed L.J., Muench H. A simple method of estimation of fifty per cent endpoints // Am. J. Hyg. – 1938. – Vol. 27, № 3. – P. 493–497.

15. Virus Taxonomy: 2012 Release (current) [Електронний ресурс]: Офіційний сайт Міжнародного комітету з таксономії вірусів. – Режим доступу: <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>.

Надійшла до редколегії 17.09.13

С. Демидов, д-р биол. наук, проф., С. Дерев'яно, канд. биол. наук, ст. науч. сотр., Т. Бова, канд. биол. наук, М. Гончар, зав. лаб. ПЛР КНУ імені Тараса Шевченка, Київ

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ ТЕШОВИРУСОВ СВИНЕЙ

По результатам вирусологических, генетических и серологических исследований штаммы энтеровирусов свиней М-2372, Б-652, П-642, Д-32, Д-33, Д-34, И-59, Р-501, Г-95, П-142, В-151, и Г-31, выделенные на территории Украины, рекласифицированы в соответствии с требованиями Международного комитета по таксономии вирусов и отнесены к роду *Teschovirus* вида *Porcine teschovirus*. Установлена высокая видовая специфичность оригинальных олигонуклеотидных праймеров для идентификации тешовирусов свиней открывает перспективы разработки диагностических тест-систем на основе молекулярно-генетических методов.

Ключевые слова: тешовирусы свиней, рекласификация, праймеры, полимеразная цепная реакция.

Demidov S.D.Sc, Derevyanko S.PhD, Bova T.PhD, Gonchar M.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv

MOLECULAR GENETIC IDENTIFICATION OF PIGS TESCHOVIRUS

As a result of virology, genetic and serological tests Porcine enteroviruses strains of Ch-2372, B-652, P-642, D-32, D-33, D-34, I-59, P-501, G-95, P-142, G-31 isolated in Ukraine, reclassified in accordance with the International Committee on Taxonomy of viruses and referred to the genus *Teschovirus* species *Porcine teschovirus*. The high species specificity of the original oligonucleotide primers for identification Porcine teschovirus opens new perspectives of development of diagnostic kits based on molecular genetic methods.

Keywords: Porcine teschovirus, reclassification, primers, polymerase chain reaction.

УДК 577.151.62:571.27:616.36-008.811.1

О. Берник, асп., К. Дворченко, канд. біол. наук,
А. Драницина, канд. біол. наук, Л. Остапченко, д-р біол. наук
КНУ імені Тараса Шевченка, Київ

ІМУНОБІОХІМІЧНІ ПОКАЗНИКИ СТАНУ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ ЗА ТРИВАЛОЇ ГІПОХЛОРГІДРІЇ ШЛУНКУ

Робота присвячена дослідженню взаємозв'язку системи оксиду азоту і рівня цитокінів в клітинах печінки щурів в умовах тривалої гіпохлоргидрії. Показано накопичення нітрит-йонів і посилення активності синтази оксиду азоту в клітинах печінки при зниженій шлунковій секреції. В даний час доведена ключова роль оксиду азоту в регуляції імунних реакцій, так, нами встановлено, що тривала гіпохлоргидрія супроводжується виробленням прозапальних цитокінів (фактора некрозу пухлини α , інтерлейкіну-6).

Ключові слова: печінка, гіпохлоргидрія, система оксиду азоту, цитокіни.

Вступ. Гідрохлоридна кислота шлункового соку, яка синтезується парієтальними клітинами фундальних залоз шлунку, виконує важливу роль у регуляції процесів травлення та забезпечує антибактеріальний ефект секрету [1]. Гіпер- та гіпосекреція гідрохлоридної кислоти може спричинювати морфологічні зміни у шлунку, що є причиною розвитку кислото-залежних гастритів. Сьогодні гіпохлоргидрію шлункового соку розгля-

дають як чинник трансформації клітин слизової оболонки шлунку, що може призвести до подальшої малігнізації тканин [2]. Проте, літературні дані щодо молекулярних механізмів цього процесу є малочисельними. Існує ряд механізмів інгібування секреції хлоргидридної кислоти, зокрема, нейрогуморальні та хімічні фактори, проте основним чинником довготривалого зниження секреції гідрохлоридної кислоти є дезактивація

H^+/K^+ -АТФази інгібіторами протонної помпи, зокрема омепразолом та іншими сполуками (лансопразол, пантопразол), які є похідними бензімідазолу [3]. Ці сполуки, накопичуючись, головним чином, у внутрішньоклітинних каналцях парієтальних клітин, зв'язують H^+ і ковалентно взаємодіють з SH-групами ензиму, розташованими на люмінальній поверхні апікальної мембрани [4]. Відновлення активності H^+/K^+ -АТФази після обробки омепразолом відбувається у міру синтезу нових молекул ензиму, тому тривалість викликаного ним інгібування залежить від швидкості оновлення ензиму. Наслідком гіпохлоргідрії є пригнічення активності шлункових ензимів, погіршення денатурації і набрякання білкових молекул, порушення всмоктування мікроелементів і вітаміну B_{12} , зміна рухової функції шлунку, що призводить до сповільнення викиду хімуса зі шлунку у дванадцятипалу кишку [5]. Крім того, підвищення рН в шлунку ослаблює бактерицидну дію шлункового соку, що створює ідеальні умови для розмноження патогенної мікрофлори та розвитку запальних процесів у шлунково-кишкового тракту [6, 7]. За умов тривалої шлункової гіпохлоргідрії можливе виникнення метаболічних змін у печінці внаслідок розвитку ендотоксимії, яка може бути спричинена надходженням з портальною кров'ю патогенних мікроорганізмів, бактеріальних ліпополісахаридів і токсинів з кишечника, що може призвести до активації клітин Купфера, а отже надмірної продукції прозапальних цитокінів (ФНП- α ін) [8] та оксиду азоту [9]. В літературі відсутні дані щодо комплексного дослідження метаболічних шляхів, залучених у розвиток ендотоксимії в умовах зниженої секреції гідрохлоридної кислоти шлунку та корекції цих станів препаратами пробіотиків, механізми дії яких залишаються недостатньо вивченими. У зв'язку з цим, метою роботи було визначити експресію генів iNOS (кодує індукційну синтезу оксиду азоту) та оцінити вміст оксиду азоту і цитокінів у печінці щурів за умов тривалої пригнічення кислотної секреції шлунка блокаторм H^+/K^+ -АТФази омепразолом.

Матеріали та методи. У роботі дотримувалися міжнародних рекомендацій стосовно проведення медико-біологічних досліджень із використанням тварин згідно Європейської конвенції (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes). У досліді використовували білих нелінійних статевозрілих щурів-самців із початковою вагою 180-200 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію. Тварин розділяли на дві групи. В якості контролю (перша група) використовували щурів, яким протягом 28 днів вводили інтраперитонеально 0,2 мл та перорально 0,5 мл води для ін'єкцій. Моделювання гіпохлоргідрії стану (друга група) проводили за допомогою внутрішньоочеревинного введення 14 мг/кг омепразолу, 1 раз на добу протягом 28 днів [10]. Кількість тварин у кожній експериментальній групі – 10. Морфологічно та функціонально інтактні клітини печінки було отримано згідно модифікованого неферментативного методу виділення гепатоцитарної фракції клітин печінки за Петренко А.Ю. зі співав [11]. Визначення активності синтази оксиду азоту (NO-синтази) проводили згідно з методом [12], який полягає у визначенні приросту продуктів аеробного окислення оксиду азоту. Активність ферменту виражали в нмоль продуктів аеробно-

го окислення оксиду азоту, утворених ферментом за 1 хв. з розрахунку на 1 мг білка. Вміст нітрит-іонів (NO_2^-) визначали за методом Гріса [13] із модифікаціями. РНК отримували за методом Chomczynski [14]; кДНК синтезували в 20 мкл реакційної суміші, яка містила 2 мкг РНК, 1 мМ дНТФ, 200 од. зворотної транскриптази RevertAid M-MLV, відповідний буфер, 20 од. рибонуклеазного інгібітору (RiboLock), 20 пкмоль зворотнього праймеру. Синтез проводився за таких умов: 70°C – 5 хв., далі 37°C – 5 хв., 42°C – 1 год. Полімеразну ланцюгову реакцію проводили в 30 мкл реакційної суміші, що містила 10 мкл кДНК, буфер для ПЛР, по 200 мкМ кожного дНТР, по 30 пкмоль (1,0 мкМ) кожного праймера, до 2,5 мМ $MgCl_2$ та 1,5 од. Taq ДНК полімерази ("MBI Fermentas", Литва). Ампліфікацію фрагментів ДНК здійснювали за таких температурних умов: ініціююча денатурація 94°C – 4 хв.; далі 35 циклів (для *Actb* – β -актин (ген, що використовується в якості внутрішнього контролю реакції завдяки конститутивній експресії) – 28 циклів): денатурація ДНК 94°C – 45 сек.; гібридизація праймерів 52 °C – 45 сек. для індукційної синтази оксиду азоту (*Nos2*) (440 п.н.) [15] та 49°C – 40 сек. для *Actb* (521 п.н.); добування ланцюга 72°C – 1 хв. 15 сек (для *Nos2*) або 1 хв. (для *Actb*). Після цього проводили добування ампліфікатів при 72°C – 5 хв. У реакціях було використано такі послідовності праймерів: для iNOS – прямий – GTGTTCCACCAGGAGATGTTG та зворотній – CTCCTGCCCACTGACTTCGTC та для β -актину – прямий – TGGGACGATATGGAGAAGAT та зворотній – ATTGCCGATAGTGATGAXCT. Розділення продуктів полімерізації ланцюгової реакції проводили електрофоретично в 1,6% агарозному гелі ("Gibco", Німеччина), у 0,5 кратному TBE буфері, як описано в Sambrook et al. [16], при напрузі 5-10 В/см. Для напівкількісного аналізу експресії ампліконів на основі денситометрії було використано програму ImageJ 1.45s (NIH, США). Індекси експресії мРНК визначали, як описано в Konturek et al. [17]. Концентрацію цитокінів було визначено методом мультиканальної хемілюмінесценції [18] на основі мультипараметричного імунохімічного біочіпа фірми RANDOX. Вміст білку визначали за методом Лоурі [19]. Математичну та статистичну обробку результатів досліджень проводили загальноприйнятими методами варіаційної статистики [20] на комп'ютері з використанням програмного пакету GraphPad Prism 4.03 (GraphPad Software Inc., США). Отримані дані тестувалися на нормальне розподілення за допомогою тесту Шапіро-Вілка. Подальший обрахунок результатів відбувався за допомогою односпрямованого дисперсійного аналізу (one-way ANOVA) із пост тестом Тукея. Значення $p < 0,05$ було прийнято як вірогідне.

Результати та обговорення. Імунобіохімічні показники були вивчені в групі тварин з експериментальною гіпохлоргідрією. Нами показано підвищення активності NO-синтази (в 7 разів, $p < 0,05$) відносно контролю (табл.1) та накопичення нітрит йонів (в 5,3 рази, $p < 0,05$) у лізаті клітин печінки щурів за умов тривалої гіпохлоргідрії, що може визначатися антибактерицидним ефектом оксиду азоту при надходженні у печінку ліпополісахаридів із кров'ю в умовах дисбактеріозу кишечника характерного для гіпоацидних станів [21].

Таблиця 1. Загальна NO-синтазна активність та вміст нітрит-іонів у лізаті гепатоцитів щурів в умовах тривалої шлункової гіпохлоргідрії ($M \pm m$, $n = 10$)

Показники	Група тварин	Контроль	Омепразол
NO-синтаза, $nmol \times h^{-1} \times mg \text{ білка}^{-1}$		$0,36 \pm 0,04$	$2,51 \pm 0,24$
<i>Nos2 / Actb</i> , ум.од.		–	$0,69 \pm 0,05$
NO_2^- , $nmol \times h^{-1} \times mg \text{ білка}^{-1}$		$70,4 \pm 6,1$	$370,1 \pm 30,0$

Примітка: * – $p < 0,05$ порівняно з контролем.

Підвищення рівня оксиду азоту можливе як за рахунок активації конститутивної, так і індукційної NO-синтази, так Korhonen R. показано, що ліпополісахариди (ЛПС) або ендотоксини є індукторами iNOS [22]. У результаті проведених досліджень нами не виявлено мРНК *Nos2* у лізаті клітин печінки контрольних щурів, проте після 28-денного введення омепразолу було зафіксовано експресію даного гену (нами були одержані продукти ПЛР однакового розміру: 440 п.н.) (табл.1). Основною функцією NO, продукованого iNOS, є участь в імунних процесах, включаючи антипатогенні реакції, неспецифічну цитотоксичність, протипухлинний захист та ін. Активацію експресії індукційної NO-синтази можна пояснити зростанням рівня прозапальних факторів. Індукція iNOS в клітинах може бути ініційована прозапальними цитокинами – інтерфероном γ (ІФН- γ), фактором некрозу пухлин α (ФНП- α) або інтерлейкіном-1, -6 (ІЛ-1, ІЛ-6). Оксид азоту, що утворюється при активації індукційної ланки синтезу NO, може взаємодіяти з численними білками і ферментами в сигнальних шляхах клітин. Вони включають молекули, залучені в передачу цитокінового сигналу, такі як JAK- або STAT-білки, шлях NF κ B / I κ B, а також MAGK, деякі G-білки та фактори транскрипції [23, 24]. Саме нітрозилування цистеїну в цих білках може призвести до їх активації або інактивації. На ранніх стадіях хронічного захворювання печінки вироблення цитокинів стимулює сам пошкоджуючий агент (етанол, бактерії), на більш пізніх – цю роль, в основному, беруть на себе ендотоксини. Дія цитокинів відбувається найчастіше місцево, там, де формується імунна відповідь або в місці проникнення патогена. У нормі цитокини, утворені при первинній імунній відповіді, практично не надходять в кров. Тільки при патології їх вміст в сироватці крові підвищується, що було раніше показано за умов тривалого введення омепразолу [25]. За сучасними уявленнями про-

відна роль у розвитку захворювань печінки належить імунорегуляції [26]. Розглядаючи патофізіологічний ланцюг перетворень при токсичному ураженні печінки – першою ланкою є продукція ФНП- α , який стимулює вироблення інших цитокинів. Хоча анатомічне розташування печінки й її центральна роль в детоксикації обумовлюють постійну атаку органу бактеріальними ендотоксинами [27], які індукують ФНП-генерацию в інших тканинах, експресію генів ФНП- α в нормальній печінці виявлено в слідових кількостях. Порівняння печінки здорових щурів та тварин, після хронічного впливу етанолу виявило в останніх уразливість до летальних сигналів, які запускаються активацією I типу рецепторів ФНП- α , що призводить до ФНП- α опосередкованого посилення продукції гепатоцитами активних кисневих радикалів [28]. Показано, що джерелом цього цитокіну при хронічних ураженнях печінки є не тільки клітини запального інфільтрату, але й власне гепатоцити [29]. Рецептори до іншого прозапального цитокіна ІЛ-6 також знайдені в гепатоцитах [30, 31]. За різноманітним клітинним джерел і мішеней біологічної дії інтерлейкін-6 є одним з найбільш активних цитокинів, які беруть участь у реалізації імунної відповіді і реакціях запалення. Активність ІЛ-6 по відношенню до клітин печінки полягає в експресії генів, що контролюють синтез білків гострої фази при запаленні. Нами показано підвищення рівня прозапальних цитокинів ФНП- α (на 26%, $p < 0,05$), ІЛ-6 (в 8 разів, $p < 0,05$) у клітинах печінки щурів при експериментальній гіпохлоргідрії (табл. 2), що може призводити до стимуляції вироблення амілоїдних пептидів, пригнічення синтезу білка гепатоцитами, інгібування глікогенезу, порушення мітохондріального дихання та індукції гепатоцелюлярного апоптозу. Більш того, стійке збільшення рівня прозапальних цитокинів може призводити до перетворення зірчастих клітин в колаген-продукуючі та до розвитку фіброзу [32].

Таблиця 1. Вміст про- та протизапальних цитокинів у лізаті гепатоцитів щурів з тривалою шлунковою гіпохлоргідрією ($M \pm m$; $n = 10$)

Показники \ Група тварин	Контроль	Омепразол
ІЛ-6, пмоль/мг білка	10,22 $\pm$ 0,88	83,22 $\pm$ 7,21*
ФНП- α , пмоль/мг білка	40,14 $\pm$ 3,39	53,53 $\pm$ 4,21*

Примітка: * – $p < 0,05$ порівняно з контролем.

Отримані дані узгоджуються з ефектами ендотоксинів і ролі цитокинів в патофізіології ендотоксинемії при надходженні ендотоксинів у печінку, так встановлено, що ліпополісахариди впливають на фагоцитарну активність макрофагів, мають пряму імуносупресорну дію, є ключовими в патогенезі ендотоксичного шоку, який нерідко завершується поліорганною недостатністю, а також відіграють провідну роль у гемокоагуляційних порушеннях при інфекціях [33].

Висновки. Отже, нами показано, що стан експериментальної гіпохлоргідрії супроводжується активацією системи оксиду азоту та гіперпродукцією прозапальних цитокинів у клітинах печінки щурів, що може бути пов'язано з розвитком дисбактеріозу в умовах довготривалого зниження секреції гідрохлоридної кислоти.

Список використаних джерел

1. Linar E.Yu. Acid secretion in the stomach in health and disease. – Riga: "Zinante", 1968. – 139 p.
2. Jensen R. Consequences of long-term proton-pump blockade: insights from studies of patients with gastrinomas // Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology. – 2006. – Vol.98, №1. – P.4-19.
3. Olbe L., Berglindh T., Elander B., et al. Properties of a new class of gastric acid inhibitors // Scand J Gastroenterol Suppl. – 1979. – №55. – P.131-135.

4. Yang Y.X., Hennessy S., Probert K., et al. Chronic proton pump inhibitor therapy and the risk of colorectal cancer // Gastroenterology. – 2007. – №133 (3). – P. 748-754.
5. Kassarian Z., Russell R.M. Hypochlorhydria: a factor in nutrition // Annual Review of Nutrition. – 1989. – Vol. 9. – P. 271-285.
6. Williams C., McColl K.E. Proton pump inhibitors and bacterial overgrowth // Alimentary pharmacol. and Therapeutic. – 2006. – Vol. 23. – P. 3-10.
7. Vakal S. E., Dvorshchenko K. O., Dranitsina A. S., Borodina T. V., Ostapchenko L. I. Expression of Cckbr, Gast, Reg1 α , Tgfb1 genes in rat pancreas upon long-term hypoacidty and with administration of multiprobiotic "Symbiter® acidophilic" concentrated // Biopolymers and Cell. – 2012. – Vol. 28 (N 6). – P. 461-467.
8. Scott M.J., Liu S., Su G.L., et al. Hepatocytes enhance effects of lipopolysaccharide on liver nonparenchymal cells through close cell interactions // Shock. – 2005. – №23 (5). – P. 453-458.
9. Seyffarth G., Nelson P.N., Dunmore S.J., et al. Lipopolysaccharide induces nitric oxide synthase expression and platelet-activating factor increases nitric oxide production in human fetal membranes in culture // Reprod Biol Endocrinol. – 2004. – №2. – P. 29-39.
10. Tsyriuk O.I., Beregova T.V. Effect of omeprazole-induced hypergastrinemia on the basal gastric secretion in rats // Bulletin of biological and medical issues. – 2007. – №3. – P. 38-43.
11. Petrenko A.Yu., Sukach A.N., Roslyakov A.D. Non-enzymatic method rat hepatocytes isolation // Biochemistry. – 1991. – Vol. 56, (№9). – P. 1647-1650.
12. Martin M.J., Jimenez M.D., Motilva V. New Issues about Nitric Oxide and its Effects on the Gastrointestinal Tract// Current Pharmaceutical Design. – 2001. – Vol.7. – P. 881-908.

13. Green L. C. Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids / L. C. Green, A. W. David, J. Glosowski [et al.] // Anal. Biochem. – 1982. – Vol. 126, № 1. – P. 131–138.
14. Chomczynski P. Single-step method of RNA isolation by acid guanidiniumthiocyanate-phenol-chloroform extraction / Chomczynski P., Sacchi N. // Anal. Biochem. – 1987. – Vol. 162. – P. 156–159.
15. Nie Shi-Nan, Sun Hai-Chen, Wu Xue-Hao et. al. Cyclooxygenase 2, pS2, inducible nitric oxide synthase and transforming growth factor alpha in gastric adaptation to stress. World Journal of Gastroenterology 2004; 10(23): 3537–3541.
16. Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual (2nd edition). – Cold Spring Harbor Laboratory Press. – 2001 – 2344 p.
17. Konturek P.C., Brzozowski T., Pierchalski P. et. al. Activation of genes for spasmolytic peptide, transforming growth factor alpha and for cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 during gastric adaptation to aspirin damage in rats. Aliment Pharmacol Ther 1998; 12: 767–777.
18. Berthold F. Instrumentation for Chemiluminescence Immunoassays, in Luminescence Immunoassay and Molecular Applications. – Boca Raton: "CRC Press", 1990. – P. 11–25.
19. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randal R.I. Protein measurement with Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol. 193, №1. – P. 265 – 275.
20. Dytham C. Choosing and using statistics. Abiologist's guide. – Oxford: "Blackwell Science", 1999. – 316 p.
21. Abdulahad K., Falaleeva T., Kuharsky V., et al. The effect of long-term gastric hypoacidity on morpho-functional state of digestive tract and Multiprobiotic "Simbiter" correction // Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv. – 2012. – № 15. – P. 4–8.
22. Korhonen, R., Lahti, A., Kankaanranta, H., Moilanen, E., Nitric oxide production and signaling in inflammation // Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy. – 2005. – №4. – P. 471–479.
23. Kleinert H., Wallerath T., Fritz G., Ihrig-Biedert I. et al. Cytokine induction of NO synthase II in human DLD-1 cells: roles of the JAK-STAT, AP-1 and NF-kappaB-signaling pathways // Br J Pharmacol. – 1998. – № 125(1). – P. 193–201.
24. Luo, Y., Umegaki, H., Wang, X., Abe, R., Roth, G.S.. Dopamine induces apoptosis through an oxidation-involved SAPK/JNK activation pathway // J. Biol. Chem. – 1998. – P. 3756–3764.
25. Korotkiy O., Pilipenko S., Kompanets I., Tsyryuk O., Ostapchenko L., Beregova T. Multiprobiotics effect of the content of interferon-gamma in the serum of rats under prolonged hypoacidity // Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv. – 2009. – № 54. – P. 47–49.
26. Leyshner Yu. Autoimmune liver disease and cross syndrome. – JVL: "Anacharsis", 2005. – 174 p.
27. Ivashkin V.G. Cellular and molecular biology of liver inflammation // Rus. Journal. Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology. – 1998. – Vol.8 (№ 5). – P. 13–17.
28. Lieber C. S. Alcoholic liver disease: new insights in pathogenesis lead to new treatments // J Hepatol. – 2000. – №32. – P. 113–128.
29. Kono H., Rusyn I., Yin M. NADPH oxidase-derived free radicals are key oxidants in alcohol-induced liver disease // J Clin Invest. – 2000. – № 106 (7). – P. 867–872.
30. Ketlynsky C.A., Kalinina N.M. Cytokines of mononuclear phagocytes in the regulation of inflammation and immunity // Immunology. – 1995. – №3. – P. 30–44.
31. Freund M., Link H., Schmidt R.E., Welte K. et al. Cytokines in hemopoiesis, oncology and immunology. – Berlin: "Springer-Verlag", 1994. – 711 p.
32. Liu Q. Role of cytokines in the pathophysiology of acute-on-chronic liver failure // Blood Purif. – 2009. – № 28(4). – P. 331–341.
33. Greenberg L.M., Rudnov V.A. Sepsis and systemic inflammatory response theory: an attempt to clinical and morphological consensus // Arch. Pat. – 2007. – Vol. 4. – P. 56–59.

Надійшла до редколегії 25.12.13

О. Берник, асп., К. Дворченко, канд. биол. наук, А. Драницина, канд. биол. наук, Л. Остапченко, д-р биол. наук
КНУ імені Тараса Шевченка, Київ

ИММУНОБИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПЕЧЕНИ КРЫС В УСЛОВИЯХ ДЛИТЕЛЬНОЙ ГИПОХЛОРИДРИИ ЖЕЛУДКА

Работа посвящена исследованию взаимосвязи системы оксида азота и уровня цитокинов в клетках печени крыс в условиях длительной гипохлоридрии желудка. Показано накопление нитрит иона и повышение активности синтазы оксида азота в клетках печени при сниженной желудочной секреции. В настоящее время доказана ключевая роль оксида азота в регуляции иммунных реакций, так нами установлено, что длительная гипохлоридрия сопровождается выработкой провоспалительных цитокинов (фактора некроза опухоли α, интерлейкина-6).

Ключевые слова: печень, гипохлоридрия, система синтазы оксида азота, цитокины.

O. Bernuk, PhD stud., A. Dvorschenko, Phd., A. Dranicina, Phd., L. Ostapchenko, D.Sci.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv

IMMUNOBIOCHEMICAL PARAMETERS OF RAT'S LIVER UNDER LONG-TERM GASTRIC HYPOCHLORHYDRIA

The present study aimed to correlation of nitric oxide system and cytokine levels in rat's liver cells under prolonged hypochlorhydria. Nitrite ions accumulation attached to increase nitric oxide synthase activity in the liver cells under reducing gastric acid secretion. Currently proved nitric oxide key role in the regulation of immune responses, so, prolonged hypochlorhydria accompanied by the synthesis of proinflammatory cytokines (tumor necrosis factor α, interleukin-6).

Keywords: liver, hypochlorhydria, nitric oxide system, cytokines.

УДК 577.112.7

І. Кривдюк, асп., Т. Бакалець, асп., О. Рябовол, студ., Д. Мінченко, канд. мед. наук
Інститут біохімії НАН України, Київ

ЕКСПРЕСІЯ МРНК GADD34 ТА GADD45 У КЛІТИНАХ ГЛІОМИ ЛІНІЇ U87: ВПЛИВ БЛОКАДИ СИГНАЛЬНОГО ЕНЗИМУ ERN1 ТА ДЕФІЦИТУ ГЛЮКОЗИ

Фактори GADD34 та GADD45 відіграють важливу роль у пригніченні росту злоякісних пухлин. Встановлено, що блокада обох ензиматичних функцій сенсорно-сигнального ензиму ERN1 (від ендоплазматичного ретикулу до ядра-1), що є основним компонентом сигналізу за умов стресу ендоплазматичного ретикулу, суттєво знижує рівень експресії генів GADD34 і GADD45A та посилює експресію гена GADD45B у клітинах гліоми лінії U87. Збільшення рівня експресії гена GADD45B та зниження експресії генів GADD34 і GADD45A у клітинах гліоми за умов пригнічення обох ензиматичних активностей ERN1 може приймати участь у пригніченні проліферації цих клітин. Встановлено, що дефіцит глюкози посилює експресію генів GADD34, GADD45A та GADD45B в обох типах клітин гліоми, але пригнічення функції сигнального ензиму ERN1 модифікує ефект дефіциту глюкози на рівень експресії як GADD34, так і GADD45A та GADD45B. Таким чином, результати даної роботи продемонстрували, що експресія генів GADD34, GADD45A та GADD45B у клітинах гліоми лінії U87 є залежною від сигнального ензиму ERN1 і змінюється за умов дефіциту глюкози, причому вираженість ефекту дефіциту глюкози істотно залежить від функції сигнального ензиму ERN1.

Ключові слова: GADD34, GADD45, глюкоза, клітки гліоми.

Вступ. Ішемія, як і гіпоксія, є важливим фактором росту різних злоякісних пухлин, в тому числі гліом, причому вони, як і багато інших факторів, є індукторами стресу ендоплазматичного ретикулу і експресії вели-

кої групи генів, зокрема тих, що контролюють процеси проліферації [1, 2]. Стрес ендоплазматичного ретикулу є відповіддю на накопичення не згорнутих чи неправильно згорнутих протеїнів у ендоплазматичному

ретикулумі і опосередковується трьома сенсорно-сигнальними системами, локалізованими в ендоплазматичному ретикулумі: ERN1/IRE1 (Endoplasmic Reticulum to Nuclei-1/Inositol Requiring Enzyme-1), PERK (PRK-like Endoplasmic Reticulum Kinase) та ATF6 (Activating Transcription Factor 6), але саме ERN1 (від ендоплазматичного ретикулуму до ядра-1) є головною сенсорно-сигнальною системою стресу ендоплазматичного ретикулуму [3 – 7]. За умов активації стресу ендоплазматичного ретикулуму блокується синтез протеїнів і припиняється вхід нових протеїнів, що синтезуються, в ендоплазматичний ретикулум, що сприяє не лише фолдингу протеїнів, які уже є в ендоплазматичному ретикулумі, а і їх деградації, а це необхідно для виживання клітин або їх смерті через механізми, асоційовані зі стресом ендоплазматичного ретикулуму [8 – 11].

Сенсорно-сигнальний ензим ERN1 є біфункціональним, оскільки має два різних каталітичних домени (серин/треонінової кінази та ендорибонуклеази), які опосередковують залежний від ERN1 сигналінг. Відомо, що асоційована з ERN1 кіназна активність аутофосфорилує цей ензим і що це фосфорилування є необхідним моментом його димеризації та активації ендорибонуклеази ERN1. Ця ендорибонуклеаза є відповідальною за деградацію певних мРНК та ініціацію альтернативного сплайсингу пре-XBP1 (X-box binding protein 1) мРНК [9, 10]. Зрілий сплайс-варіант мРНК XBP1 (XBP1s) є матрицею для синтезу транскрипційного фактора, що контролює експресію сотень генів, які мають відношення до стресу ендоплазматичного ретикулуму [10, 11], зокрема до регуляції процесів проліферації та смерті клітин [12, 13]. Також відомо, що фосфорилування XBP1s протеїнкіназою р38 MAP та його взаємодія з регуляторною субодиною фосфатидилінозитол 3-кінази збільшують ядерну транслокацію XBP1s, а взаємодія з транскрипційним фактором FOXO1 (Forkhead box O1) сприяє опосередкованій протеосою деградації цього фактора [13, 14].

Сигнальний шлях ERN1 стресу ендоплазматичного ретикулуму тісно пов'язаний з ефектами ішемії і гіпоксії, а також процесами проліферації і росту злоякісних пухлин, оскільки було показано, що повна блокада функції цього сигнального шляху у клітинах гліоми та аденокарциноми легень призводить до пригнічення росту пухлин із цих клітин [9, 15, 16]. Відомо, що гліоми є надзвичайно агресивними пухлинами з вираженням ангиогенезу та посиленою інвазією клітин в нормальну паренхіму головного мозку і що як гіпоксія, так і чинники, що імітують ефекти ішемії, є асоційованими з ростом гліом, сприяють виживанню пухлинних клітин і посилюють їх агресивність [8]. Детальне вивчення механізмів залежності клітин від гіпоксії є необхідною умовою для розробки терапевтичних стратегій сенсibiлізації клітин та пригнічення ангиогенезу у клітинах пухлин шляхом блокади механізмів їх виживання.

Фактори GADD34, GADD45A та GADD45B, що кодують синтез високоактивних регуляторів смерті клітин відіграють важливу роль в рості злоякісних пухлин, але молекулярні механізми їх регуляції вивчені ще недостатньо. Фактор GADD34 (growth arrest and DNA-damage-inducible 34) являє собою регуляторну субодиною 15A протеїнфосфатази 1 (PPP1R15A; protein phosphatase 1, regulatory subunit 15A) і є поліфункціональним протеїном, що відіграє важливу роль в регуляції низки процесів, зокрема в синтезі протеїнів шляхом дефосфорилування фактора ініціації трансляції EIF2S1, фосфорилування якого виключає трансляцію за умов стресу ендоплазматичного ретикулуму [17]. Фактори GADD45A та GADD45B задіяні в регуляції процесів росту та апоптозу

як пухлинні супресори, але рівень їх експресії, як і механізм дії, може бути різним у злоякісних пухлинах, що вимагає подальшого вивчення ролі цих факторів у їх виникненні та рості [18, 19].

Метою даної роботи було вивчення експресії генів, що кодують синтез факторів GADD34, GADD45A та GADD45B, які задіяні в регуляції процесів росту та апоптозу, у клітинах гліоми лінії U87 з повним (як кінази, так і ендорибонуклеази) пригніченням функції сенсорно-сигнального ензиму ERN1 за умов гіпоксії.

Матеріали та методи. Клітини гліоми лінії U87 були отримані із Американського банку клітинних культур ATCC (American Type Culture Collection; США) і росли у середовищі DMEM (Dulbecco's modified Eagle's minimum essential medium; Gibco, Invitrogen, США) з високою концентрацією глюкози (4.5 г/л), що містило додатково 2 mM глутаміну, 10% ембріональної сироватки телят (Equitech-Bio, Inc., США), пеніцилін (100 одиниць/мл; Gibco) та стрептоміцин (0.1 мг/мл; Gibco) при 37°C в інкубаторі з 5% CO₂. У цій роботі були використані три сублінії цих клітин гліоми: 1) контрольні клітини гліоми, що були стабільно трансфектовані вектором pcDNA3.1, та 2) клітини з повним пригніченням функції сенсорно-сигнального ензиму ERN1 домінантною негативною конструкцією dnERN1, що не мала кіназного та ендорибонуклеазного доменів ERN1. Пригнічення функції ензиму ERN1 було оцінено раніше по рівню фосфорилування ERN1 та утворенню альтернативного сплайс-варіанту XBP1 за умов індукованого тунікамідом (10 мкг/мл протягом 2 годин) стресу ендоплазматичного ретикулуму [20]. При дослідженні впливу дефіциту глюкози клітини промивали, додавали середовище DMEM (Gibco) без глюкози і витримували протягом 16 годин.

РНК із клітин гліоми виділяли як описано раніше [20]. Осад РНК промивали 75 % етанолом, розчиняли у воді, вільній від рибонуклеаз, переосаджували етанолом, знову розчиняли у воді і використовували для синтезу комплементарної ДНК. Синтез кДНК проводили за допомогою Quantitect Reverse Transcription Kit (QIAGEN, Німеччина) згідно протоколу виробника.

Рівень експресії різних генів GADD34, GADD45A та GADD45B у клітинах гліоми визначали методом кількісної полімеразної реакції використовуючи "Mx 3000P QPCR" (Stratagene, США) та SYBRGreen Mix (AB gene, Велика Британія). Для ампліфікації кДНК GADD34 (growth arrest and DNA-damage-inducible 34) also known as PPP1R15A (protein phosphatase 1, regulatory subunit 15A) були використані такі праймери: прямий (5'-GAATCAAGCCACGGAGGATA -3') та зворотний (5'-CAGGGAGGACACTCAGCTTC -3'). Нуклеотидні послідовності цих праймерів відповідають послідовності 953 – 972 та 1261 – 1242 кДНК PPP1R15A людини (GenBank номер NM_014330). Розмір ампліфікованого фрагмента 309 п.н.з. Ампліфікацію кДНК GADD45A (growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha) also known as DDIT1 (DNA damage-inducible transcript 1 protein) проводили за допомогою прямого (5'-ACGAGGACGACGACAGAGAT -3') та зворотного (5'-TCCCGGCAAAAACAAATAAG -3') праймерів, які відповідають послідовності 503 – 522 та 764 – 745 кДНК GADD45A людини (GenBank номер NM_001924). Розмір ампліфікованого фрагмента 262 п.н.з. Для ампліфікації кДНК GADD45B (growth arrest and DNA-damage-inducible, beta) also known as MyD118 (negative growth regulatory protein or myeloid differentiation primary response protein) були використані такі праймери: прямий – 5'-TCGGATTTTGAATTTCTCC-3' та зворотний

– 5'– TGTCACAGCAGAAGGACTGG –3'. Нуклеотидні послідовності цих праймерів відповідають послідовності 168-187 та 487 – 468 кДНК GADD45B людини (GenBank номер NM_015675). Розмір ампліфікованого фрагмента 320 п.н.з. Ампліфікацію кДНК бета-актину (ACTB) проводили за допомогою прямого – 5'– GGACTTCGAGCAAGAGATGG –3' та зворотного – 5'– AGCACTGTGTTGGCGTACAG –3' праймерів. Нуклеотидні послідовності цих праймерів відповідають послідовності 747 – 766 та 980 – 961 кДНК ACTB людини (GenBank номер NM_001101). Розмір ампліфікованого фрагмента 234 п.н.з. По рівню експресії мРНК бета-актину оцінювали кількість РНК, взятої для аналізу. Праймери були отримані з компанії "Sigma-Aldrich" (США).

Аналіз результатів дослідження експресії генів *GADD34*, *GADD45A* та *GADD45B* виконували з допомогою спеціальної комп'ютерної програми "Differential

expression calculator" а статистичний аналіз – в Excel програмі. Значення експресії генів *GADD34*, *GADD45A* та *GADD45B* нормалізували по рівню експресії бета-актину і представляли у відсотках від контролю (100 %). Представлені $M \pm m$; $n = 4$.

Результати дослідження та їх обговорення. Як видно із даних, приведених на рис. 1, пригнічення кінзної та ендорибонуклеазної активностей сенсорно-сигнального ензиму ERN1, основного сигнального шляху стресу ендоплазматичного ретикулуму, призводить до зниження рівня експресії генів *GADD34* та *GADD45A* у клітинах гліоми лінії U87 у порівнянні з контрольними клітинами, трансфеккованими вектором pCDNA3.1. В той же час, блокада обох ензиматичних активностей сигнального ензиму ERN1 у клітинах гліоми призводить до посилення експресії гена *GADD45B* (рис. 1).

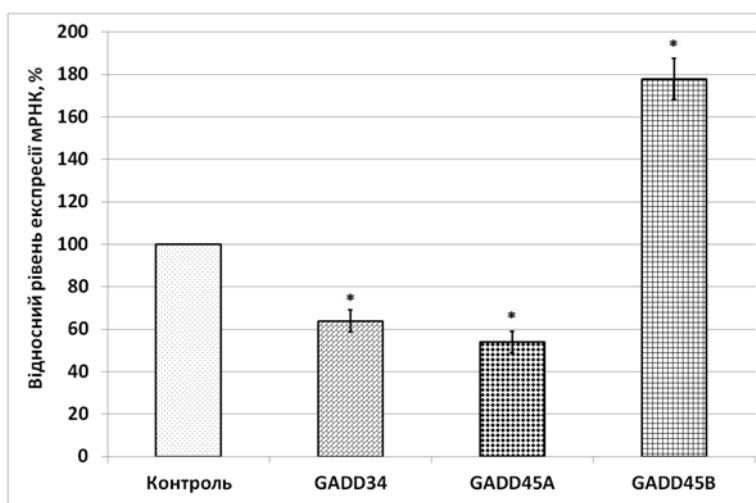


Рис. 1. Зміни рівня експресії генів *GADD34* (growth arrest and DNA-damage-inducible 34) відомого також як *PPP1R15A* (protein phosphatase 1, regulatory subunit 15A), *GADD45A* (growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha) відомого ще як *DDIT1* (DNA damage-inducible transcript 1 protein) та *GADD45B* (growth arrest and DNA-damage-inducible, beta) відомого також як *MyD118* (negative growth regulatory protein or myeloid differentiation primary response protein) у клітинах гліоми лінії U87, трансфекованих вектором pCDNA3.1 (Контроль) та клітин, стабільно трансфекованих домінант-негативною конструкцією ензиму ERN1 (dnERN1), за даними кількісної полімеразної ланцюгової реакції. Рівень експресії цих мРНК нормалізували по експресії бета-актину і представляли як відхилення від контролю, прийнятого за 0; $n = 4$; * – $P < 0,05$ при порівнянні з контролем

Відомо, що фактори *GADD34* та *GADD45A* є поліфункціональними протеїнами, що відіграють важливу роль у регуляції багатьох процесів, в тому числі в регуляції росту злоякісних пухлин як високоактивні регулятори смерті клітин [17]. Варто відмітити, що фактори *GADD45A* та *GADD45B* є спорідненими і задіяні в регуляції процесів росту та апоптозу як пухлинні супресори, але не зважаючи на це рівень їх експресії може бути різним у злоякісних пухлинах [18, 19], і це в деякій мірі співпадає з отриманими нами даними про різнонаправленість змін в експресії генів *GADD45A* та *GADD45B* за умов пригнічення ERN1 сигнального шляху стресу ендоплазматичного ретикулуму. Таким чином, можна припустити, що зменшення рівня експресії генів *GADD34* та *GADD45A* у клітинах гліоми лінії U87 за умов блокади обох ензиматичних активностей сигнального ензиму ERN1 призводить до пригнічення проліферації клітин та росту пухлин із цих клітин, що було встановлено раніше в дослідженнях проф. М. Moenner [15,

16]. В той же час, для виявлення функціонального значення посилення експресії гена *GADD45B* у клітинах гліоми з виключеною функцією ензиму ERN1 потрібні подальші поглиблені дослідження.

Як видно із даних, приведених на рис. 2, за умов дефіциту глюкози у середовищі експресія гена *GADD34* у контрольних клітинах гліоми посилюється майже втричі, а у клітинах з повним пригніченням функції сенсорно-сигнального ензиму ERN1 – більше ніж у десять разів.

Оскільки *GADD34* представляє собою регуляторну субодиницю протеїнфосфатази 1 (*PPP1R15A*), то дефосфорилюючи фактор ініціації трансляції EIF2S1 впливає на синтез протеїнів [17]. Встановлено, що дефіцит глюкози у середовищі посилює також рівень експресії генів *GADD45A* та *GADD45B* як у контрольних клітинах гліоми, так і у клітинах з пригніченою функцією сигнального ензиму ERN1, але в останньому випадку в значно більшій мірі (Рис. 3).

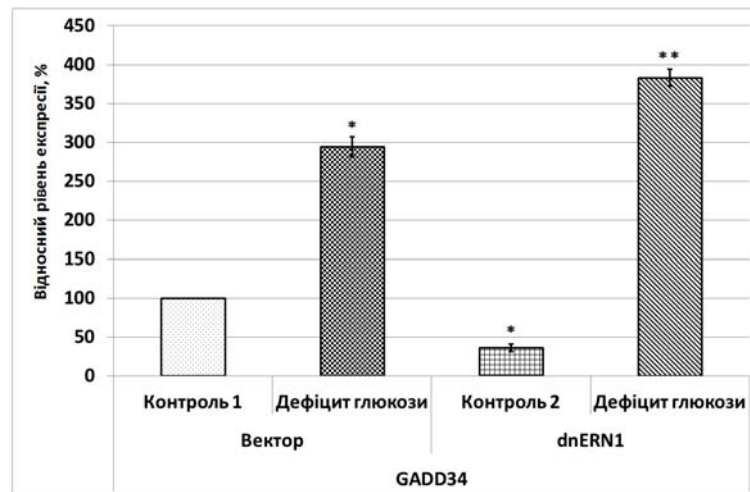


Рис. 2. Вплив дефіциту глюкози у середовищі на рівень експресії гена *GADD34* (*PPP1R15A*) у клітинах гліоми лінії U87, трансфорованих вектором рсDNA3.1 (Вектор) та клітин, стабільно трансфорованих домінант-негативною конструкцією ензиму ERN1 (dnERN1), за даними кількісної полімеразної ланцюгової реакції. Рівень експресії мРНК *GADD34* нормалізували по експресії бета-актину. Значення експресії цього гена у клітинах гліоми за умов дефіциту глюкози у контрольних клітинах гліоми (Вектор) порівнювали з контролем 1 (100 %), а у клітинах, трансфорованих dnERN1, – з контролем 2; $n = 4$; * – $P < 0,05$ при порівнянні з контролем 1, ** – $P < 0,05$ при порівнянні з клітинами, трансфорованими dnERN1 (контроль 2)

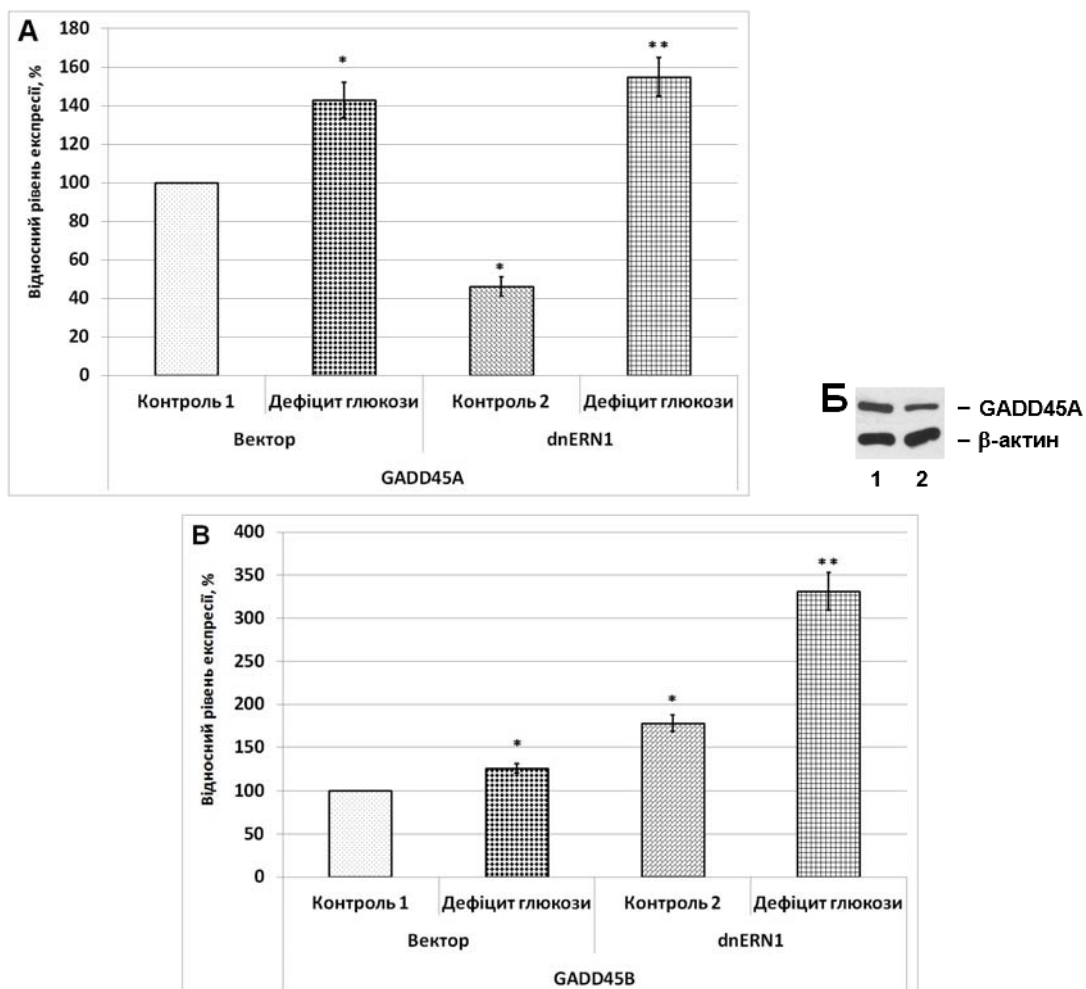


Рис. 3. Ефект дефіциту глюкози у середовищі на рівень експресії мРНК *GADD45A* (А) та *GADD45B* (Б), а також протеїну *GADD45A* (Б) у клітинах гліоми лінії U87, трансфорованих вектором рсDNA3.1 (Вектор) та клітин, стабільно трансфорованих домінант-негативною конструкцією ензиму ERN1 (dnERN1) на основі вектору рсDNA3.1, за даними кількісної полімеразної ланцюгової реакції (мРНК) і Вестерн-блот аналізу (протеїн). У Вестерн-блот аналізі 1 – контрольні клітини гліоми, а 2 – з пригніченою функцією сигнального ензиму ERN1. Рівень експресії мРНК *GADD45A* та *GADD45B* нормалізували по експресії бета-актину. Зміни в експресії цих генів *GADD45B* у клітинах гліоми за умов дефіциту глюкози у середовищі у контрольних клітинах гліоми (Вектор) порівнювали з контролем 1 (100 %), а у клітинах, трансфорованих dnERN1, – з контролем 2; $n = 4$; * – $P < 0,05$ при порівнянні з контролем 1, а ** – $P < 0,05$ при порівнянні з контролем 2

Так, у контрольних клітинах гліоми рівень експресії генів *GADD45A* та *GADD45B* збільшується за умов дефіциту глюкози у середовищі на 43 % та 26 %, відповідно, тоді як у клітинах з виключеною функцією ензиму ERN1 рівень індукції експресії цих генів є значно більшим: експресія гена *GADD45A* посилюється більше ніж у три рази (рис. 3A), а гена *GADD45B* – майже вдвічі (рис. 3B).

Крім того, нами показано, що рівень протеїну *GADD45B* збільшується у клітинах з повним пригніченням функції сигнального ензиму ERN1 у порівнянні з контрольними клітинами гліоми (рис. 3B).

Таким чином, результати проведених досліджень продемонстрували залежність експресії генів *GADD34*, *GADD45A* та *GADD45B* від функції сигнального ензиму ERN1 у клітинах гліоми лінії U87, а також чутливість їх експресії до дефіциту глюкози у середовищі і виражене посилення ефекту дефіциту глюкози за умов блокади ERN1, основного сигнального ензиму стресу ендоплазматичного ретикулу. Більше того, значне зниження рівня експресії генів *GADD34* та *GADD45A*, як і підвищення рівня експресії гена *GADD45B* у клітинах гліоми з пригніченою функцією сигнального ензиму ERN1 корелює з пригніченням росту пухлин з цих клітин *in vivo* [15, 16] і можливо вносить свій вклад у цей процес, оскільки ці фактори є ключовими у регуляції процесів проліферації та апоптозу [17, 18].

Висновки: 1. Встановлено, що пригнічення обох ензиматичних функцій біфункціонального сенсорно-сигнального ензиму ERN1, основного сигнального ензиму стресу ендоплазматичного ретикулу, знижує рівень експресії генів *GADD34* та *GADD45A* у клітинах гліоми лінії U87, а експресію гена *GADD45B* – посилює.

2. Показано, що рівень експресії генів *GADD34*, *GADD45A* та *GADD45B* за умов відсутності глюкози у середовищі збільшується у контрольних клітинах гліоми і що виключення сигнального ензиму ERN1 значно посилює ефект дефіциту глюкози на експресію всіх цих генів.

3. Результати досліджень свідчать про залежність експресії генів *GADD34*, *GADD45A* та *GADD45B* у кліти-

нах гліоми лінії U87 від функції ERN1, основного сенсорно-сигнального ензиму стресу ендоплазматичного ретикулу, а також про чутливість їх експресії до дефіциту глюкози, причому ця чутливість значно посилюється у клітинах з пригніченим ERN1.

Список використаних джерел

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. Zhang K., Kaufman R.J. J. *Biol. Chem.* – 2004. 279, N 25. – P. 25935 – 25938.
4. Bi M., Naczki C., Koritzinsky M. et al. *EMBO J.* – 2005. – 24, N 19. – P. 3470 – 34815.
5. Aragón T., van Anken E., Pincus D. et al. // *Nature.* – 2009. – 457, N 7230. – P. 736 – 740.
6. Fels D.R., Koumenis C. // *Cancer Biology & Therapy.* – 2006. – 5, N 7. – P. 723 – 728.
7. Korennykh A.V., Egea P.F., Korostelev A.A. et al. // *Nature.* – 2009. – 457, N 7230. – P. 687 – 693.
8. Moenner M., Pluquet O., Boucheccareilh M., Chevet E. // *Cancer Res.* 2007. – 67, N 22. – P. 10631 – 10634.
9. Romero-Ramirez L., Cao H., Nelson D. et al. *Cancer Res.* – 2004. – 64, N 17. – P. 5943 – 5947.
10. Acosta-Alvear D., Zhou Y., Blais A. et al. // *Molecular Cell.* – 2007. – 27. – P. 53 – 66.
11. Hollien J., Lin J.H., Li H. et al. // *J. Cell. Biol.* – 2009. – 186, N 3. – P. 323 – 331.
12. Lee J., Sun C., Zhou Y. et al. *Nature Medicine.* – 2011. – 17, N 10. – P. 1251 – 1260.
13. Zhou Y., Lee J., Reno C.M. et al. *Nature Medicine.* – 2011. – 17, N 3. – P. 356 – 365.
14. Park S.W., Zhou Y., Lee J. et al. *Nature Medicine.* – 2010. – 16, N 4. – P. 429 – 437.
15. Drogat B., Auguste P., Nguyen D.T. et al. // *Cancer Res.* – 2007. – 67. – P. 6700 – 6707.
16. Auf G., Jabouille A., Guérit S. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2010. – 107, N 35. – P. 1555 – 15558.
17. Garrido J.L., Maruo S., Takada K., Rosendorff A. *Viro. J.* – 2009. – 6. – P. 231.
18. Wang L., Xiao X., Li D. et al. *O. Nransl. Med.* – 2012 – 10. – P. 215.
19. Michaelis K.A., Knox A.J., Xu M. et al. *Endocrinology.* – 2011. – 152, N 10. – P. 3603-3613.
20. Minchenko D.O., Kubajchuk K.I., Hubenia O.V. et al. *Adv. Biol. Chem.* – 2011. – 2, N 2. – P. 198 – 206.

Надійшла до редколегії 09.12.13

И. Кривдюк, асп., Т. Бакалец, асп., О. Рябовол, студ., Д. Минченко, канд. мед. наук
Институт биохимии НАН Украины, Киев

ЕКСПРЕССИЯ мРНК GADD34 И GADD45 В КЛЕТКАХ ГЛИОМЫ ЛИНИИ U87: ВЛИЯНИЕ БЛОКАДЫ СИГНАЛЬНОГО ЭНЗИМА ERN1 И ДЕФИЦИТА ГЛЮКОЗЫ

Факторы *GADD34* и *GADD45* играют важную роль в подавлении роста злокачественных опухолей. Установлено, что блокада обеих ферментативных функций сенсора – сигнального энзима ERN1 (от эндоплазматического ретикулула к ядру -1), является основным компонентом сигналинга в условиях стресса эндоплазматического ретикулула, существенно снижает уровень экспрессии генов *GADD34* и *GADD45A* и усиливает экспрессию гена *GADD45B* в клетках глиомы линии U87. Увеличение уровня экспрессии гена *GADD45B* и снижение экспрессии генов *GADD34* и *GADD45A* в клетках глиомы в условиях подавления обеих ферментативных активностей ERN1 может принимать участие в подавлении пролиферации этих клеток. Установлено, что дефицит глюкозы усиливает экспрессию генов *GADD34*, *GADD45A* и *GADD45B* в обоих типах клеток глиомы, но угнетение сигнального энзима ERN1 модифицирует эффект дефицита глюкозы на уровень экспрессии как *GADD34*, так и *GADD45A* и *GADD45B*. Таким образом, результаты данной работы продемонстрировали, что экспрессия генов *GADD34*, *GADD45A* и *GADD45B* в клетках глиомы линии U87 является зависимой от сигнального энзима ERN1 и меняется в условиях дефицита глюкозы, причем выраженность эффекта дефицита глюкозы существенно зависит от функции сигнального энзима ERN1.

Ключевые слова: *GADD34*, *GADD45*, глюкоза, клетки глиомы.

I. Kryvdiuk, PhD stud., T. Bakalets, PhD stud., O. Riabovol, stud., D. Minchenko, PhD.
Palladin institute of biochemistry of National Academy of Sciences of Ukraine NASU, Kyiv

EXPRESSION OF GADD34 AND GADD45 MRNA IN U87 GLIOMA CELLS: EFFECT OF ERN1 SIGNALING ENZYME AND GLUCOSE DEPRIVATION

GADD34 and *GADD45* factors play an important role in suppression of malignant tumor growth. It was shown that blockade of both enzymatic functions of sensor and signaling enzyme ERN1 (from endoplasmic reticulum to nuclei-1), the major component of endoplasmic reticulum stress signaling, decreases the expression level of genes *GADD34* and *GADD45A* and increases the *GADD45B* gene expression in U87 glioma cell. The increase of *GADD45B* and decrease of *GADD34* and *GADD45A* gene expressions in glioma cells with ERN1 signaling enzyme loss of function is possibly participated in suppression of these cells proliferation. It was shown that, that glucose deprivation condition leads to enhance the expression of *GADD34*, *GADD45A* and *GADD45B* genes in both types of glioma cells, but complete blockade of ERN1 enzyme function modifies the effect of glucose deprivation condition on the expression level all of these genes. Thus, results of this investigation demonstrated that the expression of *GADD34*, *GADD45A* and *GADD45B* genes in U87 glioma cells is dependent from signaling enzyme ERN1 and is changed by glucose deprivation condition, but its effect depends from ERN1 signaling enzyme function.

Key words: *GADD34*, *GADD45*, glucose, glioma cells.

УДК 576.57.085.602

О. Маслова, асп., Г. Островська, проф.
КНУ імені Тараса Шевченка, Київ

МОДИФІКОВАНІ УМОВИ КУЛЬТИВУВАННЯ ЯК СПОСІБ ВПЛИВУ НА МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ КЛІТИН ПУПОВИНИ ЛЮДИНИ

Дослідження присвячено стандартизації процедури культивування мезенхімальних клітин пуповини людини. Описано ефекти збагаченої тромбоцитами плазми та синтетичних інгібіторів протеїнкіназ на культуру мезенхімальних клітин. Показано, що збагачена тромбоцитами плазма може бути замінником ембріональної телячої сироватки, а ефекти синтетичних інгібіторів протеїнкіназ на культуру клітин залежать від їх хімічної структури і концентрації та від періоду росту культури.

Ключові слова: пуповина, культура клітин, мезенхімальні клітини, збагачена тромбоцитами плазма, інгібітори протеїнкіназ.

Вступ. Морфофункціональні характеристики мезенхімальних стовбурових клітин (або мультипотентних стромальних клітин) є питанням, що активно та різнобічно вивчається у провідних лабораторіях світу. Адже саме МСК є на сьогодні найбільш перспективним джерелом клітинного матеріалу для регенеративної медицини [1, 2]. Одним з найбільш оптимальних джерел МСК вважається сполучна тканина пуповини. Клітини отримані з цього матеріалу є онтогенетично ранньою популяцією та займають проміжне місце між мультипотентними та плюрипотентними клітинами. Важливими факторами на користь пуповини також є відсутність етичних протиріч, доступність, адже пуповина вважається утильним матеріалом, відносна простота ізолювання мезенхімальних клітин [1-3].

Однак різноманіття патологій, що можуть бути скориговані за допомогою цих клітин, приводить до потреби детальної характеристики та ретельної підготовки матеріалу. Проблема адекватної підготовки МСК до введення пацієнтам гостро стоїть у всьому світі. Задля уніфікації вимог до умов роботи з клітинами було створено низку міжнародних стандартів, найбільш популярним з яких є фармацевтичний стандарт GMP (good manufacturing practice), що для роботи з клітинами і тканинами був модифікований у стандарт GTP (good tissue practice) [1-3]. У даній роботі розглядаються можливості регулювання властивостей МСК у культурі лише з науково-дослідною метою, проте, базуючись саме на таких дослідженнях, у майбутньому можуть бути розроблені чіткі вказівки щодо підготовки МСК для застосування у конкретних випадках.

Культивування МСК пов'язане з рядом методологічних труднощів. При культивуванні МСК з усіх відомих джерел гостро постає питання підбору оптимального поживного додатка до культурального середовища, що забезпечував би тривале збереження дедиференційованого стану клітин і не спричиняв би малигізації культури [1-11].

Відомо, що важливу роль у проліферації, самовідновленні, диференціюванні й здатності до хоумінгу МСК відіграє активація рецепторів тирозин-кіназного типу, що призначені для зв'язування з ключовими факторами росту (PDGF, EGF, IGF-1 тощо) [4-12]. Збагачена тромбоцитами плазма (ЗБТП) містить близько тисячі ростових факторів, основними з яких є: PDGF $\alpha\alpha$, PDGF $\alpha\beta$, PDGF $\beta\beta$, TGF β 1 та TGF β 2, IGF-1, VEGF, PDAF, FGF, TSP, які виступають у ролі стимуляторів проліферації та регуляторів диференціювання МСК та здатні регулювати формування позаклітинного матриксу [4-9,11]. Похідні малеїмиду здатні взаємодіяти з АТФ-зв'язуючим сайтом тирозин-кіназних рецепторів та, таким чином, впливати на життєдіяльність МСК. Недостатньо вивчено ступінь селективності таких інгібіторів, тому важливим є аналіз їх впливів на характеристики клітин. Інгібітори протеїнкіназ вважаються потужними сучасними

протираковими препаратами. Похідні малеїмиду (MI-1) та дигідропіролу (Д-1) є перспективними кандидатами для використання у терапії. Показано, що ці речовини мають виражений цитостатичний вплив на культури малигізованих клітин (лінія раку товстої кишки та інші) і практично не впливають негативно на нормальні клітини (фібробласти, ендотеліальні та інші) [12-14].

Культивування МСК зі строми пуповини та інших джерел є необхідним етапом нарощення кількості клітин при терапевтичному застосуванні МСК. З метою стандартизації та оптимізації усього процесу культивування до потреби потенційного застосування, ведуться пошуки оптимального джерела ростових факторів не ксеногенного походження (що є вкрай важливо у зв'язку з потенційною небезпекою занесення інфекційних агентів, або інших небезпечних факторів, що не підлягають ефективності детекції.), яке забезпечувало би збереження характеристик, що властиві культурі, вирощеній у присутності стандартного додатку – ЕТС. Існують роботи, що аналізують вплив різних (5-20%) концентрацій ЗБТП на морфофункціональні характеристики культур клітин. Базуючись на цих [4-11] та даних власних попередніх досліджень [16] для роботи було обрано концентрацію 10%.

Метою роботи було вивчення змін морфофункціональних особливостей мезенхімальних клітин пуповини людини за умов культивування у присутності різних стимулюючих (наприкладі ЗБТП) та інгібуючих (наприкладі похідних малеїмиду та дигідропіролу) проліферацію додатків до поживного середовища.

Матеріали та методи. Експеримент проведений на культурах МСК пуповини людини. Пуповини за інформованою згодою породілі були надані Київським пологовим будинком №5. Клітини були ізовані за власною комбінованою (механічна та ферментативна) методикою – патент на корисну модель МПК 2012.01 C12N5/00, №74171 від 25.10.2012 [15]. Культивування проводилось у пластикових флаконах (РАА, Австрія) 75 см² та 25 см². Для оцінки стану культур клітин застосовувався інвертований мікроскоп Leica DMIL. Використовувалось поживне середовище DMEM (Sigma) з низьким вмістом глюкози. Збагачена тромбоцитами плазма отримувалась від здорових донорів за двоетапною методикою центрифугування та згідно рекомендацій для використання у культивуванні клітин [16]. Стандартне джерело ростових факторів – ембріональна теляча сироватка (ЕТС) (виробник: РАА Laboratories) використовувалась у концентрації 10%. Враховуючи неоднозначність літературних даних, що пропонують різні концентрації ЗБТП, було проведено попереднє тестування концентрацій ЗБТП, отриманих з пуповинної крові (аутологічна) та від дорослих донорів (алогенна) і обрано робочу концентрацію 10% [4-11,16]. Було проаналізовано 30 зразків культур МСК 2-го пасажу, що, у залежності від використаного додатку до середовища, були роз-

ділені на 3 групи по 10 зразків: ЕТС, ЗБТП (аутологічна) та ЗБТП (алогенна). За культурами спостерігали протягом 21 дня, до проведення наступного етапу пасажування. Середовище замінювали двічі на тиждень. Два зразки, що вирощувались із додаванням алогенної ЗБТП вибули з наступних етапів порівняння, у зв'язку з вираженим цитотоксичним ефектом, що проявився на третю добу. Аутологічну ЗБТП не вдалось отримати з 3 зразків кордової крові, у зв'язку з гемолізом. Один зі зразків культури, що були вирощені у присутності ЕТС вибув з експерименту через грибкову контамінацію. Однорідність культури оцінювали за ступенем морфологічної подібності одна до одної клітин у культурі, зокрема за такими показниками – фібробластоподібна форма, світла цитоплазма, моношар без атипичних утворень тощо. Для перевірки збереження властивостей МСК було обрано класичні позитивні маркери МСК: CD105, CD90, CD73. Аналіз проводився згідно класичних протоколів. Клітини вміщували в епендорф у вигляді суспензії ($1 - 5 \times 10^6$ кл/мл) у крижаному PBS з додаванням 1 % азиду натрію. Додавали 0,1 – 10 мкг/мл первинних мічених антитіл, розчинених у 3 % BSA/PBS та інкубували 30 хв при кімнатній температурі. Потім клітини відмивали тричі, центрифугуючи на 400 g протягом 5 хв та ресуспендували у 500 мкл крижаного PBS. Після цього етапу матеріал аналізувався у проточному цитометрі. Як мітка використовувався FITC. Були виконані стандартні контрольні виміри. Методика була поставлена у відділі клітинних та тканинних технологій Інституту генетичної та регенеративної медицини НАМНУ. Визначення здатності до хондрогенезу здійснювалось цитохімічно, шляхом забарвлення альціановим синім. Синтетичні інгібітори протеїнкіназ – похідне малеїміду 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF₃-феніламіно)-1H-

пірол-2,5-діон (M1) та похідне дигідропіролу 1,4-заміщений 5-аміно-1,2-дигідропірол-3-он (D1) були синтезовані у ХіміоБіоЦентрі КНУ імені Тараса Шевченка. Для оцінки морфологічних характеристик культури під впливом вищевказаних речовин, клітини висівали з розрахунку 1000 на лунку у 6-лункові планшети з додаванням спадаючих концентрацій речовин M1 та "D-1" (титр від 10^{-3} до 10^{-9} мкг/мл). Паралельно ставились два варіанти: одночасне з розсівом додавання інгібіторів протеїнкіназ та додавання речовин на наступну добу (після прикріплення клітин). Спостереження проводили протягом 7 діб, морфологічні характеристики клітин аналізували на 3-й та 7-й день після висіву клітин.

Результати та їх обговорення. Нами показано, що при культивуванні як у присутності ЕТС, так і у присутності обох варіантів ЗБТП (алогенного та аутологічного) культура мала наступні морфологічні характеристики: виражений клональний ріст, клітини 25-50 мкм у довжину, фібробластоподібні, з одним або кількома овальними ядрами та кількома ядерцями, формують моношар, зустрічаються скупчення клітин (рис. 1). Клітини експресують поверхневі маркери МСК CD105, CD90, CD73 та здатні до перетворення на хондроцити. Досліджувані культури були доведені до 6 пасажу і було показано, що зразки, які культивувались у присутності ЗБТП (алогенної та аутологічної) зберігали морфологічні ознаки МСК [17,18] довше – до 5-6 пасажу: більша частина культури була представлена веретеноподібними клітинами зі світлою цитоплазмою. У присутності ЕТС на 5-6 пасажі вже починали переважати крупні багатоядерні клітини. У деяких клітинах з'являлись темні гранули, а у деяких – прозорі вакуолі. Це може свідчити про початок процесу старіння культури, втрату мультипотентності клітин та розвиток апоптозу.

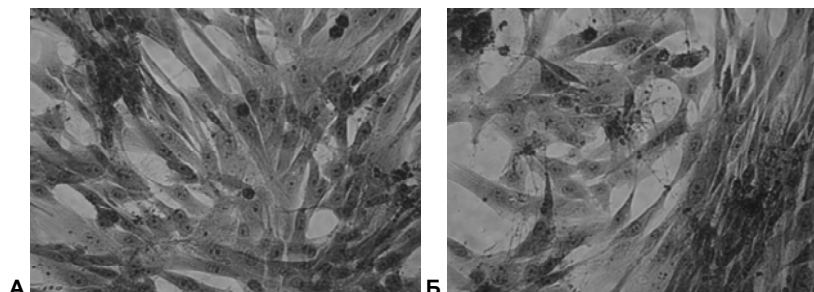


Рис. 1. Порівняння морфологічних характеристик мезенхімальних клітин пуповини людини, що були культивовані у присутності ЕТС (а) та ЗБТП (б), 2 пасаж, зб. $\times 100$, забарвлення гематоксином

Отже, основну мету вибору такого додатку – уникнення елементів ксеногенного походження у середовищі без втрати клітинною культурою морфологічних характеристик можна вважати досягнутою: дане дослідження демонструє ефективність заміни ЕТС на ЗБТП при культивуванні МСК з пуповини людини.

На сьогодні у світі проведено ряд досліджень впливу інгібіторів протеїнкіназ на морфологічні характеристики та проліферативний потенціал культур клітин ссавців різних типів (нормальних та трансформованих). Однак, клітини матриксу пуповини, як і інші типи клітин зі стовбуровими властивостями, для таких досліджень не використовувались. Біологічні ефекти інгібіторів протеїнкіназ M1-1 та D-1 також є ще недостатньо дослідженими, тому відомості про їхні впливи на культуру МСК є особливо цінними.

Для оцінки впливу різних концентрацій M1-1 та D-1 на морфологічні ознаки культури, було обрано культуру мезенхімальних клітин 1-го пасажу у різні періоди часу після висіву (на 3-й та 7-й дні), які різняться за ступенем

прикріплення клітин та їх морфологічними ознаками. На 3-й день після висіву клітин у середовище з додаванням M1-1 та D-1 у концентраціях від 10^{-3} до 10^{-9} моль/л (М) у контрольних культурах були присутні видовжені клітини з рівними краями, що щільно прилягали одна до одної, зі світлою цитоплазмою, досить великим ядром з кількома ядерцями (рис. 2). Середовище навколо культури залишалось прозорим. Культура була майже однорідною, деякі клітини знаходились на стадії поділу. Трипановий синій не забарвив жодної клітини. Ефекти M1-1: Культура, що була висіяна з додаванням M1-1 у концентрації 10^{-3} М містила багато мертвих клітин, та клітин округлих, неправильної форми, з зернистою цитоплазмою. У культурі, що вирощувалась при концентрації M1-1 10^{-4} М зустрічались поодинокі мертві клітини, культура була неоднорідною за морфологічними ознаками. При додаванні M1-1 у концентраціях 10^{-5} – 10^{-7} М культури були схожими за морфологічними ознаками на контрольний зразок. При концентраціях 10^{-8} – 10^{-9} М культури знаходились у хорошому стані, були морфо-

логічно подібними до контрольного зразка, подекуди навіть більш однорідними та з більшою кількістю клітин, що діляться. Ефекти Д-1: стан культури, що була висіяна з додаванням речовини Д-1 у концентрації 10^{-3} М, свідчив про значний цитотоксичний вплив даної речовини, вона практично не містила живих клітин. У культурі, що вирощувалась при концентрації Д-1 10^{-4} М спостерігалась велика кількість мертвих та не прикріплених клітин, зустрічались клітини різної форми, багато з них містили темну зернистість. При додаванні Д-1 у концентраціях 10^{-5} – 10^{-7} М культури наближались за морфологічними ознаками до контрольної, але були все ж менш однорідними. При концентраціях 10^{-8} – 10^{-9} М культури відповідали контрольній за основними характеристиками.

Отже, на 3-й день культивування МСК при концентраціях 10^{-3} – 10^{-4} М ефекти Д1 на життєздатність і морфологічні ознаки клітин є більш вираженими, ніж ефекти МІ-1.

На 7-й день після висіву клітин у середовище з додаванням МІ-1 та Д-1 у концентраціях від 10^{-3} до 10^{-8} М спостерігалась наступна картина. У контрольних зразках переважали видовжені клітини, що щільно прилягали одна до одної. Клітини мали світлу цитоплазму, середовище навколо культури містило невеликі частинки детриту, допустимі для культури такого віку та ступеня конфлюентності. Культура була практично однорідною за морфологічними характеристиками. У деяких ділянках спостерігалось нашарування клітин та їх клональний ріст. Трипановий синій забарвив одиничні клітини (0,5%). Ефекти МІ-1: При додаванні МІ-1 у найбільшій концентрації (10^{-3} М) культура була повністю мертвою. У культурі, що росла за умов додавання МІ-1 у концен-

трації 10^{-4} зустрічались поодинокі мертві клітини, культура була морфологічно неоднорідною, були присутні клітини різного розміру, деякі з них мали великі ядра та відростки. При додаванні МІ-1 у концентраціях 10^{-5} – 10^{-7} М культура була схожою за ознаками на контрольний зразок, але у ній спостерігалось менше нашарувань клітин (рис. 3). МІ-1 у концентраціях 10^{-8} – 10^{-9} М практично не впливав на стан культури, за морфологічними характеристиками клітини відповідали контрольним зразкам та були навіть більш однорідними. Ефекти речовини Д-1: Культура, що була висіяна з додаванням похідного дигідропіролу Д-1 у концентрації 10^{-3} М містила мертві клітини та велику кількість детриту. При додаванні Д-1 у концентрації 10^{-4} М спостерігались мертві клітини, проте зустрічались і живі, фібробластоподібні. За умов додавання Д-1 у концентраціях 10^{-5} – 10^{-7} М спостерігалась культура середньої однорідності, з клітинами дещо більшого (порівняно з контролем) розміру, з великими ядрами (рис. 4), інколи багатоядерні. При культивуванні у присутності Д-1 у концентрації 10^{-8} – 10^{-9} М клітини перебували у хорошому стані, культура була однорідна та чиста. На 3й день після додавання речовин МІ-1 та Д-1 у середовище з попередньо прикріпленими до субстрату клітинами, навіть у концентрації 10^{-5} – 10^{-4} М культура за морфологічними показниками наближалась до контрольної: клітини характерної фібробластоподібної форми, з чітким ядром, у деяких зразках сформувались колонії.

Таким чином, ефекти речовин МІ-1 та Д-1 після прикріплення клітин, навіть при вищих концентраціях, є менш цитотоксичними, ніж до їх прикріплення

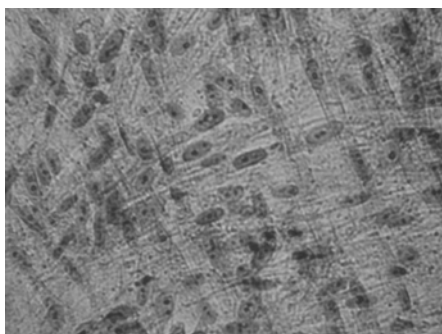


Рис. 2. Контрольна культура мезенхімальних клітин матриксу пуповини 1-го пасажу, забарвлення гематоксилином, зб. $\times 100$

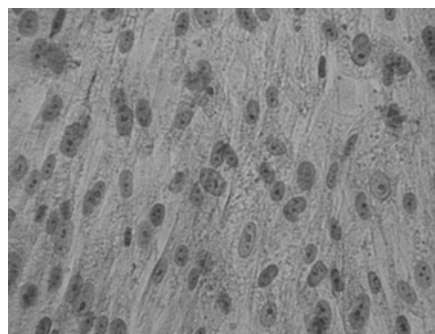


Рис. 3. Культура 1-го пасажу, культивування у присутності МІ-1 10^{-6} моль/л, забарвлення гематоксилином, зб. $\times 100$

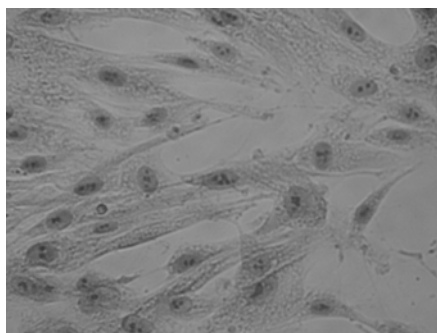


Рис. 4. Культура 1-го пасажу, культивування у присутності речовини Д-1 10^{-6} моль/л, забарвлення гематоксилином, зб. $\times 100$

При додаванні речовин на 2-й день культивування навіть в одразу більшій концентрації культури проявляли більшу стійкість, були більш морфологічно однорідними. Також помітно, що спочатку від більших концент-

рацій клітини гинуть, але ті, що виживають – продовжують нормальну життєдіяльність. Можливо, саме у цьому і проявляється принцип селекції певної популяції клітин. Д-1 спочатку провокує масивну загибель клітин,

але при подальшому підтриманні культури, у зразках з невисокими концентраціями клітини відрізнялись від контролю у кращий бік. Для отримання обґрунтованих висновків планується провести додаткові дослідження, але не виключається можливість селекції певної особливо стійкої до дії інгібіторів протеїнази популяції, що може мати модифіковані властивості, у тому числі – проявляти ознаки трансформованих клітин.

Хоча вважається, що мезенхімальні клітини з матриксу пуповини володіють найменшою туморогенністю, проте вплив застосованих у дослідженні інгібіторів протеїнази на ці клітини є нелінійним. Це може мати наступне пояснення: мезенхімальні клітини, хоч і вважаються гомогенною культурою, найвірогідніше, мають субпопуляції, що дещо відрізняються за морфофункціональними характеристиками. Так, частина клітин може мати надвисокий проліферативний потенціал, а частина – перебувати у стані спокою [1-3]. Можливо, ці функціональні стани впливають і на здатність до диференціювання: Клітини сполучної тканини пуповини прийнято називати плюри/мультипотентними, можливо, у популяції присутні і мультипотентні, і плюрипотентні клітини, а також частина більш диференційованих міофібробластів. Відповідно і потенційний терапевтичний вплив культури та ймовірність виникнення побічних ефектів можуть залежати саме від співвідношення різних субпопуляцій у конкретному зразку клітинного матеріалу. МСК можуть використовуватись як вектори для перенесення субстанцій, у тому числі – з метою боротьби з пухлинами, адже ці клітини володіють унікальною здатністю рухатись у напрямку новоутворень в організмі. Проте існують повідомлення, що вказують на потенційну схильність МСК до підвищення малігнізації. З метою зменшення таких негативних ефектів, МСК можна використовувати паралельно з цитостатичними препаратами, до яких і належать синтетичні інгібітори протеїнази. Тому винятково важливим є багатогранне вивчення впливу таких речовин на МСК. Ці дослідження є абсолютно новими для усієї світової спільноти, тому у даній роботі розглядається лише пілотна частина – вплив синтетичних інгібіторів протеїнази на проліферативну здатність та морфологічні характеристики МСК, отриманих зі сполучної тканини пуповини людини. Отримані дані дозволяють спланувати подальші цитологічні, біохімічні та молекулярно-біологічні дослідження. Таким чином використання MI-1 та речовини D-1 може стати корисним як для більш детального вивчення ефектів цих речовин на різні типи клітин, так і для наближення до розуміння природи МСК та спроби селекції найбільш безпечної субпопуляції клітин.

Висновки. В дослідженні встановлено позитивний вплив збагаченої тромбоцитами плазми (у концентрації 10%) як додатку до середовища культивування на морфо-функціональний стан клітин матриксу пуповини. Показано, що такий додаток, джерело широкого спектру ростових факторів, може бути оптимальним заміном ксеногенного додатку – ембріональної телячої сироватки. Дослідження впливу синтетичних інгібіторів тирозинових протеїназ – речовин MI-1 та D-1 у різних концентраціях – на культури МСК на різних пасажах дозволяє припустити

існування в таких культурах популяцій клітин, що різняться за проліферативним та туморогенним потенціалом.

Список використаних джерел

1. Augello A. Mesenchymal stem cells: a perspective from in vitro cultures to in vivo migration and niche / A. Augello, T. B. Kurth, C. De Bari // Eur. Cell Mater. – 2010. – Vol. 1, No. 20. – P. 121 – 133.
2. Bieback K. Mesenchymal stromal cells from human perinatal tissues: From biology to cell therapy / K. Bieback, I. Brinkmann // World J. Stem. Cells. – 2010. – Vol. 2, No. 4. – P. 81 – 92.
3. Maslova O.O., Umbilical Cord Matrix Cells – Promising Instrument For Regenerative Medicine (Chapter 8) / Maslova O.O., Deryabina O.G., and Kordium V.A. // Biomaterials for Stem Cell Therapy State of the Art and Vision for the Future ISBN 978-1-4665-7639-1. – January 2013. – P.212-217.
4. Thrombin-Activated Platelet-Rich Plasma Are Suitable Alternatives to Fetal Calf Serum for the Expansion of Mesenchymal Stem Cells from Adipose Tissue / A. Kocaoemer, S. Kern, H. Klüter, K. Bieback // Stem. Cells. – 2007. – Vol. 25, No. 5. – P. 1270 – 1278.
5. Platelet lysate: a replacement for fetal bovine serum in animal cell culture? / L. Johansson, J. Klinth, O. Holmqvist, S. Ohlson // Journal Cytotechnology. – 2003. – Vol. 42, No. 2. – P. 67 – 74.
6. PRP: A Possibility in Regenerative Therapy / J. P. M. Issa, R. Tiossi, A. S. da Silva Mello et al. // Int. J. Morphol. – 2007. – Vol. 25. – P. 587 – 590.
7. Peerani R. Enabling stem cell therapies through synthetic stem cell-niche engineering / R. Peerani, P. W. Zandstra // J. Clin. Invest. – 2010. – Vol. 1. – P. 60 – 70.
8. Platelet-derived growth factors enhance proliferation of human stromal stem cells / E. Lucarelli, A. Beccheroni, D. Donati et al. // Biomaterials. – 2003. – Vol. 24. – P. 95 – 100.
9. Influence of Platelet-Rich Plasma on Osteogenic differentiation of Mesenchymal Stem Cells and Ectopic Bone Formation in Calcium Phosphate Ceramics / P. Kasten, J. Vogel, R. Luginbühl et al. // Cells Tissues Organs. – 2006. – Vol. 183. – P. 68 – 79.
10. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC / R. Hass, C. Kasper, S. Böhm, R. Jacobs // Cell Commun. Signal. – 2011. – Vol. 14. – P. 9 – 12.
11. Andrade M. G. S. Evaluation of factors that can modify platelet-rich plasma properties / M. G. S. Andrade, C. J. de Freitas Brandão // Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod. – 2008. – Vol. 105. – P. 5 – 12.
12. Dubinina G.G. Antiproliferative activity of the new derivatives of 1-(4-R-benzyl)-3-R1-4-(R2-phenylamino)-1<-pyrrole-2,5-dione / Dubinina GG, Golovach SM, Kozlovsky VO, Tolmachov AO, Volovenko YuM // Journal Organichnoi ta farmacevtichnoi khimii (Ukraine) – 2007. – Vol. 5. – P. 39-49.
13. Lynchac O. V. Morpho-functional state of the organs of gastrointestinal tract under the maleimide derivate action during one month / Lynchac O. V., Charchuk I. V., Karpezo N. O., Ostrovska G. V., Rybalchenko V. K. // Modern Problems of Toxicology – 2011. – N 1-2. – P. 52 – 55.
14. Garmanchuk L. V. MI1 – derivative of maleimide inhibits cell cycle progression in tumor cells of epithelial origin / Garmanchuk L. V., Denis E. O., Nikulina V. V., Dzhus O. I., Skachkova O. V., Ribalchenko V. K., Ostapchenko L. I. // Biopolymers and Cell. – 2013. – Vol. 29(1). – P. 70-74.
15. Дєрябіна О.Г. Спосіб культивування мезенхімальних стовбурових клітин, отриманих з пуповини людини №51214 Від 12.07.2010 МПК C12N5/00 / Дєрябіна О.Г., Маслова О.О., Сухорада О.М., Кордюм В.А.
16. Маслова О.О. Спосіб отримання мезенхімальних стовбурових клітин з матриксу пуповини людини №74171 Від 25.10.2012 МПК C12N5/00 / Маслова О.О., Кордюм В.А., Шувалова Н.С., Дєрябіна О.Г., Сухорада О.М.
17. O.M. Tong C. K. Generation of mesenchymal stem cell from human umbilical cord tissue using a combination enzymatic and mechanical disassociation method / C. K. Tong, S. Vellasey, B. C. Tan // Cell Biology International. – 2011. – Vol. 35. – P. 221 – 226.
18. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement / M. Dominici, K. Le Blanc, I. Mueller et al. // Cytotherapy. – 2006. – Vol. 8, No. 4. – P. 315 – 317.

Надійшла до редколегії 25.12.13

О. Маслова, асп., Г. Островская, проф.
КНУ імені Тараса Шевченка, Київ

МОДИФИЦИРОВАННЫЕ УСЛОВИЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КАК СПОСОБ ВЛИЯНИЯ НА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ПУПОВИНЫ ЧЕЛОВЕКА

Исследование посвящено стандартизации процедуры культивирования мезенхимальных клеток из пуповины человека. Описаны эффекты обогащенной тромбоцитами плазмы и синтетических ингибиторов протеинкиназ на культуру мезенхимальных клеток. Показано, что обогащенная тромбоцитами плазма может заменить эмбриональную телячью сыворотку, а эффекты синтетических ингибиторов протеинкиназ на культуру клеток зависят от их химической структуры и концентрации и от периода роста культуры.

Ключевые слова: пуповина, культура клеток, мезенхимальные клетки, обогащенная тромбоцитами плазма, ингибиторы протеинкиназы.

O. Maslova, PhD stud., G. Ostrovska, Prof.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv

MODIFIED CULTURE CONDITIONS AS AN INFLUENCE ON MORPHOFUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF HUMAN UMBILICAL CORD MESENCHYMAL CELLS

Research is devoted to standardization of procedure of culturing mesenchymal cells from human umbilical cords. The effects of platelet-rich plasma and synthetic protein kinase inhibitors on the culture of mesenchymal cells are described. It is shown that platelet-rich plasma may be a substitute for fetal calf serum and that effects of synthetic protein kinase inhibitors on cell culture depend on their chemical structure and concentration and on the period of culture growth.

Key words: umbilical cord, cell culture, mesenchymal cells, platelet rich plasma, protein kinase inhibitors.

УДК 581.557:579.22

Ю. Кондратюк, канд. біол. наук, П. Маменко, канд. біол. наук, С. Коць, д-р біол. наук
Інститут фізіології рослин і генетики НАН України, Київ

ВПЛИВ РІЗНИХ ДОЗ МІНЕРАЛЬНОГО АЗОТУ НА ЗАГАЛЬНИЙ ВМІСТ БІЛКА КОРЕНІВ ТА БУЛЬБОЧОК СОЇ, ІНОКУЛЬОВАНОЇ ШТАМАМИ *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* ІЗ КОНТРАСНИМИ СИМБІОТИЧНИМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ

Дослідити динаміку змін загального вмісту білка коренів та бульбочок сої за інокуляції контрастними за симбіотичними характеристиками штамми *Bradyrhizobium japonicum* в умовах різного забезпечення мінеральним азотом. Насіння сої інокулювали активним та неактивним штамми ризобій. Рослини вирощували в умовах вегетаційного досліду. Для одержання білкових екстрактів корені та бульбочки відбирали у фази бутонізації, початку цвітіння та масового цвітіння рослин. Кількісний вміст сумарного білка в зразках визначали за методом Бредфорда. Показано відмінності у кількісному вмісті загального білка в коренях і бульбочках сої, інокульованої активним і неактивним штамми *B. japonicum*, залежно від фази росту рослин та дози внесення мінерального азоту. Висунуто припущення, що виявлені зміни вмісту білка пов'язані із процесами формування та функціонування бобово-ризобіального симбіозу.

Ключові слова: азотфіксація, ризобії, соя, симбіотичні системи, білки.

Вступ. Азот є одним із самих важливих органогенних елементів, якого потребують усі живі істоти для забезпечення своєї життєдіяльності [1, 2]. Проте багато різних процесів призводять до зменшення біологічної доступності азоту. Мобільність нітрогену спричиняє його вилучення з екосистем гідрологічними або атмосферними шляхами (вилузування, денітрифікація, ін.) [3]. Відносний дефіцит зв'язаного азоту на поверхні Землі при практично невичерпному його запасі в атмосфері передбачає наявність певного етапу, що лімітує швидкість кругообігу даного елемента. Промисловий синтез аміаку з азоту і водню становить не більше 5 % фіксованого азоту нашої планети [4, 5, 6].

Альтернативним джерелом зв'язаного азоту є мінеральні добрива. Проте високі ціни на енергоносії для виробництва мінеральних азотних добрив перешкоджають їх широкому застосуванню у рослинництві. А у зв'язку із нинішньої глобальної фінансовою кризою це є мотивацією до пошуку інших способів забезпечення важливих сільськогосподарських культур необхідними кількостями цього елемента.

З іншого боку відомо, що нітрати можуть накопичуватися в ґрунті і забруднювати навколишнє середовище. Крім цього збільшення концентрації нітратів у продуктивних частинах рослин має токсичний вплив на людей і тварин: у живих організмах вони перетворюються в нітрити, спричиняючи отруєння, розвиток раку та інших захворювань [7].

Одним із можливих шляхів одержання азоту є його біологічна фіксація з повітря мікроорганізмами, що здатні зв'язувати молекулярний азот атмосфери і перетворювати його в сполуки, доступні рослинам [8].

Соя є одним з основних джерел жирних кислот і білків для харчування людини і тварин. Вона також широко використовується у непродовольчих цілях, наприклад, у виробництві промислової сировини, палива, ін. [9, 10]. Після кукурудзи, пшениці та рису соя займає четверте місце в світі за обсягами виробництва зерна і одне з перших за точки зору біологічної фіксації азоту [11]. Вона здатна фіксувати 155–198 кг/га азоту в рік, забезпечувати свої потреби в азоті на 65–80 %, а значну частину своїх резервів залишати у ґрунті. Тобто кращих культур для сівозміни [12, 13].

може бути джерелом екологічно чистої продукції: біологічна особливість фіксувати значні кількості атмосферного азоту у симбіозі з бульбочковими бактеріями дозволяє вирощувати її без застосування мінеральних добрив або при їх дуже мінімальних кількостях [14].

Проте між кількістю наявного в ґрунті біологічно доступного нітрогену та інтенсивністю процесу симбіотичної азотфіксації є пряма залежність [15, 16]. Відомо, що азотні сполуки впливають на бобово-ризобіальні комплекси на всіх етапах формування і функціонування симбіозу, починаючи з утворення ризосфери і бульбочок та закінчуючи процесом активної азотфіксації [9]. У той же час встановлено, що високі дози азоту можуть пригнічувати азотфіксацію [17, 18]. Однак на фоні оптимальних доз азотних добрив для деяких культур азотфіксація на 30–45 % була вищою, ніж без них. Відповідно при раціональному поєднанні застосування мінерального та симбіотрофного азоту зростає і загальний вміст білка в надземній біомасі та насінні [19]. Саме тому в даний час велика увага приділяється питанню оптимізації співвідношення мінерального і біологічного азоту для створення ефективного бобово-ризобіального симбіозу, для чого у першу чергу потрібно мати глибокі знання про перебіг біосинтетичних процесів у симбіотичних системах.

Незважаючи на значні досягнення у вивченні проблеми симбіотичної азотфіксації, питання про механізми її регуляції при застосуванні різних доз мінеральних азотних добрив, що вносяться у ґрунт, залишається відкритим. Тому результати досліджень контрастних модельних систем на основі рослин сої та штамів *Bradyrhizobium japonicum* різної ефективності можуть наблизити нас до розуміння фізіологічних, біохімічних та молекулярних аспектів функціонування бобово-ризобіального симбіозу, а також можуть стати потенційним підґрунтям для корекції існуючих чи створення нових біотехнологічних прийомів підвищення врожайності важливих сільськогосподарських культур взагалі і сої зокрема.

Існує велика кількість даних про зміни вмісту білка у тих частинах рослин сої, які використовуються у сільсь-

© Кондратюк Ю., Маменко П., Коць С., 2014

різноманітних стресових чинників (посуха, засолення, забруднення важкими металами, ін.) [20], проте дослідження цього показника в органах, що безпосередньо залучаються до процесу фіксації молекулярного азоту (корені та бульбочки) і, тим самим, впливають на загальні біосинтетичні процеси, не є численними.

Тому метою нашої роботи було вивчення змін загального вмісту білка коренів і бульбочок сої сорту Васильківська, інокульованої контрастними за симбіотичними властивостями штамми *Bradyrhizobium ja-ponicum*, на різних фонах азотного живлення.

Матеріали і методи.

Вегетаційний досвід

Експерименти проводилися за природного освітлення та температури. Рослини сої (*Glycine max* (L.) Merr.) сорту Васильківська вирощували в пластикових посудинах, що містили 13,5 кг промитого річкового піску. Для виявлення впливу симбіотичних властивостей мікроорганізмів на загальний вміст білка коренів та бульбочок сої, що вирощувалась за різного забезпечення мінеральним азотом, нами було використано модельні системи, створені за інокуляції рослин ризобіями з контрастними властивостями: штам *Bradyrhizobium japonicum* 646 – вірулентний високоактивний та штам 604к – високовірулентний неактивний. Перед посівом насіння стерилізували 70 %-им етанолом, промивали під проточною водою та протягом 1 год. інокулювали штамми бактерій із музейної колекції азотфіксуючих мікроорганізмів Інституту фізіології рослин і генетики НАН України. Кількість бактерій становила 10^7 клітин у 1 мл. Контролем слугували рослини без інокуляції. Джерелом мінерального живлення була суміш Гельрігеля [21], збагачена мікроелементами (молібден, бор, марганець, мідь). Кількість азоту, внесена в субстрат, складала 1 і 0,25 норми (1 норма азоту становить $708 \text{ мг Ca(NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ на 1 кг піску). Зразки рослин відбирали у фазах бутонізації, початку цвітіння та повного цвітіння рослин. Відібрані зразки коренів та бульбочок заморожували в рідкому азоті, розтирали до порошкоподібного стану і зберігали до використання.

Одержання білкових екстрактів

Зразки коренів та бульбочок (наважки по 100 мг) ресуспендували у буфері, що містив 0,175 M Тріс-HCl, 5 % SDS, 15 % гліцерину, 0,3 M DTT [22]. Білки екстрагували протягом 1 год за 4 °C та осаджували протягом 1 год за – 20 °C з чотирма об'ємами попередньо охолодженого ацетону. Осад двічі промивали попередньо охолодженим 80 %-им ацетоном. Одержані білкові осадки підсушували і розчиняли в 30 mM Тріс-HCl (pH 8,5).

Визначення кількості сумарного білка

Кількість сумарного білка в одержаних екстрактах визначали за методом Бредфорда [23], використовуючи бичачий сироватковий альбумін для побудови стандартної калібрувальної кривої.

Статистична обробка одержаних результатів

Усі дослідження було проведено у трьох повторностях. Статистичний аналіз даних проводився за допомогою пакету STATISTICA 7.0. Вірогідність різниці між контрольними та дослідними варіантами оцінювали за t-критерієм Ст'юдента ($P \leq 0,05$). На рисунках представлені усереднені значення зі стандартним відхиленням.

Результати та обговорення.

Відсутність у ґрунті доступних форм азоту на ранніх етапах розвитку бобових рослин може призводити до зниження нодуляційної та азотфіксувальної активності їх симбіотичних систем і, як наслідок, – зменшення врожайності. У цей момент коренева система рослин

розвинена ще не достатньо для активного розвитку процесів бульбочкоутворення та фіксації молекулярного азоту з метою власного забезпечення цим елементом. У більшості ґрунтів кількості доступного азоту є достатніми для первинного задоволення рослинних потреб, проте кількість необхідної стартової дози мінерального азоту великою мірою визначається симбіотичними особливостями ризобій (вірулентність, нодуляційна активність) наявних у ґрунті або тих, яким інокулюється насіння [24]. Тому застосування модельних азотфіксуючих систем на основі штамів ризобій з контрастними симбіотичними характеристиками є необхідним інструментом для вивчення різних етапів формування та функціонування рослинно-мікробного симбіозу в умовах різного азотного забезпечення, зокрема, для вивчення білків, що беруть участь у цих процесах. Попередніми дослідженнями було показано відмінності симбіотичних характеристик штамів, що використовуються у даній роботі, та їх різний вплив на ріст і розвиток рослин сої [25].

У нашому дослідженні було проведено аналіз кількісного вмісту білків у коренях і бульбочках сої та виявлено його зміни залежно від симбіотичної ефективності ризобій та кількості внесеного в субстрат мінерального азоту.

Так, нами було показано відмінності кількісного вмісту загального білка в екстрактах як коренів (Рис. 1), так і бульбочок (Рис. 2). При чому слід зазначити, що між кореневими та бульбочковими зразками була виявлена суттєва різниця у кількісному розподілі сумарного білка протягом досліджуваного періоду вегетації рослин. При порівнянні білкових препаратів коренів та бульбочок між собою слід відмітити, що в екстрактах коренів, одержаних із рослин, що вирощувались на 0,25 норми азоту за інокуляції штамми 646 та 604к, у фазу бутонізації вміст сумарного білка був у чотири та п'ять разів вищим, ніж у бульбочках, інфікованих активним та неактивним штамми відповідно. На початку цвітіння у коренях ці показники значно знижувались, тоді як в бульбочках навпаки спостерігався суттєвий приріст кількості загального білка. У фазу масового цвітіння рослин вміст білка у коренях збільшувався, а в бульбочках – знижувався. Тобто, абсолютно протилежний кількісний розподіл сумарного білка у коренях та бульбочках, може бути підтвердженням різної спрямованості біологічних процесів, що протікають в цих органах.

При аналізі динаміки змін кількісного вмісту білків препаратів коренів нами було виявлено, що в екстрактах контрольованого варіанту (без інокуляції) спостерігали поступове збільшення кількості білка протягом всього періоду дослідження незалежно від кількості внесеного у ґрунт мінерального азоту (Рис. 1). При чому, якщо на початку дослідження рослини характеризувались більш низьким білковим приростом (на 78,7 % за 1 норми азоту, на 26,2 % за 0,25 норми азоту), то у фазу масового цвітіння спостерігали суттєве збільшення цих показників (на 209,6 % за 1 норми азоту, на 111,2 % за 0,25 норми азоту). На перших етапах росту рослин де-що менші кількості сумарного білка були виявлені за наявності у ґрунті 1 норми азоту, ніж за росту на 0,25 норми. Проте ця різниця не була суттєвою, у той час як у більш пізній фазі цвітіння загальний вміст білка був значно нижчим за росту рослин на 0,25 норми азоту, що можна пояснити поступовим вичерпанням рослинами цього важливого елементу, відсутністю альтернативного джерела його надходження і, як наслідок, зниженням біосинтетичних процесів.

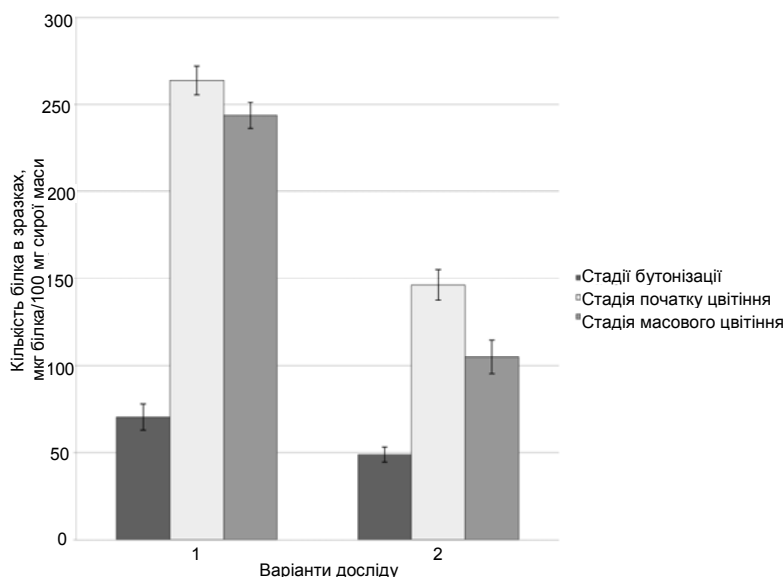


Рис. 1. Динаміка змін кількості сумарного білка в екстрактах коренів.

Варіанти дослідів: 1 – контроль; 1 норма азоту; 2 – контроль; 0,25 норми азоту; 3 – інокуляція активним штамом 646; 1 норма азоту; 4 – інокуляція активним штамом 646; 0,25 норми азоту; 5 – інокуляція неактивним штамом 604к; 1 норма азоту; 6 – інокуляція неактивним штамом 604к; 0,25 норми азоту

Всі варіанти бактеризованих рослин характеризувались дещо відмінними від контролю особливостями. Так, незалежно від активності штаму-інокулянта та кількості внесенного в ростовий субстрат мінерального азоту, спостерігали різке зниження кількості білка в екстрактах на початку цвітіння рослин відносно фази бутонізації та суттєве підвищення цього показника під час масового цвітіння сої. Можливо, таку динаміку змін кількості загального білка у коренях можна пояснити відповіддю сої на інокуляцію бактеріями, що є для рослин додатковим стресом. Відомо, що обробка насіння ризобіями хоч і є позитивним, але, все-таки, стресовим фактором, що може спричинити синтез додаткових стресових молекул, у тому числі і білків [7].

Порівнюючи між собою варіанти з інокуляцією контрастними штамами бактерій, слід відмітити, що за росту рослин на субстраті, який містив 1 норму азоту, загальна кількість білка була вищою у зразках з неактивним

штамом 604к. У той же час корені сої, вирощеної на 0,25 норми азоту, характеризувались практично однаковим вмістом білка незалежно від активності штаму бактерій. Тобто, можна припустити, що інокуляція рослин високовірулентним, але неактивним штамом 604к сприяє кращому засвоєнню коренями наявного мінерального азоту лише за повного його об'єму, необхідного для росту і розвитку рослини. Проте такий варіант культивування рослин виключає наявність альтернативного джерела азоту, так як за повного забезпечення рослин мінеральним азотом, вони не вступають у безпосередній симбіоз із ризобіями, на їх коренях не утворюються бульбочки і, відповідно, не відбувається одержання симбіотрофного азоту.

У той же час білкові екстракти бульбочок сої утворені різними азотфіксувальними мікроорганізмами мали свої особливості (Рис. 2).

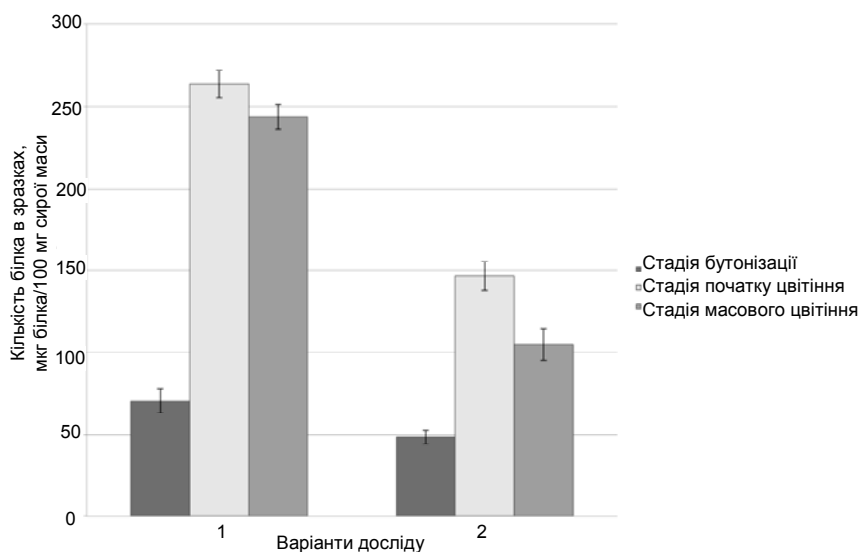


Рис. 2. Динаміка змін кількості сумарного білка в екстрактах бульбочок. Варіанти дослідів:

1 – інокуляція активним штамом 646; 0,25 норми азоту; 2 – інокуляція неактивним штамом 604к; 0,25 норми азоту

У першу чергу слід відмітити, що за інокуляції неактивним штамом 604к кількість сумарного білка в бульбочках була нижчою в середньому удвічі, ніж у варіантах, інокульованих активним штамом 646 на всіх фазах росту рослин. Проте загальна картина кількісного розподілу білків протягом всього періоду росту рослин була однаковою і за інокуляції активним, і неактивним штамми: різке збільшення кількості сумарного білка на початку цвітіння рослин, порівняно з фазою бутонізації (майже у чотири рази за інокуляції активним штамом і в три – неактивним) та зниження цього показника під час масового цвітіння сої (на 7,7 % у варіанті зі штамом 646 та на 28 % – зі штамом 604к). Імовірно, такі зміни можна пояснити посиленням біосинтетичних процесів під час формування азотфіксуючого апарату і зниженням їх інтенсивності під час активної фіксації молекулярного азоту в бульбочках. Одержані нами дані по загальній динаміці змін вмісту білка у коренях та бульбочках сої узгоджуються і з дослідженнями інших учених [26, 27]. Вони вказують на те, що процес фіксації азоту є дуже енергоємним і забирає більшу частину енергетичних ресурсів рослини. У таких умовах всі енергоємні процеси, включаючи біосинтез білка, що протікають в бактеріях повинні призупинятись на користь азотфіксації. Таким чином у бульбочках відбувається перерозподіл енергії, що забезпечує успішну фіксацію молекулярного азоту. Враховуючи ці особливості енергетичного забезпечення життєдіяльності рослинного організму, можна пояснити нерівномірність процесів білкового синтезу, деградації та фіксації азоту протягом онтогенезу рослин.

Виявити вплив дози мінерального азоту на загальний вміст білка в бульбочках нам не вдалося, так як за повного азотного забезпечення симбіотичний апарат у рослин не формувався через відсутність такої необхідності. Це зумовлює необхідність проведення додаткових досліджень, в яких будуть застосовані проміжні норми мінерального азоту.

Висновки. Таким чином, нами було показано кількісні зміни вмісту загального білка у препаратах як бульбочок, так і коренів сої за інокуляції різними за активністю штамми *V. japonicum* на фоні різного азотного забезпечення. При цьому слід зазначити, що кількісний розподіл білків у коренях та бульбочок протягом досліджуваного періоду росту рослин був оберненим, що може бути свідченням протилежної спрямованості процесів, що протікають у цих органах. У той же час очевидним є вплив на бобово-ризобіальні комплекси доз внесеного мінерального азоту: вони визначали необхідність утворення симбіотичних структур, впливали на кількість білка у коренях.

Подальші детальні дослідження динаміки змін білкового складу симбіотичних систем дозволять розширити уявлення про механізми азотного живлення бобових рослин, дадуть можливість виявити тонкі механізми регуляції взаємодії партнерів та з'ясувати роль біологічних молекул у їх функціонуванні за умов симбіозу або при мінеральному типі живлення азотом. Це, у свою чергу, дасть можливість впливати на ефективність рослинно-мікробного симбіозу, поліпшувати його продуктивність і скорочувати негативний вплив нітратного забруднення на навколишнє середовище.

Список використаних джерел

1. Коць С.Я., Моргунов В.В., Тихонович І.А., Проворов Н.А., Патыка В.Ф., Петриченко В.Ф., Мельникова Н.Н., Маменко П.Н. Биологическая фик-

сация азота: бобово-ризобийный симбиоз. – Киев: Логос, 2011. – Т. 1. – 404 с.

2. Peoples M.B., Herridge D.E., Ladha J.K. Biological nitrogen fixation: An efficient source of nitrogen for sustainable agricultural production? // Plant and Soil. – 1995. – 174. – P. 3-28.

3. Vitousek P.M., Cassman K., Cleveland C., Crews T., Field C.B., Grimm N.B., Howarth R.W., Marino R., Martinelli L., Rastetter E.B., Sprent J.I. Towards an ecological understanding of biological nitrogen fixation // Biogeochemistry. – 2002. – 57/58. – P. 1-45.

4. Robson A. D. Mineral nutrition of legumes in tropical and subtropical soils. Proceedings of a workshop held at CSIRO Cunningham Laboratory, Brisbane, Australia, January 16-21, 1978, under the auspices of the U.S./Australia Co-operative Science Program. 1978 pp. 277-29.

5. Carroll B. J., Mathews A. Molecular biology of symbiotic nitrogen fixation. 1990 pp. 159-180.

6. Grahama P.H., Vanceb C.P. Nitrogen fixation in perspective: an overview of research and extension needs // Field Crops Research. – 2000. – 65. – P. 93-106.

7. Santamaria P. Nitrate in vegetables: toxicity, content, intake and EC regulation // Journal of the Science of Food and Agriculture. – 2006. – Vol. 86. – P. 10-17.

8. Коць С.Я. Сучасний стан досліджень біологічної фіксації азоту // Физиология и биохимия культурных растений. – 2011. – Т. 43, № 3. – С. 212-225.

9. Khush G.S. Challenges for meeting the global food and nutrient needs in the new millennium // Proceedings of The Nutrition Society. – 2003. – Vol. 60. – P. 15-26.

10. Komatsu S., Ahsan N. Soybean proteomics and its application to functional analysis // Journal of proteomics. – 2009. – Vol. 72. – P. 325-336.

11. Бахмат О.М. Соя – культура майбутнього, особливості формування високого врожаю. – Кам'янець-Подільський, 2009. – 208 с.

12. Бабич А.О., Бабич-Побережна А.А. Світові та вітчизняні тенденції розміщення виробництва і використання сої для розв'язання проблеми білка // Корми і кормовиробництво. – 2012. – Т. 71. – С. 12-26.

13. Mallarino A.P., Ortis-Torres E., Pecinovsky K.T. Effects of crop rotation and nitrogen fertilization on crop production // Iowa State Research Farm Progress Reports. – 2004. – Vol. 3. – P. 4-13.

14. Singh G. Soybean: botany, production and uses. – CAB International, 2010. – 494 pp.

15. Voisin A.-S., Salon C., Munier-Jolain N.G., Ney B. Quantitative effects of soil nitrate, growth potential and phenology on symbiotic nitrogen fixation of pea (*Pisum sativum* L.) // Plant and Soil. – 2002. – 243. – P. 31-42.

16. Юргина В.С. Роль мінерального азоту і асоціативних ризобактерій в формуванні продуктивності редьки масличної // Агро XXI. – 2010. – 4-6. – С. 20-21.

17. Петриченко В.Ф. Виробництво та використання сої в Україні // Вісник аграрної науки. – 2008. – № 6. – С. 24-27.

18. Коць С.Я., Маліченко С.М., Кругова О.Д., Мандровська Н.М., Кириченко О. В. Физиолого-біохімічні особливості живлення рослин біологічним азотом. – Київ: Логос, 2001. – 271 с.

19. Serraj R., Adu-Gyamfi J. Role of symbiotic nitrogen fixation in the improvement of legume productivity under stressed environments // West African Journal of Applied Ecology – 2004. – 6. – P. 95-109.

20. Manavalan L.P., Guttikonda S.K., Tran L.-S.P., Nguyen H.T. Physiological and molecular approaches to improve drought resistance in soybean // Plant and Cell Physiology. – 2009. – Vol. 50 № 7. – P. 1260-1276.

21. Гродзинский А.М., Гродзинский Д.М. Краткий справочник по физиологии растений. – К.: Наукова думка, 1973. – 591с.

22. Кондратюк Ю.Ю., Маменко П.М., Левішко А.С., Дрозденко Г.М., Коць С.Я. Порівняльний аналіз методів екстракції та розділення білків для протеомного дослідження білкових профілів коренів та бульбочок сої // Физиология и биохимия культурных растений. – 2013. – Т. 45, № 3. – С. 222-229.

23. Bradford M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Analytical Biochemistry. – 1976. – Vol. 72. – P. 248-254.

24. Kessel C., Hartley C. Agricultural management of grain legumes: has it led to an increase in nitrogen fixation? // Field Crops Research. – 2000. – Vol. 65. – P. 165-181.

25. Дрозденко Г.М., Маменко П.М., Маліченко С.М., Коць С.Я. Особливості білкового складу штамів і Tn5-мутантів *V. japonicum* різної активності // Физиология и биохимия культурных растений. – 2009. – Т. 41, № 5. – С. 423-429.

26. Маменко П.М., Коць С.Я., Дрозденко Г.М., Жемойда А.В. Білковий склад бульбочок сої, інокульованої штамми та Tn5-мутантами *Bradyrhizobium japonicum* різної ефективності // Физиология и биохимия культурных растений. – 2008. – Т. 40, № 6. – С. 525-531.

27. Karr D.B., Emerich D.W. Protein synthesis by *Bradyrhizobium japonicum* bacteroids declines as function of nodule age // Applied Environmental Microbiology. – 1996. – Vol. 62, №10. – P. 3757-3761.

Надійшла до редколегії 04.12.13

Ю. Кондратюк, канд. биол. наук, П. Маменко, канд. биол. наук, С. Коць, д-р биол. наук
Институт физиологии растений и генетики НАН Украины, Киев

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ДОЗ МИНЕРАЛЬНОГО АЗОТА НА ОБЩЕЕ СОДЕРЖАНИЕ БЕЛКА И КЛУБЕНЬКОВ СОИ, ИНОКУЛИРОВАННОЙ ШТАММАМИ *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* С КОНТРАСТНЫМИ СИМБИОТИЧЕСКИМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ

Исследовать динамику изменений общего содержания белка корней и клубеньков сои, инокулированной контрастными по симбиотическим характеристикам штаммами *Bradyrhizobium japonicum*, и в условиях различного содержания минерального азота. Семена сои инокулировали активным и неактивным штаммами ризобий. Растения выращивали в условиях вегетационного опыта. Для получения белковых экстрактов корни и клубеньки отбирали в фазы бутонизации, начала цветения и массового цветения растений. Количественное содержание суммарного белка в образцах определяли методом Брэдфорда. Показано различия в количественном содержании белка в корнях и клубеньках сои, инокулированной активным и неактивным штаммами *B. japonicum*, в зависимости от фазы роста растений и дозы внесенного минерального азота. Выдвинуто предположение, что обнаруженные изменения содержания белка связаны с процессами формирования и функционирования бобово-ризобиального симбиоза.

Ключевые слова: азотфиксация, ризобии, соя, симбиотические системы, белки.

Iu. Kondratiuk, PhD., P. Mamenko, PhD., S. Kots, DSc
Institute of Plant Physiology and Genetics of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

THE INFLUENCE OF DIFFERENT DOSES OF MINERAL NITRIGEN ON TOTAL PROTEIN CONTENT OF ROOTS AND NODULES OF SOYBEAN, INOCULATED BY STRAINS OF *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* WITH CONTRASTING SYMBIOTIC FEATURES

To investigate the dynamics of changes in total protein content of soybeans roots and nodules under inoculation by *Bradyrhizobium japonicum* strains with contrasting symbiotic characteristics and under different providing of mineral nitrogen. Seeds were inoculated by active and inactive strains of rhizobia. Soybean plants were grown under conditions of vegetation experiment. To obtain protein extracts roots and nodules were collected at the stages of budding, beginning flowering and full flowering of plants. The total protein content in the samples was determined by the method of Bradford. It was shown the changes of total protein content in the soybean roots and nodules, depending on inoculation of strains of *B. japonicum*, the phase of plant growth and the amount of mineral nitrogen.

Key words: nitrogen fixation, rhizobia, soybean, symbiotic systems, proteins.

УДК 581.93+502.75 (477.46)

В. Конограй, канд. біол. наук
Черкаський національний університет імені Б. Хмельницького, Черкаси

СИНТАКСОМІЯ РОСЛИННОСТІ КЛАСУ *LEMNETEA* КРЕМЕНЧУЦЬКОГО ВОДОСХОВИЩА

Проведені дослідження рослинності класу *Lemnetea*, яка на території Кременчуцького водосховища представлена 5 асоціаціями. Розроблена синтаксономічна схема за флористичною системою Браун-Бланке, проведений ценотичний аналіз та особливості поширення діагностованих угруповань.

Ключові слова: Кременчуцьке водосховище, синтаксономія, водна рослинність.

Вступ. Рослинність класу *Lemnetea* об'єднує угруповання вільноплаваючих на поверхні й у товщі води не укорінених рослин. Характерною особливістю класу є низьковидове насичення та поширення ценозів у слабопотокових водоймах з мулистопіщаними ґрунтами. На території водосховища угруповання класу поширені у верхній і середній частинах, у нижній зустрічаються значно рідше. Особливістю синтаксонів є переважання монодомінантних ценозів. Угруповання відіграють важливу екологічну функцію в екосистемах водосховища. Їм, зокрема, належить основна роль у формуванні рослинного покриву новостворених мілководних ділянок.

З огляду на важливу ресурсну, формуючу, біотопічну, екологічну та водоохоронну роль угруповань класу *Lemnetea*, дослідження його рослинності, зокрема синтаксономії є актуальним.

Матеріали та методи. Дослідження проводилися протягом 2005-2011 рр. маршрутным методом з використанням еколого-флористичних критеріїв опису рослинних угруповань. На основі 75 геоботанічних описів водної рослинності, складена її класифікаційна схема. Матеріали обробляли за методом перетворення фітоценотичних таблиць за допомогою програми FICEN2 [8].

Результати та обговорення. Рослинність класу *Lemnetea* в Україні є досить вивченою, але робіт проведених на водосховищах в цьому напрямку мало. Основні дослідження з синтаксономії угруповань, що відносяться до класу, після створення водосховищ та формування їх рослинного покриву, вивчалися І.Л. Кореляковою [7], Б.А. Барановським [1], Л.М. Зуб [6], Н.П. Гальченко [2,3]. З названих авторів лише Л.М. Зуб проводила досліджен-

ня рослинності Кременчуцького водосховища з використанням еколого-флористичних принципів, але нею не охоплено всього ценотичного різноманіття класу Кременчуцького водосховища [6]. Кременчуцьке водосховище було заповнене у 1961 р. Площа його території становить 2252 км², воно є найбільшим у Дніпровському каскаді. На основі морфологічних, морфометричних та гідрологічних характеристик І.Л. Кореляковою його територія була розділена на три частини [7]. Верхня частина відзначається переважанням мілководних ділянок до 70% та значними площами островних територій. Середня – відрізняється від попередньої, меншими за площами мілководдями та поступається за кількістю островів. Нижня частина характеризується, ще меншими площами мілководних ділянок та наявністю 5 островів, площа яких складає всього близько 900 га.

Синтаксономічна схема рослинності класу *Lemnetea*

Клас *Lemnetea minoris* R. Tx. 1955

Порядок *Lemnetalia* R. Tx. 1955

Союз *Lemnion minoris* R. Tx. 1955

1. *Lemnetum minoris* (Oberd. 1957) Th. Müller et Görs 1960

2. *Salvinio-Spirodeletum polyrrhizae* Slavnić 1956

3. *Spirodeletum polyrrhizae* W. Koch 1954

Союз *Lemnion trisulcae* Den Hartog et Segal 1964

4. *Lemnetum trisulcae* Soó 1927

Союз *Hydrocharition morsus-ranae* Rübel 1933

5. *Hydrocharito-Stratiotetum aloides* (Van Langend. 1935) Westhoff (1942) 1946

© Конограй В., 2014

Синхорологія: характерна для геокомплексів захищених приострівних, позаострівних і водойм островів, затоплених гирлових ділянок річок. У верхній частині водосховища зустрічається часто, середній – звичайно, нижній – дуже рідко.

Проективне покриття, %	75	85	80	70	85	70	80	85	90
Товща води (см)	80	100	90	120	100	120	90	100	100
Кількість видів	7	9	8	7	10	7	8	9	10
Номер опису	1	2	3	4	5	6	7	8	9
D.s. Ass. Lemnetum minoris									
<i>Lemna minor</i>	2	5	4	5	5	5	4	5	5
D.s. Cl. Lemnetea									
<i>Salvinia natans</i>		1	2		1		2	1	
<i>Hydrocharis morsus-ranae</i>	1	1	2		1		2	1	
<i>Stratiotes aloides</i>			1				1		1
<i>Spirodela polyrrhiza</i>	1								2
D.s. Cl. Phragmito-Magno-Caricetea									
<i>Phragmites australis</i>			+	1	1	1	+		2
<i>Typha angustifolia</i>	+	1			1			1	1
<i>Butomus umbellatus</i>			1	1		1	1		
<i>Sagittaria sagittifolia</i>	2		1	1		1	1		
<i>Glyceria maxima</i>		+			+			+	1
<i>Alisma plantago-aquatica</i>			+				+		+
D.s. Cl. Potametea									
<i>Nymphaea alba</i>	1		1				1		1
<i>Potamogeton lucens</i>		1		1	1	1		1	
<i>Trapa natans</i>		1		+	1	+		1	
<i>Nuphar lutea</i>		1			1			1	1
Інші види:									
<i>Sparganium erectum</i>			1	1		1	1		

Види, що зустрічаються зрідка: *Oenanthe aquatica* (5:+,7:1); *Sium latifolium* (2:+).

Місцезнаходження: 1 – Черкаська обл. Золотоніський р-н, с. Кедина Гора (26.07.06); 2 – Черкаська обл. Черкаський р-н, с. Дахнівка (02.08.06); 3 – Черкаська обл. Золотоніський р-н, с. Сушки (21.08.08); 4 – Черкаська обл. Черкаський р-н, с. Чапаївка (26.07.07); 5 – Черкаська обл. Черкаський р-н, с. Свідівка (16.07.06); 6 – Черкаська обл. Чорнобаївський район с. Велика Бурімка (06.08.06); 7 – Черкаська обл. Золотоніський р-н, с. Сушки (21.08.08); 8 – Черкаська обл. Черкаський р-н, с. Сагунівка (28.05.05); 9 – Полтавська обл. Семенівський р-н, с. Погребняки (13.06.08).

Асоціація *Salvinio-Spirodeletum polyrrhizae* Slavnić 1956

Діагностичні види: *Spirodella polyrrhiza*, *Salvinia natans*

Ценотична характеристика. Загальне проективне покриття коливається від 65 до 95%, діагностичних видів *Spirodella polyrrhiza* – 15-40%, *Salvinia natans* – 25-55% (таблиця. 2), проективне покриття останнього виду на території водосховища і більшим, ніж для РЛП "Кременчуцькі плавні" [2, 3]. Загальний флористичний склад

асоціацій налічує до 18 видів. Чисельність та постійність видів класу ***Phragmito-Magno-Caricetea*** є високою. Вид *Salvinia natans* занесений до "Червоної книги України", синтаксони – до "Зеленої книги України". Асоціація занесена до "Червоного списку угруповань водних макрофітів України" з категорією 3 (угруповання що знаходяться під загрозою зникнення). В еколого-ценотичних поясах розміщується частіше між угрупованнями союзів ***Glycerio-Sparganion*** і ***Parvopotamion***.

Синекологія: зустрічаються на мілководдях з товщею води до 90 см, з мулисто-піщаними донними відкладами. Витримують протягом вегетаційного періоду незначне поверхнєве коливання рівня води. Часто зустрічаються в притінених заростях водних макрофітів, що пояснюється приуроченістю *Salvinia natans* до затінених місцезростань.

Синхорологія: характерна для мілководь геоконплексів приострівних, позаострівних, водойм островів, міжострівних водотоків, затоплених гирлових ділянок річок. У верхній частині водосховища зустрічається часто, середній – спорадично, нижній – дуже рідко.

Таблиця 2. Фітоценотична характеристика асоціації *Salvinio-Spirodeletum polyrrhizae*

Проективне покриття, %	75	65	75	95	70	65	75	80	95	70	95
Товща води (см)	60	50	60	80	90	50	60	70	80	90	80
Кількість видів	9	9	8	10	9	8	9	8	10	9	10
Номер опису	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11

D.s. Ass. *Salvinio-Spirodeletum polyrrhizae*

Salvinia natans

Spirodella polyrrhiza

D.s. Cl. *Lemnetea*

Hydrocharis morsus-ranae

Lemna minor

Stratiotes aloides

D.s. Cl. *Phragmito-Magno-Caricetea*

Phragmites australis

Typha angustifolia

Butomus umbellatus

Sagittaria sagittifolia

Glyceria maxima

Alisma plantago-aquatica

D.s. Cl. *Potametea*

Nymphaea alba

Potamogeton lucens

Trapa natans

Nuphar lutea

Інші види:

Sparganium erectum

5	3	5	4	3	3	5	5	4	3	4
4	3	4	2	2	3	4	3	2	2	2

1	2		2		1		2			
1	1	1	+		1		+		+	
	1				1					

	1		1		1		2	1		1
	1		2	2	1			2	2	2
1	1	1		1		1			1	
				1					1	
			1				1		1	
	1		1		1			1		1
1		1	1			1	1	1		1
+		+		+		+	+		+	
1		1	+	+		1		+	+	+
	2		2		2		1	2		2
1							1			

Види, що зустрічаються зрідка: *Bolboschoenus maritimus* (3:+,9:1); *Najas marina* (2:+,4:+).

Місцезнаходження: 1 – Черкаська обл. Черкаський р-н, с. Дахнівка (26.07.07); 2 – Черкаська обл. Черкаський р-н, с. Лозівка (25.07.05); 3 – Полтавська обл. Семенівський р-н, с. Мирне (13.08.09); 4 – Полтавська обл. Глобинський р-н, с. Святилівка (16.07.06); 5 – Черкаська обл. Золотоніський р-н, с. Бубнівська Слобідка (08.06.07); 6 – Полтавська обл. Семенівський р-н, с. Погребняки (05.07.09); 7 – Черкаська обл. Чорнобаївський р-н, с. Ляшівка (06.08.06); 8 – Полтавська обл. Семенівський р-н, с. Погребняки (15.07.07); 9 – Черкаська обл. Черкаський р-н, с. Дахнівка (02.08.06); 10 – Полтавська обл. Глобинський р-н, с. Шушвалівка (23.07.06); 11 – Полтавська обл. Глобинський р-н, с. Шушвалівка (23.07.06).

Асоціація *Spirodeletum polyrrhizae* W. Koch 1954

Діагностичні види: *Spirodella polyrrhiza*.

Ценотична характеристика. Загальне проективне покриття становить 60-80%, діагностичного виду *Spirodella polyrrhiza* – 15-40% (таблиця. 3). Загальний

флористичний склад налічує до 13 видів. Серед них зустрічаються численні види класів ***Potametea*** (*Potamogeton lucens*, *Nymphaea alba* L.) та ***Phragmito-Magno-Caricetea*** (*Alisma plantago-aquatica* L., *Sagittaria sagittifolia*, *Butomus umbellatus*). Перші два види відзначаються високим ступенем постійності. В еколого-ценотичних рядах угруповання розміщуються між ценозами ***Glycerio-Sparganion*** або ***Phragmiton*** і ***Magnopotamion***.

Синекологія: зустрічається на мілководних ділянках з товщею води до 60 см, мулисто-піщаними донними відкладами та значною евтрофікацією води, з незначним коливанням рівня води протягом вегетаційного періоду. Зниження рівня води до 20 см стимулює розвиток угруповань.

Синхорологія: приурочена до геоконплексів приострівних, позаострівних, водойм островів. У верхній частині водосховища зустрічається часто, середній – спорадично, нижній – дуже рідко.

Таблиця 3. Фітоценотична характеристика асоціації *Spirodeletum polyrrhizae*

Проективне покриття, %	75	60	80	70	80	75	60	80	75
Товща води (см)	40	50	50	60	50	40	50	50	60
Кількість видів	7	7	10	6	9	8	6	9	10
Номер опису	1	2	3	4	5	6	7	8	9
D.s. Ass. Spirodeletum polyrrhizae									
<i>Spirodela polyrrhiza</i>	2	3	4	2	4	2	3	4	3
D.s. Cl. Lemnetea									
<i>Lemna minor</i>	1	1				1	1		
<i>Salvinia natans</i>		+	1		1		+	1	1
<i>Hydrocharis morsus-ranae</i>	1		2		2	1		2	
D.s. Cl. Phragmito-Magno-Caricetea									
<i>Phragmites australis</i>	1	+	1	+	1	1	+	1	1
<i>Typha angustifolia</i>		2	1	1	1		2	1	2
<i>Butomus umbellatus</i>		2	1	1	1		2	1	1
<i>Sagittaria sagittifolia</i>			1		1	1		1	1
<i>Glyceria maxima</i>	1	1	1			1	1		+
<i>Alisma plantago-aquatica</i>									+
D.s. Cl. Potametea									
<i>Nymphaea alba</i>	1		1	1	1	1		1	1
<i>Potamogeton lucens</i>		+					+		
<i>Nuphar lutea</i>									1
Інші види:									
<i>Sparganium erectum</i>		1		1					

Види, що зустрічаються зрідка: *Najas marina* (6:+,4:1).

Місцезнаходження: 1 – Черкаська обл. Черкаський р-н, с. Свідівки (02.08.06); 2 – Черкаська обл. Черкаський р-н, с. Худяки (28.05.09); 3 – Черкаська обл. Золотоніський р-н, с. Домантово (21.08.08); 4 – Черкаська обл. Золотоніський р-н, с. Кедина Гора (26.07.06); 5 – Черкаська обл. Чорнобаївський р-н, с. Велика Бурімка (23.07.06); 6 – Черкаська обл. Золотоніський р-н с. Сушки (21.08.08.); 7 – Черкаська обл. Черкаський р-н с. Худяки (28.05.07.); 8 – Черкаська обл. Канівський р-н с. Келеберда (08.06.09.); 9 – Черкаська обл. Золотоніський р-н с. Кедина Гора (06.07.07.).

Союз **Lemnion trisulcae** об'єднує угруповання мезотрофних і евтрофних, затінених та відкритих водойм з мулистими донними відкладами. Діагностичними видами є *Lemna trisulca*. На території водосховища представлений однією асоціацією **Lemnetum trisulcae**.

Асоціація Lemnetum trisulcae Соф 1927

Діагностичні види: *Lemna trisulca*

Ценотична характеристика. Загальне проективне покриття становить 55-65%, діагностичного виду *Lemna trisulca* – 15-40% (таблиця. 4). Загальний флористичний склад налічує до 11 видів. Високим ступенем постійнос-

ті в угрупованнях відмічаються види класу **Lemnetea** (*Salvinia natans*, *Spirodella polyrrhiza*). Види інших класів мають меншу представленість та характеризуються невисоким проективним покриттям. В еколого-ценотичних рядах асоціації найчастіше розміщуються між угрупованнями союзів **Oenanthion aquaticae** і **Hydrocharition morsus-ranae**.

Синекологія: поширена на затінених водоймах з мулистопіщаними донними відкладами та високим вмістом органічних речовин, товщею води 50-90 см та відсутнім поверхневим коливанням води. Зниження рівня води до 10 см стимулює розвиток угруповань.

Синхорологія: характерна для геокомплексів приострівних, водойм островів, затоплених гирлових ділянок річок. У верхній частині водосховища зустрічається спорадично, середній – дуже рідко, нижній – відсутня.

Союз **Hydrocharition morsus-ranae** об'єднує ценози прісноводних евтрофних та мезоевтрофних слабопроточних водойм з мулистими донними відкладами та невисоким ступенем мінералізації води. Діагностичними видами союзу є *Hydrocharis morsus-ranae*, *Ceratophyllum demersum* L., *Stratiotes aloides* L. На території водосховища союз представлений однією асоціацією **Hydrocharito-Stratiotetum aloides**.

Таблиця 4. Фітоценотична характеристика асоціації *Lemnetum trisulcae*

Проективне покриття, %	60	55	60	65	65
Товща води (см)	60	50	80	90	70
Кількість видів	5	6	7	8	9
Номер опису	1	2	3	4	5
D.s. Ass. Lemnetum trisulcae					
<i>Lemna trisulca</i>	2	4	2	4	3
D.s. Cl. Lemnetea					
<i>Salvinia natans</i>		1	1		1
<i>Spirodela polyrrhiza</i>	1		1	1	1
D.s. Cl. Phragmito-Magno-Caricetea					
<i>Phragmites australis</i>	1	1	2		1
<i>Typha angustifolia</i>	2	2	2	1	
<i>Butomus umbellatus</i>			+		1
<i>Sagittaria sagittifolia</i>					1
<i>Alisma plantago-aquatica</i>	+				
D.s. Cl. Potametea					
<i>Nymphaea alba</i>		1			
<i>Potamogeton lucens</i>				+	+
Інші види:					
<i>Sparganium erectum</i>			1	1	1
<i>Rumex hydrolapathum</i>	1			1	

Види, що зустрічаються зрідка: *Najas marina* (2+;4:1).

Місцезнаходження: 1 – Полтавська обл. Семенівський р-н, с. Погребняки (05.07.09); 2 – Черкаська обл. Чорнобаївський р-н, с. Лящівка (06.08.06); 3 – Полтавська обл. Семенівський р-н, с. Погребняки (15.07.07); 4 – Черкаська обл. Черкаський р-н, с. Дахнівка (02.08.06); 5 – Полтавська обл. Глобинський р-н, с. Шушвалівка (23.07.06).

Асоціація *Hydrocharito-Stratiotetum aloides* (Van Langend. 1935) Westhoff (1942) 1946

Діагностичні види: *Hydrocharis morsus-ranae*, *Stratiotes aloides*

Ценотична характеристика. Загальне проективне покриття становить 70-90%, діагностичних видів *Hydrocharis morsus-ranae* – 15-25%, *Stratiotes aloides* – 5-40% (таблиця. 5). Загальний флористичний склад налічує до 17 видів. Проективне покриття першого виду

на території водосховища, є дещо меншим ніж для РЛП "Кременчуцькі плавні" [2, 3]. Найбільшу представленість мають види класу **Lemnetea** (*Lemna minor*, *Spirodela polyrrhiza*), а також **Potametea** (*Potamogeton lucens*, *Nuphar lutea* L.). 3 представників класу **Phragmito-Magno-Caricetea** (*Sagittaria sagittifolia*, *Butomus umbellatus*, *Glyceria maxima*). В еколого-ценотичних рядах угруповання розміщуються між ценозами **Phragmition communis** і **Magnopotamion**.

Синекологія: на ділянках з товщею води 50-80 см, мулистопіщаними донними відкладами багатими на органічні сполуки, та незначним коливанням рівня води протягом вегетації. Зниження рівня води до 20 см стимулює розвиток угруповань.

Синхорологія: поширена на геокомплексах приострівних, водоймах островів, затоплених гірлових ділянок річок. У верхній частині водосховища зустрічається спорадично, середній – дуже рідко, нижній – відсутня.

Таблиця 5. Фітоценотична характеристика асоціації *Hydrocharito-Stratiotetum aloides*

Проективне покриття, %	75	70	80	90	80	75	70	80	90
Товща води (см)	80	70	60	60	60	80	70	50	60
Кількість видів	8	8	9	11	9	8	8	9	11
Номер опису	1	2	3	4	5	6	7	8	9
D.s. Ass. <i>Hydrocharito-Stratiotetum aloides</i>									
<i>Hydrocharis morsus-ranae</i>	3	2	2	2	2	3	2	3	2
<i>Stratiotes aloides</i>	2	4	4	1	4	2	4	2	1
D.s. Cl. <i>Lemnetea</i>									
<i>Lemna minor</i>	1		+		+	1			
<i>Salvinia natans</i>				+					+
<i>Spirodela polyrrhiza</i>			1	2	1				2
D.s. Cl. <i>Phragmito-Magno-Caricetea</i>									
<i>Phragmites australis</i>	2	1	1	2	1	2	1	1	2
<i>Typha angustifolia</i>				2				2	2
<i>Butomus umbellatus</i>	+	1	1		1	+	1	1	
<i>Sagittaria sagittifolia</i>		1	1	1	1		1		1
<i>Glyceria maxima</i>				1				1	1
<i>Alisma plantago-aquatica</i>				+				+	+
D.s. Cl. <i>Potametea</i>									
<i>Nymphaea alba</i>	1	1		1		1	1		1
<i>Potamogeton lucens</i>	+		1		1	+			
<i>Trapa natans</i>	1					1		1	
<i>Nuphar lutea</i>	1	1		1		1	1		1
Інші види:									
<i>Sparganium erectum</i>			1				1		
<i>Rumex hydrolapathum</i>	+		1		1	+			

Види, що зустрічаються зрідка: *Bolboschoenus maritimus* (3+;9:1); *Najas marina* (2+;4:1); *Oenanthe aquatica* (5+;7:1); *Rorippa amphibia* (7:1). Місцезнаходження: 1 – Полтавська обл. Глобинський р-н, с. Шушвалівка (23.07.06); 2 – Черкаська обл. Черкаський р-н, с. Свідівка (02.08.06); 3 – Черкаська обл. Черкаський р-н, с. Худяки (28.05.09); 4 – Черкаська обл. Золотоніський р-н, с. Домантово (21.08.08); 5 – Черкаська обл. Золотоніський р-н, с. Кедина Гора (26.07.06); 6 – Черкаська обл. Чорнобаївський р-н, с. Велика Бурімка (23.07.06); 7 – Полтавська обл. Семенівський р-н, с. Мирне (13.08.09); 8 – Полтавська обл. Глобинський р-н, с. Святівка (16.07.06); 9 – Черкаська обл. Золотоніський р-н, с. Бубнівська Слобідка (08.06.07).

Отже рослинність класу **Lemnetea** на території Кременчуцького водосховища представлена 5 асоціаціями, тоді як в межах РЛП "Кременчуцькі плани", цей клас включає лише 4. Їх найбільша кількість зустрічається у верхній та середній частинах водосховища. Це зумовлено наявністю значних площ мілководних ділянок з досить не значним коливанням рівня води, які є сприятливими для поширення ценозів класу. Асоціації не відзначаються флористичним багатством середня кількість видів становить 11, а в окремих ценозах досягає 13 видів.

Висновки. Угруповання рослинності класу **Lemnetea** на території водосховища відзначаються деякими особливостями, а саме: мають меншу представленість видів підводного ярусу, ніж у відповідному ярусі класу природних місцезростань. Від угруповань РЛП "Кременчуцькі плавні", відрізняються більшим флористичним складом ценозів та меншим проективним покриттям деяких діагностичних видів. На території водосховища до флористичного складу асоціації досить часто входять рідкісні види *Trapa natans* і *Salvinia natans*, які потребують охорони. При порівнянні рослинності класу річок, встановлено відсутність асоціацій **Wolffietum arrhizae** Miyaw.et R.Tx. 1960, **Lemno-Hydrocharitetum morsus-ranae** Oberd. 1957, **Lemno-Utricularietum vulgaris** Soó (1928) 1938 на території водосховища, які не витримують гідрологічного режиму водойми, а саме коливання рівня води.

Список використаних джерел

1. Барановський Б.А. Антропогенна трансформація водної і прибережної растительности Запорожского водохранилища: Автореф. дис. канд. біол. наук. – Д., 1993.
2. Гальченко Н. П. Рослинність регіонального ландшафтного парку "Кременчуцькі плавні" // Укр. ботан. журн. – 2004. – Т.61. – № 4. – С. 48–55.
3. Гальченко Н. П. Регіональний ландшафтний парк "Кременчуцькі плавні". Рослинний світ. – К.: Фітосоціоцентр, 2006.

4. Гребенюк С. И. Высшая водная растительность Волгоградского водохранилища в районе Саратова и Энгельса. // Бюл. Ботан. сада Саратов. ун-та. Саратов. – 2004. – Вып. 3.
5. Дубина Д. В. Вища водна рослинність. Lemnetae, Potametea, Ruppietea, Zosteretea, Isoëto-Littorelletea, Phragmito-Magnocaricetea / Відп. ред. Ю. Р. Шеляг-Сосонко // Рослинність України. – К., 2006.
6. Зуб Л. М. Еколого-ценотичний аналіз і ландшафтна типізація рослинного покриву мілководь Дніпровських водоймищ: Автореф. дис. канд. біол. наук. – К., 1994.
7. Корелякова И.Л. Растительность Кременчугского водохранилища. – К., 1977.
8. Косман Е. Г. Новый компьютерный метод обработки описов растений угруповань. // Укр. ботан. журн. – 1991. – № 2. – С. 98–104.
9. Куземко А. А. Рослинність долини річки Рось: синтаксономія, антропогенна динаміка, охорона: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук. – К., 2003.
10. Лисицина Л. И. К изучению флоры Угличского водохранилища. // Биология внутренних вод. 1972. – № 16.
11. Лихачева Т. В. Предварительные результаты изучения растительного покрова Ижевского водохранилища. // Вест. уdm. ун-та. сер. Биол. – 2003. – № 9.

12. Седова О. В. Гидрофиты Волгоградского водохранилища в районе Саратова и Энгельса. // Бюл. Ботан. сада Саратов. ун-та. – Саратов, 2005. – Вып. 4.
13. Седова О. В. К изучению охраняемых растений гидрофильной флоры Волгоградского водохранилища. // Материалы Всерос. науч. конф. "Ботанические исследования в Поволжье и на Урале". – Саратов, 2006.
14. Седова О. В. Современное состояние растительности верхнего и среднего участков Волгоградского водохранилища. // Тез. докл. IX Съезд Гидробиол. о-ва РАН. – Тольятти, 2006.
15. Соломаха В. А. Синтаксономія рослинності України. Третє наближення. – Київ: Фітосоціоцентр, 2008.
16. Экзерцев В. А. Заростание мелководий Горьковского водохранилища. // Биология внутренних вод. – 1972. № 14.
17. Экзерцев В. А. Изменения в заростании и продукции водной растительности Угличского водохранилища. // Биология внутренних вод. – 1973. – № 18.
18. Экзерцев В. А. О растительности Волгоградского водохранилища. // Биология внутренних вод. – 1973. – № 17.
19. Экзерцев В. А. Растительность Иваньковского водохранилища. // Биология и продуктивность пресноводных организмов. – 1971. № 21.

Надійшла до редколегії 02.12.13

В. Конограй, канд. биол. наук

Черкасский национальный университет имени Б. Хмельницкого, Черкассы

СИНТАКСОНОМИЯ РАСТИТЕЛЬНОГО КЛАССА LEMNETEA КРЕМЕНЧУГСКОГО ВОДОХРАНИЛИЩА

Проведенные исследования растительности класса Lemnetae, которая на территории Кременчугского водохранилища представлена 5 ассоциациями. Разработанная синтаксономическая схема за флористической системой Браун-Бланке, проведен ценотический анализ и особенности распространения диагностируемых сообществ.

Ключевые слова: водохранилище, синтаксономия, водная растительность.

V. Konogray, PhD

Cherkaschiy national university named. B. Hmel'nitscogo, Cherkasi

SYNTAXONOMY VEGETATIONS CLASS LEMNETEA OF THE KREMENTHUG RESERVOIR AREA

Studies of vegetation class Lemnetae are conducted in the article, which in the Kremenchug reservoir is presented by 5 associations. Syntaxonomic scheme for floristic system Braun-Blanquet is designed, coenotic analysis and features of distribution diagnosed groups is hold.

Keywords: Kremenchug storage pool, syntaxonomy, water vegetation.

УДК 581.142

О. Смирнов, асп., О. Косик, канд. биол. наук, Н. Таран, д-р биол. наук
КНУ імені Тараса Шевченка, Київ

ВПЛИВ АЛЮМІНІЮ НА АЦИДОФІКУЮЧУ АКТИВНІСТЬ ПРОРОСТКІВ ГРЕЧКИ

Досліджено зміни ацидофікуючої активності та питомої ацидофікуючої активності кореневої системи як інтегральних показників функціонального стану Н⁺-АТФазної помпи клітин кореня проростків двох видів гречки – гречки звичайної (*Fagopyrum esculentum* Moench.) та гречки татарської (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.). Виявлено інгібуючий вплив алюмінію на виділення протонів коренями на ранніх етапах розвитку рослини. Встановлено видову специфічність реакції на основі різниці показників питомої ацидофікуючої активності.

Ключові слова: алюміній, ацидофікуюча активність, Н⁺-АТФаза, гречка звичайна, гречка татарська.

Вступ. Одним з найбільш важливих агрохімічних показників родючості ґрунту є його кислотність, рівень якої впливає на доступність та засвоєння рослинами поживних речовин, продуктивність і врожайність культури. Продуктивність сільськогосподарських рослин на кислих ґрунтах є наслідком впливу багатьох факторів, але ключовим є токсична дія рухомого алюмінію [1].

Первинною мішенню фітотоксичної дії металу є коренева система, а першим проявом впливу – інгібування росту коренів. Пригнічуються процеси росту розтягненням, а при збільшенні концентрації металу, чи часу експозиції і ріст завдяки поділу [2].

Одним із показників нормального функціонування клітини є виділення йонів Н⁺ у середовище, що стабілізує рН цитозолу й створює рушійну силу для активного надходження інших йонів. Скерований рух протонів з цитоплазми назовні клітини забезпечує поглинання мінеральних елементів рослиною, їхнє надходження до симпласту кореня – цей процес забезпечується ферментативним комплексом – Н⁺-АТФазою [3]. Існують дані про міцні кореляційні зв'язки між активністю Н⁺-АТФазної помпи плазматичної мембрани і швидкістю росту коренів [4]. Функціональний стан Н⁺-АТФазної помпи на рівні кореневої системи можна оцінювати за

здатністю коренів продукувати протони в обмін на катіони, що надходять з поживного навколокореневого середовища. На основі цього явища (підкислення середовища) розроблені методики визначення ацидофікуючої активності коренів. При цьому, механізми впливу алюмінію на роботу плазматичної Н⁺-АТФази клітин коренів на ранніх стадіях онтогенезу рослини та механізми захисту від фітотоксичної дії металу є нез'ясованими. Деякими авторами встановлена компенсаторна дія йонів калію за дії токсичних концентрацій алюмінію, [5] але існують і зовсім протилежні дані [6].

Вплив алюмінію, як і інших важких металів, на ацидофікуючу активність кореневої системи може відбуватися за рахунок модифікації трансмембранних молекулярних комплексів Н⁺-АТФаз, що знаходяться на плазматичних мембранах клітин коренів. Імовірний механізм дії важких металів на Н⁺-АТФазу активність пов'язують з прямою модифікацією молекул комплексу (адсорбція на сульфгідрильних групах) або з заміщенням йону магнію в комплексі Mg-АТФаза [5].

Тому метою роботи було дослідження впливу алюмінію на ацидофікуючу активність проростків гречки. Для порівняння впливу металу були обрані два види, що входять до однієї філогенетичної групи роду *Fagopyrum*

Mill., але відрізняються за вимогливістю до умов вирощування. Гречка звичайна (*Fagopyrum esculentum* Moench.) – промислово цінна круп'яна культура, медонос, джерело біологічно активних речовин, що широко розповсюджена в Україні та гречка татарська (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) – вирощується у високогірних районах Непалу, Китаю, Тибету, деяких країнах Європи, характеризується високим адаптивним потенціалом та загальною життєздатністю, використовується для селекційного вдосконалення гречки звичайної [7].

Матеріал та методи досліджень. В дослідженні використовували насіння двох видів гречки – гречки звичайної (*Fagopyrum esculentum* Moench.) та гречки татарської (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.). Насіння обох видів пророщували протягом двох діб при 25°C на змоченому 0.1 мМ розчином CaSO_4 фільтрувальному папері. Ацидофікуючу активність (АА) проростаючих корінців визначали за зміною рН середовища за Пухальською [6]. Кожна окрема насінина була розміщена у ємності з 1 мМ розчином KCl (рН 7.0). Через 24 години визначали ΔpH розчину. Розраховували питому ацидофікуючу активність (ПАА) кореневої системи, перераховуючи АА на довжину утвореного корінця. Вивчення впливу алюмінію на ацидофікуючу активність проводили ідентично, додаючи до 1 мМ розчину KCl 0.033 г/л

алюмінію (50 мкМ розчин). Індекс толерантності визначали за співвідношенням середньої довжини коренів рослин, які росли на розчині з металом, до середньої довжини коренів контрольних рослин [1]. Дослідження проводилися у триразовій повторності. Загальна вибірка насінин одного виду для кожної повторності дослідження складала 100. Статистичну обробку отриманих даних проводили за Ушкаренко [8].

Результати та обговорення. Реакцію двох видів гречки на присутність у навколореновому середовищі йонів алюмінію вивчали за ступенем зміни рівня рН середовища. Слід зазначити, що зміна рівня рН є опосередкованим показником поглинання, бо є відображенням багатьох фізіологічних процесів на клітинному та тканинному рівнях (активність процесів дихання, виділення у розчин органічних кислот). Незважаючи на це саме АА коренів (виділення протонів у навколореновий розчин) є відображенням змін поглинання, а всі супутні впливи є односпрямованими [6].

В ході дослідження показників АА коренів двох видів гречки було встановлено, що гречка звичайна характеризується вищою ацидофікуючою активністю, середня зміна рН розчину – 1,2. Для гречки татарської цей показник – 0,9 з іншим діапазоном величин зміни рН середовища (Рис. 1).

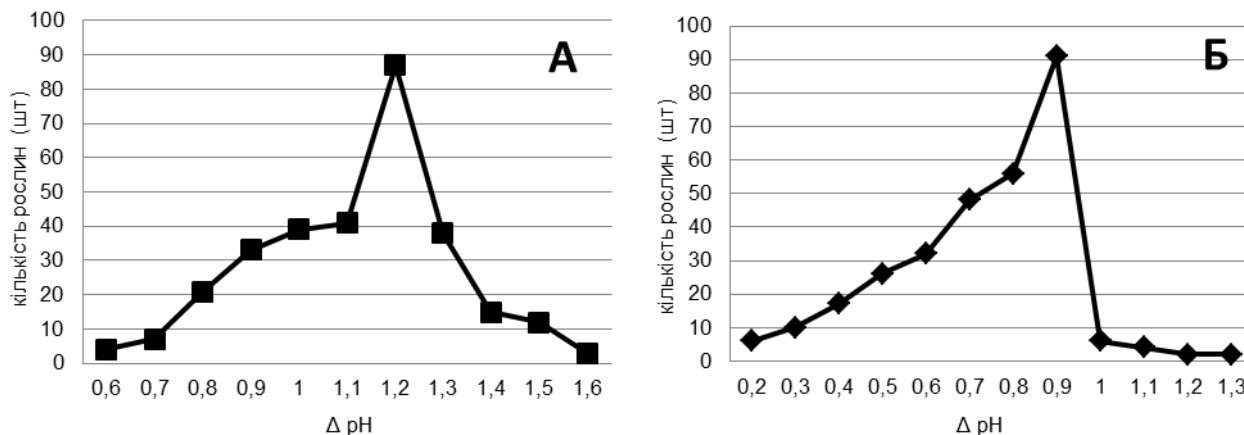


Рис. 1. Ацидофікуюча активність коренів інтактних рослин двох видів гречки: А – гречка звичайна, Б – гречка татарська

Відомо, що негативно заряджена поверхня плазматичної мембрани – перша потенційна мішень для йонів Al^{3+} [9]. Алюміній безпосередньо взаємодіє зі структурами плазматичної мембрани – мембранними каналами, блокуючи надходження йонів Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , NH_4^+ [10] та інгібує роботу H^+ -АТФазної помпи, порушуючи протон-транспортну активність клітин кореня [11]. Індуковане алюмінієм порушення протонного транспорту може значно змінити йонний статус та гомеостаз клітин кореня [12].

Найбільш вразливою частиною кореня за дії алюмінію є його верхівка – апекс. Це сайт первинної індукції усіх фітотоксичних ефектів металу в рослинному організмі [13]. Крім того існують дані про деполяризацію плазматичних мембран клітин апікальної частини коренів,

найбільш міцне зв'язування йонів Al^{3+} з елементами плазматичної мембрани клітин, що розташовані в 5-ти міліметровій зоні від верхівки кореня та вплив йонів алюмінію на протон-транспортну функцію цих клітин [14]. Тому для отримання достовірних даних про функціонування H^+ -АТФази розраховували питому ацидофікуючу активність коренів проростаючого насіння – враховували показник, що відображує активність одиниці довжини корінця без урахування різниці поглинальної діяльності різних частин кореневої системи та видову інтенсивність росту корінців.

Аналізуючи отримані дані, можна зазначити, що існує видова специфічність реакцій рослин на додавання алюмінію у середовище (Табл. 1).

Таблиця 1. Вплив алюмінію на ацидофікуючу активність та ріст коренів двох видів гречки ($\text{M} \pm \text{m}$)

Досліджуваний вид	Варіант досліджу						Індекс толерантності
	Контроль			50 мкМ алюміній			
	АА (ΔpH)	Довжина кореня (см)	ПАА (ΔpH/см)	АА (ΔpH)	Довжина кореня (см)	ПАА (ΔpH/см)	
<i>Fagopyrum esculentum</i>	1.24 ± 0.009	2.97 ± 0.018	0.41	0.80 ± 0.012	2.40 ± 0.014	0.33	0.80
<i>Fagopyrum tataricum</i>	0.93 ± 0.008	1.85 ± 0.016	0.50	0.4 ± 0.010	1.53 ± 0.021	0.26	0.82

Наприклад, при додаванні металу питома ацидофікуюча активність коренів гречки звичайної знизилася на 19,5%, гречки татарської – на 55,5%, що свідчить про інгібуючий вплив алюмінію на протонну помпу коренів обох видів. Проте, внесення алюмінію у розчин майже

не вплинуло на довжину коренів як гречки звичайної, так гречки татарської – довжина зменшилася на 17% в обох видів. Такий ефект може свідчити про комплексну дію багатьох адаптивних механізмів, що задіяні у підтриманні нормального функціонування кореневої сис-

теми рослин за дії алюмінію – депонування алюмінію у клітинній стінці та виділення сполук-хелаторів алюмінію у навколокореневий розчин. Для гречки специфічним хелатором є щавелева кислота, при виділенні якої у ризосферний простір, утворюються стійкі комплекси щавелева кислота-алюміній. Утворення таких комплексів лежить в основі "зовнішнього" механізму алюморе-зистентності [12]. Індекс толерантності, розрахований для обох видів, вказує на високий рівень толерантності до фітотоксичних ефектів алюмінію.

Висновки. Отримані результати свідчать про зміну функціонального стану H^+ -АТФазної помпи коренів у відповідь на додавання алюмінію у навколокореневий розчин. В обох досліджуваних видів відбувається інгібування протон-транспортної активності. За дії алюмінію відбувається зниження рівня питомої ацидофікуючої активності коренів у рослин гречки татарської на 55%. При цьому інгібування росту кореня як основного показника токсичності металу є незначним і сягає 20% для обох видів. На основі розрахованих індексів толерантності можна стверджувати про активацію різних компенсаторних механізмів захисту які проявляються під впливом токсиканта на стадії проростання.

Список використаних джерел

1. Hede A.R., Skovmand B., Lopez-Cesati. Acid soils and aluminum toxicity. Application of physiology in wheat breeding / Mexico, D.F.: CIMMYT, 2001. – P. 172-182.
2. Sivaguru M., Horst W.J. The distal part of the transition zone is the most aluminum-sensitive apical root zone of maize // Plant Physiol. – 1998. – 116. – P. 155-163.
3. Соколик А.И., Кабанова Н.В., Юркевич В.М., Юрин В.М. Особенности реакции корневой системы растений на тяжелые металлы //

Труды Белорусского государственного университета. Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем. – 2009. – 4(1). – С. 86-94.

4. Месенко М.М., Иванов В.Б. Влияние стимулятора и ингибиторов H^+ -АТФазы на рост клеток в корнях кукурузы // Физиология растений. – 2005. – 52(4). – С. 558-565.

5. Poukhalskaya N.V., Gurin A.I. Aluminium tolerance in spring wheat plants at different levels of potassium and temperature // Annual wheat newsletter. – 2003. – 49. – P. 106-107.

6. Пухальская Н.В., Собачкин А.А. Особенности реакции биотипов ячменя на токсичность алюминия // Докл.РАСХН. – 2007. – 4. – С. 12-14

7. Кадырова, Г. Д., Кадырова Ф. З. RAPD анализ геномного полиморфизма видов и сортов рода *Fagopyrum* // Экологическая генетика. – 2008. – 6(3). – С. 3-10.

8. Ушкаренко В. О. Дисперсійний і кореляційний аналіз у землеробстві та рослинництві / Херсон: Айлант, 2008. – 372 с.

9. Kinraide T.B., Yermiyahu U., Rytwo G. Computation of surface electrical potentials of plant cell membranes. Correspondence to published zeta potentials from diverse plant sources // Plant Physiol. – 1998. – 118. – P. 505-512.

10. Pineros M.A., Shaff J.E., Manslank H.S., Carvalho Alves V.M., Kochian L.V. Aluminum resistance in maize cannot be solely explained by root organic acid exudation. A comparative physiological study // Plant Physiol. – 2005. – 137. – P. 231-241.

11. Bose J., Babourina O., Shabala S. Rengel Z. Aluminium-induced ion transport in Arabidopsis: the relationship between Al tolerance and root ion flux // J. of Exp. Bot. – 2010. – 61. – P. 3163-3175.

12. Kochian L.V., Piceros M.A., Hoekenga O.A. The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity // Plant and Soil. – 2005. – 274. – P. 175-195.

13. Doncheva S., Amenos M., Poschenrieder C., Barcelo J. Root cell patterning: a primary target for aluminium toxicity in maize // Journal of Exp. Bot. – 2005. – 56. – P. 1213-1220.

14. Ahn Sung Ju, Sivaguru Mayandi, Osawa Hiroki, Chung Gap Chae, Matsumoto Hideaki. Aluminum Inhibits the H^+ -ATPase Activity by Permanently Altering the Plasma Membrane Surface Potentials in Squash Roots // Plant Physiol. – 2001. – 126(4). – P. 1381-1390.

Надійшла до редколегії 02.12.13

А. Смирнов, асп., О. Косык, канд. биол. наук, Н. Таран, д-р биол. наук КНУ імені Тараса Шевченка, Київ

ВЛИЯНИЕ АЛЮМИНИЯ НА АЦИДОФИЦИРУЮЩУЮ АКТИВНОСТЬ ПРОРОСТКОВ ГРЕЧИХИ

Исследованы изменения ацидофицирующей активности и удельной ацидофицирующей активности корневой системы, как интегральных показателей функционального состояния H^+ -АТФазной помпы клеток корня проростков двух видов гречихи – гречихи обыкновенной (*Fagopyrum esculentum* Moench.) и гречихи татарской (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) при действии алюминия. Выявлено ингибирующее действие алюминия на выделение протонов корнями на ранних стадиях развития растения. Установлена видовая специфичность реакции на основе разницы показателей удельной ацидофицирующей активности.

Ключевые слова: алюминий, ацидофицирующая активность, H^+ -АТФаза, гречиха обыкновенная, гречиха татарская.

O. Smirnov, PhD-student, O. Kosyuk, PhD, N. Taran, D.Sc. Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv

ALUMINIUM EFFECT ON ACIDIFICATION ACTIVITY OF BUCKWHEAT GERMINATING ROOTS

Integral indicators of common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench.) and tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) root cell H^+ -ATPase functional status – acidification activity and relative acidification activity under aluminium treatment were investigated. Inhibitory action of aluminium on germinating roots proton efflux and specific difference of relative acidification activity was revealed.

Key words: aluminium, acidification activity, H^+ -ATPase, common buckwheat, tartary buckwheat.

УДК 616.438-008.931:577.152.-02

І. Чумаченко, асп., С. Шандренко, канд. біол. наук Інститут біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України, Київ

МОДИФІКОВАНИЙ МЕТОД ВИЗНАЧЕННЯ ЛАБІЛЬНОГО ЗАЛІЗА В ПЛАЗМІ КРОВІ

Метою роботи було розробити та перевірити модифікацію біохімічного методу визначення лабільного заліза в плазмі крові. За основу було взято стандартний метод визначення заліза в плазмі крові з використанням копірореагенту феррозу. Суть модифікації полягає в застосуванні нейтрального буферу, що запобігає вивільненню заліза із залізотранспортних протеїнів. Метод було перевірено на моделях *in vitro* та *in vivo*. У досліді з розчинами $FeSO_4$ та $FeCl_3$ приготуваними на 4% розчині альбуміну за нейтрального рН реєструвалось формування комплексу ферозин-залізо з максимумом поглинання $\lambda=562$ нм. У досліді на моделі рабдоміолізу на фоні підвищення гемоксигеназної активності реєструвалось утворення пулу лабільного тривалентного заліза у плазмі крові дослідних тварин, який був відсутнім у контролі. Отримані результати вказують на ефективність модифікованого методу та можливість його застосування в експериментальних та клінічних дослідженнях.

Ключові слова: рабдоміоліз, феррозин, залізо, трансферин.

Вступ. За стандартних умов в плазму крові залізо поступає із шлунково-кишкового тракту у відновленому стані та утворює нестійкі залізо-сірчані комплекси з альбуміном. Церулоплазмін (ЦП) окислює це залізо та

сприяє його зв'язуванню у трансферині (ТР): $Fe^{+2} + ЦП \rightarrow ЦП-Fe^{+3} \rightarrow ЦП-Fe^{+3}-ТР \rightarrow Fe^{+3}-ТР$, де воно екранується від хімічної взаємодії. Важливо, що до ТР можливе включення тільки початково двовалентного

© Чумаченко І., Шандренко С., 2014

заліза та тільки за безпосередньої участі ЦП. Самостійне включення як II-х, так і III-х валентного заліза до ТР при фізіологічних умовах неможливе [1, 2]. Якщо внаслідок ряду патологічних процесів, наприклад при рабдоміолізі, дії різноманітних окислювачів, в плазмі крові з'являється "лабільне" (не включене до трансферину) тривалентне залізо, воно випадає з фізіологічної схеми обміну заліза, тому здатне накопичуватися в крові та посилювати окисні процеси.

Тому пряма оцінка концентрації вільного (лабільного) заліза у біологічних зразках є актуальною задачею для коректної терапії наслідків патологічних станів. В попередніх дослідженнях на моделі гіперпродукції NO (інтратрахеальне введення азбесту) нами вже було запропоновано метод оцінки лабільної форми заліза [3]. Метод базується на парамагнітних властивостях лабільного Fe^{3+} та вимагає спеціального устаткування (ЕПР спектрометра), що зменшує широту його застосування. Тому виникла потреба пошуку іншого, більш простого методу. За основу було взято набір для визначення концентрації заліза в сироватці крові. В склад набору входить кольорореагент феррозин, що в реакції з двовалентним залізом дає фіолетове забарвлення ($\lambda=562\text{nm}$). Але цей набір не є селективним стосовно джерела заліза (трансферин/ не трансферин зв'язане) і вимірює його загальну концентрацію. Модифікувати стандартний метод і зробити його придатним для виміру лабільної (не зв'язаної) форми заліза і було завданням цієї роботи.

Матеріали та методи. Розробка та апробація методу проводилась на моделях *in vivo* та *in vitro*.

Досліди *in vitro* проводили у два етапи. На першому етапі нами було перевірено можливість взаємодії феррозу з іонами Fe^{2+} при фізіологічному рН. Для цього 100 мкл водного розчину FeSO_4 додавали до 900 мкл 4% водного розчину сироваткового альбуміну. 100 мкл отриманого розчину додавали до 900 мкл 4% розчину сироваткового альбуміну на фосфатному буфері (рН 7,4, 0,2 М). До 200 мкл зразка додавали 20 мкл ферозину і витримували 30 хвилин після чого проводили спектрофотометричні вимірювання.

Другий етап проводили за аналогічною схемою з заміною FeSO_4 на FeCl_3 та використанням буферного розчину (розчин тіомочевини, гуанідину гідрохлориду та гідроксиламіну гідрохлориду приготований на фосфатному буфері з рН 7,4) для відновлення 3-валентного заліза до 2-валентної форми. Також було проведено калібрування спектрофотометричного методу з використанням розчинів FeCl_3 приготуваних на 4% сироватковому альбуміні (рН 7,4, 0,2 М фосфатний буфер).

Експериментальні досліди (модель рабдоміолізу) проводили на щурах самцях лінії Wistar масою 180-220 г., раціон харчування яких складався із концентрованого гранульованого комбікорму. Для дослідження формували 5 груп тварин по 6 щурів в кожній: гр. №1 – контроль (інтактні тварини); щурам з інших груп (№2-5) у обидва стегнових м'язів разово вводили 50% водний розчин гліцерину у дозі 10 мл/кг маси тіла. Тварин виводили з експерименту декапітацією під ефірним нарко-

зом через 1 добу (гр. №2), 3 доби (гр. №3), 6 діб (гр. №4), 10 діб (гр. №5) після введення гліцерину. У тварин відбирали кров та тканину печінки.

Гемоксигеназну активність у тканині печінки визначали по кількості утвореного білірубіну з використанням стандартного набору фірми "Філісіт-Діагностика" (Україна) [4]. Вміст гем у крові визначали піридингемохромним методом. Лабільне залізо плазми крові визначали спектрофотометричним методом з власною модифікацією використавши набір фірми "Філісіт-Діагностика" для визначення заліза [5]. У наборі реактивів замінили гліцин/HCl (0,2 М) на фосфатний буфер рН 7,4 (0,1М). Концентрацію заліза зв'язаного з трансферинном розраховували як різницю між концентраціями загального та лабільного заліза. Оптичні показники розчинів визначали на спектрофотометрі "μQuant" (США).

Статистичну обробку результатів проводили в програмі Excel 2007 та Statistica 4.5. Відповідність експериментальних даних нормальному розподілу перевіряли тестом Shapiro-Wilk з рівнем значимості 0,05. Для оцінки достовірності змін застосовували параметричний t-критерій або непараметричний U-критерій Манна – Уїтні.

Результати дослідження та їх обговорення. У даній роботі в якості основи для розробки власного методу було взято набір реактивів фірми "Філісіт-Діагностика" для визначення концентрації заліза та загальної залізо зв'язуючої здатності плазми крові (REF № HP012.01). Принцип спектрофотометричного методу полягає в наступному: натрієва сіль 3-(2-піриділ)-5,6-біс(4-сульфофеніл)-1,2,4-триазину (ферозин) дає з іонами Fe^{2+} комплекс фіолетового кольору (максимум оптичного поглинання при $\lambda=562\text{ nm}$). У кислому середовищі гліцин/HCl (рН=2,5) буферу залізо вивільнюється з залізо зв'язуючих протеїнів (трансферину) та відновлюється завдяки дії гуанідину та гідроксиламіну. При фізіологічному рН трансферин захищає включене в нього залізо від хімічної взаємодії. Наша ідея полягала в наступному: при проведенні реакції при рН 7,4 (замінивши у наборі кислий гліцин/HCl буфер на фосфатний) доступним до хімічної взаємодії буде лабільне залізо, що складається з іонів Fe^{2+} , які поступають у кров із шлунково-кишкового тракту та у подальшому включаються до трансферину, та іони Fe^{3+} , які можуть з'являтися при катаболізмі металопротеїнів та "випадають" з фізіологічної схеми обміну. Перша форма лабільного заліза (Fe^{2+}) складає приблизно 5% від загального заліза плазми крові та не дає суттєвого забарвлення. Тому у випадку реєстрації суттєвої кількості фіолетового продукту реакції при рН 7,4 основний внесок робить саме лабільне Fe^{3+} , яке може утворюватися при розпаді металопротеїнів та накопичуватися у плазмі крові.

У модельних дослідах з розчинами FeSO_4 та FeCl_3 приготуваними на 4% розчині альбуміну за нейтрального рН реєструвалось формування комплексу ферозин-залізо фіолетового кольору з максимумом поглинання $\lambda=562\text{ nm}$. Отриманий спектр (довжина хвиль 500-600 nm) наведено на рис. 1.

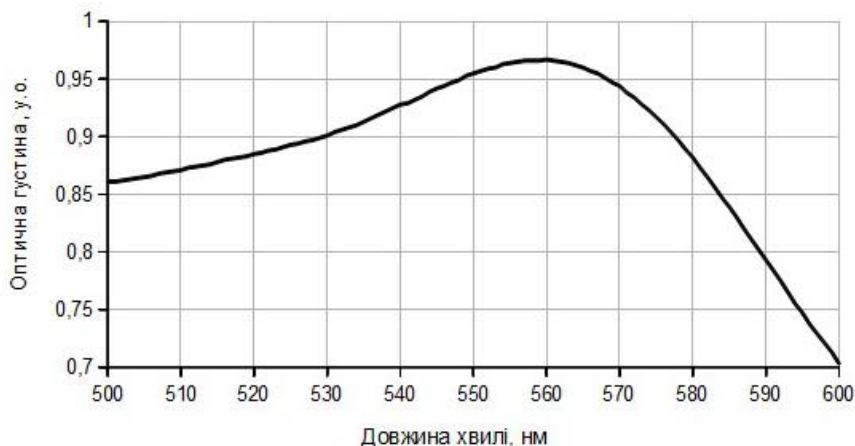


Рис.1. Спектр поглинання комплексу ферозин залізо. Максимальна оптична густина при довжині хвилі $\lambda=562$ нм

В якості моделі *in vivo* нами було обрано модель рабдоміолізу. Рабдоміоліз – патологічний стан, який спричинений пошкодженням м'язів та характеризується вивільненням вмісту м'язових клітин (електроліти, міоглобін та інші саркоплазматичні протеїни) в кров'яне русло. Міоглобін крові фільтрується клубочками нирок і з'являється в сечі (міоглобінурія), що супроводжується порушенням кровопостачання ниркової кори і зменшенням клубочкової фільтрації. Розвиваються структурні зміни в нирках, головним чином у канальцях. Наслідком цього є гостра ниркова недостатність, яка виникає приблизно за 24-48 годин після початкового пошкодження м'язів, незалежно від виду фактора, який спричинив даний патологічний стан та є домінуючим проявом даної патології [6].

Відомо, що індукція гемоксидازی (ГО) є одним із основних механізмів деградації гемопротеїнів та перешкоджає розвитку тканинних ушкоджень у нирках при рабдоміолізі у щурів [7,8] та при ін'єкції гемоглобіну мишам [9]. В процесі інтенсивного вивільнення гем у з

цих протеїнів можливе утворення вільного заліза. У контрольній групі така форма заліза не визначається (табл. 1). У зразках дослідних тварин вже на 1 добу після введення щурам гліцерину кількість лабільного заліза майже у два рази перевищує вміст заліза у ТР контрольних тварин. Рівень лабільного заліза зберігається на такому високому рівні до 6-ти діб, поповнюючись продуктами ГО-активності та каталізуючи окисні процеси в організмі. Максимальні зміни в параметрах обміну заліза спостерігаються на 3-тю добу експерименту. В порівнянні з контролем загальна концентрація негемового заліза плазми крові на цей період зростає майже втричі. Але цей приріст спричинений формуванням пулу саме лабільного заліза, концентрація якого також майже втричі перевищує концентрацію заліза у ТР. Такий сильний зв'язок між двома показниками свідчить, що саме процес катаболізму вільного гем у ГО є джерелом утворення пулу лабільного заліза у крові. Отримані дані наведено у таблиці 1.

Таблиця 1. Біохімічні показники плазми крові та печінки щурів при різних термінах рабдоміолізу (n=6)

Показники	Тривалість рабдоміолізу, діб				
	контроль	1	3	6	10
плазма крові					
Вільний гем, мкмоль/л	11±5	120±26*	45±9*	41±10*	34±9*
Загальне залізо, мг/л	1,2±0,2	3,1±0,7*	3,5±0,7*	3,3±0,7*	2,4±0,5*
Трансферинове залізо, мг/л	1,2±0,2	1,0±0,2	0,9±0,2*	1,2±0,3	1,5±0,4
Лабільне залізо,мг/л	н.в.	2,1±0,6	2,6±0,6	2,1±0,6	0,9±0,4
печінка					
Гем-оксигеназна активність, нмоль білірубину/хв./мг протеїну	8,1±2,0	47±7*	51±8*	38±5*	22±7*

Прим.: * - вірогідні зміни відносно контролю ($p<0.05$).

Висновки. В роботі розроблено та перевірено на модельних та експериментальних (рабдоміоліз) дослідках модифікацію методу визначення пулу лабільного (негемового) заліза. Суть модифікації полягає у застосуванні нейтрального буферу, що запобігає вивільненню заліза з трансферину. Доведено, що при розвитку гліцерин-стимульованого рабдоміолізу у щурів відбувається утворення у плазмі крові нового пулу негемового тривалентного заліза, яке не включене до трансферину та здатне до хімічної взаємодії. Накопичення не екранованого редокс-активного заліза може бути одним із чинників розвитку окисдативного стресу при рабдоміолізі. Ці зміни в обміні заліза необхідно враховувати при розробці схем лікування відповідних патологічних станів.

Список використаних джерел

1. Aisen P., Enns C., Wessling-Resnick M. Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism. // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2001. – 33, N 10. – P.940–959.

- Arredondo M., Núñez M.T. Iron and copper metabolism. // *Molecular Aspects of Medicine.* – 2005. – v. 26, is. 4-5. – P.313–327.
- Шандренко С.Г., Кішко Т.О., Чумаченко І.М., Дмитренко М.П. Зміни в обміні оксиду азоту та заліза у щурів, спричинені азбестом. // *Укр.біох. журн.* – 2011. – 83, N 2. – С.93-100.
- Sardana M.K., Sassa S., Kappas A. Hormonal regulation of heme oxygenase induction in avian hepatocyte culture. // *Biochem. Pharmacol.* – 1985. – 34, N 16. – P.2937-2944.
- Інструкція до набору реактивів для визначення заліза та залізо-зв'язуючої здатності (Філісіт Діагностика). REF № HP012.01.
- Sauret J.M., Marinides G., Wang G.K. Rhabdomyolysis. // *Am Fam Physician* – 2002. – 65, N 5. – P.907–912.
- Boutaud O., Jackson Roberts L. Mechanism-based therapeutic approaches to rhabdomyolysis-induced renal failure. // *Free radical & Medicine.* – 2011. – 51. – P.1062-1067.
- Nath K. A. Heme oxygenase-1: a provenance for cytoprotective pathways in the kidney and other tissues. // *Kidney Int.* – 2006. – 70, N 3. – P.432–443.
- Nath K. A., Haggard J. J., Croatt A. J., et al. The indispensability of heme oxygenase-1 in protecting against acute heme protein-induced toxicity *in vivo*. // *Am. J. Pathol.* – 2000. – 156, N 5. – P.1527–1535.

Надійшла до редколегії 13.02.14

И. Чумаченко, асп., С. Шандренко, канд. биол. наук
Институт биохимии им. А.В. Палладина Национальной академии наук Украины, Киев

МОДИФИЦИРОВАННЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛАБИЛЬНОГО ЖЕЛЕЗА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

Целью работы было разработать и проверить модификацию биохимического метода определения лабильного железа в плазме крови. За основу был взят стандартный метод определения железа в плазме крови с использованием цветореагента феррозина. Суть модификации заключается в применении нейтрального буфера, который предотвращает высвобождение железа из железо-транспортных протеинов. Метод был проверен на моделях *in vitro* и *in vivo*. В модельных опытах с растворами FeSO_4 и FeCl_3 приготовленными на 4% растворе альбумина при нейтральном pH регистрировалось формирование комплекса феррозин-железо с максимумом поглощения $\lambda = 562$ нм. В опыте на модели рабдомиолиза на фоне повышения гемоксигеназной активности регистрировалось образование пула лабильного трехвалентного железа в плазме крови опытных животных, который отсутствовал в контроле. Полученные результаты указывают на эффективность модифицированного метода и возможность его применения в экспериментальных и клинических опытах.

Ключевые слова: рабдомиолиз, феррозин, железо, трансферрин.

I. Chumachenko, PhD-student, S. Shandrenko, PhD.
Palladin Institute of Biochemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine (NASU), Kyiv

THE MODIFIED METHOD FOR BLOOD SERUM LABILE IRON QUANTIFICATION

The goal of the research was to develop and test the modification of biochemical method for blood plasma labile iron quantification. As the basis a standard method for plasma iron determination with color reagent ferrozine was taken. Modification essence consists in applying a neutral buffer which prevents the release of iron from the iron-transport protein. The method was tested on *in vitro* and *in vivo* models. In experiments with FeSO_4 and FeCl_3 solutions iron-ferrozine complex formation with maximum OD $\lambda=562\text{nm}$ was registered. Iron solutions were prepared on 4% albumin at neutral pH. In rhabdomyolysis model experiment, while heme oxygenase activity increase, the pool of labile ferric iron in blood plasma of experimental animals was measured. Such iron was absent in the control group. The results indicate the modified method effectiveness and the possibility of its usage in experimental and clinical trials.

Key words: rhabdomyolysis, ferrozine, iron, transferrin.

УДК 612.3+612.014.1

Ю. Вінник, асп., П. Цапенко, канд. біол. наук,
Т. Лященко, канд. біол. наук, С. Весельський, д-р біол. наук
КНУ імені Тараса Шевченка, Київ

ЖОВЧОСЕКРЕТОРНА ФУНКЦІЯ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ ЗА УМОВ ГІДРОКОРТИЗОВАНОГО НАВАНТАЖЕННЯ

В гострих спробах на щурах досліджено вплив гідрокортизону (40 мг/кг маси тіла тварини) на особливості відтворення печінкою зовнішньої секреторної функції. Встановлено, що цей гормон сприяє посиленню процесів кон'югації жовчних кислот з гліцином та таурином в гепатоцитах печінки щурів та забезпечує незначний холеретичний ефект. Відзначимо, що навантаження досліджуваною дозою покращує колоїдні та солюбілізаційні властивості секрету. За умов гідрокортизон-індукованого стресу спостерігається значне зниження рівня, що може бути частково наслідком інгібувочої дії гормону на ферментні системи синтезу *de novo*.

Ключові слова: гідрокортизон, печінка, жовчні кислоти.

Вступ. Печінка є найбільшою травною залозою, якій притаманні багаточисельні функції, котрі на належному рівні забезпечують сталість внутрішнього середовища та узгодженість функціонування органів і систем організму. Внаслідок індивідуальної і кооперативної діяльності клітин печінки відбуваються метаболічні процеси біосинтезу і розчеплення сполук, інтеграція чого забезпечується комплексом регуляторних механізмів [2].

Динамічність складу та властивостей жовчі визначається видовими, статевими та віковими особливостями організму, функціональним станом печінки, інших органів та систем, в тому числі і регуляторних, і, звичайно, характером, силою, тривалістю та поєднанням впливів на організм агентів зовнішнього середовища [4, 5]. Щоденно організм зазнає впливу стресорних чинників, які визначаються як подразники, що загрожують гомеостазу та як такі, що є потенційно небезпечними для організму. Дія зазначених факторів неминує впливає на функціонування окремих органів та систем організму, оскільки такий неспецифічний вплив спричиняє метаболічну перебудову, до якої залучені усі відомі ланки обміну речовин [1]. Тому, досить важко сказати які органи чи системи не задіяні у формуванні стресової відповіді та розвитку адаптивної реакції на стресовий вплив. Печінка, як одна з найголовніших травних залоз організму одночасно є ключовим органом в проміжному обміні речовин та її роль в адаптивній реакції є винятковою,

так як впродовж всього життя індивіда печінка, виконуючи свої багаточисельні функції, забезпечує організм необхідними енергетичними та пластичними матеріалами для нормального існування та життєдіяльності. Вивчення особливостей функціонування органів травної системи в умовах стресу наразі є досить актуальним, проте існуючі літературні дані є суперечливими [6, 7, 8, 10]. У механізмах декомпенсації адаптаційних можливостей організму за умов стресу істотну роль відіграють порушення у системі нейрогуморальної регуляції. Важливе значення у гуморальному компоненті цієї системи мають кортикостероїдні гормони, які контролюють як метаболічне забезпечення органів, так і стан тканинних регуляторних систем, що формують захисні реакції організму. Неоднозначні відповіді гепатобілярної системи спостерігаються за умов експериментального гідрокортизонавого навантаження, про що свідчать поодинокі літературні дані [9, 11, 13]. Потребують більш детального дослідження особливості функціонування гепатобілярної системи, що можуть бути викликані дією стресових агентів. Визначення швидкості холерезу та біохімічного складу жовчі в якості об'єкта досліджень являє інтерес не лише для вивчення особливостей обміну речовин в печінці, але й для розуміння механізмів метаболічної регуляції на клітинному рівні. Оскільки для функціонування стрес-реалізуючих систем характерна лабільність, що забезпечує належний захист органів та

систем організму від стресових впливів та їх наслідків. Метою роботи стало дослідження особливостей жовчосекреторної функції печінки щурів в умовах штучно модельованого експериментального стресу, шляхом введення гідрокортизону, який є однією з універсальних пускових гуморальних ланок стресової відповіді.

Матеріали та методи.

Визначення рівня холерезу. Досліди проводилися на 20 нелінійних білих щурах-самцях зрілої вікової групи в умовах гострого експерименту. Під час дослідів тварини знаходились під тіопенталовим наркозом (5 мг/100 г маси тіла). Перед дослідом тварини голодували протягом доби, доступ до води був вільним.

Після наркотизації тваринам проводили лапаротомію і для отримання проб жовчі у відпрепаровану загальну жовчну протоку вводили пластикову канюлю. Експериментальній групі тварин підшкірно вводили гідрокортизон (Gedeon Richter, Угорщина) у розрахунок 40 мг/кг маси тіла тварини [14, 16], аналогічним чином контрольній групі тварин вводили фізіологічний розчин. Інтенсивність секреції жовчі визначали через кожні 10 хвилин впродовж 2,5 годин після введення речовини. Об'єм швидкість секреції жовчі розраховували в мкл/г маси тіла тварини/хв. Експерименти проводили згідно із Загальними принципами експериментів на тваринах, схваленими на Національному конгресі з біоетики (Київ, Україна, 2001) та узгодженими з положеннями "Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей" (Страсбург, Франція, 1985).

Визначення змін вмісту жовчних кислот. Жовчні кислоти у кожній 30 хвилинній пробі жовчі визначали з допомогою тонкошарової хроматографії [3]: 0,1 мл жовчі додавали до 1,8 мл охолодженої екстрагуючої суміші етанол-ацетон (1:3). Проби охолоджували впродовж 30 хвилин, після чого центрифугували 10-12 хвилин при 3000-4000 об/хв. Екстракт висушували при температурі 37-40°C до сухого залишку. Сухий залишок розчиняли у 100 мкл суміші етанол-вода (6:4). 10 мкл проби наносили на попередньо промиті і розмічені хроматографічні пластинки. Хроматографічне розподілення вільних і кон'югованих жовчних кислот здійснювали у суміші аміловий ефір оцтової кислоти – толуол – бутанол – оцто-

ва кислота – вода (3:1:1:3:1) на платівках "Silufol". Ідентифікацію фракцій жовчних кислот проводили за допомогою стандартів і флуоресценції в ультрафіолетовому опроміненні. Жовчні кислоти розподілялися таким чином: таурохолева (ТХК), суміш таурохоленедезоксихолевої і тауродезоксихолевої (ТХДХК+ТДХК), глікохолева (ГХК), суміш глікохоленедезоксихолевої і глікодесоксихолевої (ГХДХК+ГДХК), холева (ХК), суміш хенодесоксихолевої і дезоксихолевої (ХДХК+ДХК). Для кількісного визначення вмісту жовчних кислот хроматограми попередньо оприскували барвниками: 15 мл льодяної оцтової кислоти, 1 г фосфорномоліденової кислоти, 1 мл сірчаної кислоти і 5 мл 50%-го розчину трихлороцтової кислоти. Хроматограми проявляли при температурі 60-70°C впродовж 5 хвилин і визначали вміст жовчних кислот на денситометрі ДО-1м (I-620 нм).

Дебіт складових частин жовчі визначали множенням кількості речовини в одиниці об'єму на весь об'єм отриманої проби секрету і розраховували в мкл/г маси тіла тварини.

Отримані дані перевірялись на нормальність розподілу за тестом Шапіро-Уїлка. Нормально розподілені дані обраховувались із застосуванням критерію t Стюдента. За застосуванням критерію Левена приймається гіпотеза про однорідність дисперсій з $\alpha > 0,05$. Статистично значущими вважались відмінності при $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення. Проведення експериментального дослідження характеризується створенням спеціальних умов для здійснення потрібних маніпуляцій. Зазначені зміни відображаються на протіканні фізіологічних процесів, зокрема на процесах утворення та виділення жовчі. Так, впродовж експерименту відбувається втрата жовчі організмом, також спостерігається зміна нервових впливів на гепатобіліарну систему, зумовлена стресовими умовами, викликаними застосуванням певних речовин. У тварин контрольної групи спостерігалось деяке невірогідне зниження рівня жовчної секреції, що пов'язане із втратою одного з головних компонентів секрету – жовчних кислот, котрі також є саморегуляторами холесекреції. У наших дослідженнях вивчався вплив хімічно модульованого за допомогою гідрокортизону стресу на холесекрецію щурів (Рис. 1).

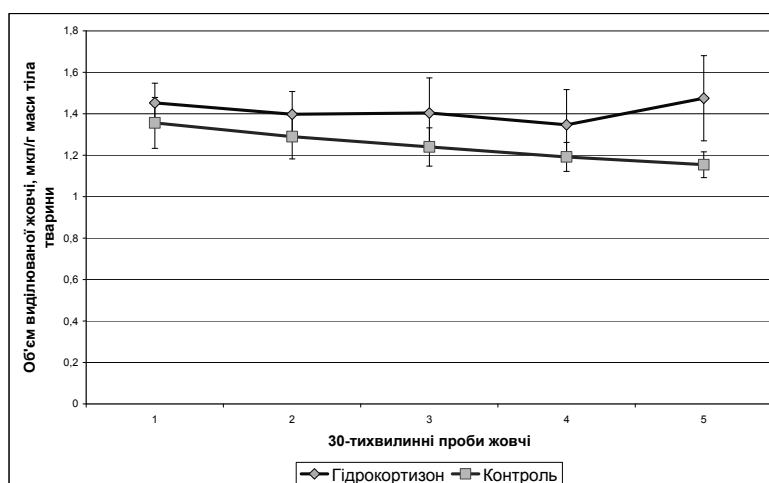


Рис. 1. Рівень холесекреції у щурів за умов гідрокортизонового стресу ($M \pm m$; $n=20$)

Після застосування досліджуваного гормону рівень жовчної секреції істотно не змінювався, проте було відмічене стрибкоподібне підвищення об'ємної швидкості холесекреції наприкінці дослідів, що проявилось у зміні кута нахилу кривої рівня холерезу в напрямку стимуля-

ції. Порівняння рівнів жовчного відтоку у тварин обох груп не виявляє статистично достовірних відмінностей, однак показники холесекреції в кожній пробі є вищими у тварин експериментальної групи.

Властивості жовчі як секрету залежать від якісного складу та співвідношення одних з основних її компонентів – жовчних кислот. Концентрації жовчних кислот у секреті тварин контрольної групи знижуються, оскільки вони втрачаються впродовж дослідів, що є наслідком розриву їх ентерогепатичного колообігу. Так, у тварин контрольної групи спостерігалось зниження вмісту кон'югованих з таурином та гліцином жовчних кислот. Вміст вільної холової кислоти також знижувався впро-

довж дослідів у той час як концентрація суміші ХДХК+ДХК змінювалась як у бік збільшення, так і зниження. Відносний вміст жовчних кислот після застосування гідрокортизону мав значні зміни (Табл. 1). Після введення біологічно активної речовини був відмічений загальний стимулюючий вплив на вміст ТХК, ТХДХК+ТДХК, ГХК та ГХДХК+ГДХК та гальмуюча дія на утворення вільної холової кислоти на фоні практично незмінної концентрації ХДХК+ДХК.

Таблиця 1. Концентрації жовчних кислот у жовчі щурів зрілої групи під впливом гідрокортизону навантаження ($M \pm m$; $n=20$)

Номер проби	Група тварин	ТХК	ТХДХК+ТДХК	ГХК	ГХДХК+ГДХК	ХК	ХДХК+ДХК
1 0-30хв.	Контроль	169,7 $\pm$ 3,76	89,4 $\pm$ 4,1	134,5 $\pm$ 4,56	10,1 $\pm$ 1,48	29,47 $\pm$ 1,92	7,83 $\pm$ 0,71
	Гідрокортисон	235,73 $\pm$ 10,27 **	127,4 $\pm$ 0,79 ***	184,77 $\pm$ 6,9 **	46,4 $\pm$ 9,31 *	7,77 $\pm$ 1,27 ***	7,17 $\pm$ 0,45
2 30-60хв.	Контроль	165,53 $\pm$ 4,1	85,47 $\pm$ 4,62	132,3 $\pm$ 6,14	10,1 $\pm$ 1,21	28,53 $\pm$ 1,36	7,0 $\pm$ 0,75
	Гідрокортисон	231,23 $\pm$ 4,45 ***	123,8 $\pm$,87 *	159,87 $\pm$ 12,5	41,27 $\pm$ 8,32 *	8,17 $\pm$ 1,39 ***	7,17 $\pm$ 0,32
3 60-90хв.	Контроль	160,0 $\pm$ 3,73	81,53 $\pm$ 4,42	126,5 $\pm$ 4,35	9,53 $\pm$ 1,23	25,83 $\pm$ 1,25	7,47 $\pm$ 0,96
	Гідрокортисон	229,37 $\pm$ 5,7 ***	113,53 $\pm$ 4,47 **	156,27 $\pm$ 7,5 *	38,13 $\pm$ 5,96 **	8,7 $\pm$ 1,43 ***	7,27 $\pm$ 0,42
4 90-120хв.	Контроль	155,13 $\pm$ 3,94	76,37 $\pm$ 4,2	121,57 $\pm$ 3,37	9,37 $\pm$ 1,4	23,7 $\pm$ 1,88	7,17 $\pm$ 0,87
	Гідрокортисон	227,93 $\pm$ 7,39 ***	120,2 $\pm$ 1,97 ***	148,73 $\pm$ 10,84	35,0 $\pm$ 5,13 **	8,67 $\pm$ 1,11 **	7,33 $\pm$ 0,52
5 120-150хв.	Контроль	141,1 $\pm$ 3,18	68,8 $\pm$ 4,81	118,2 $\pm$ 3,26	8,87 $\pm$ 1,25	23,6 $\pm$ 2,57	7,37 $\pm$ 1,26
	Гідрокортисон	225,5 $\pm$ 9,64 **	123,53 $\pm$ 3,67 ***	144,5 $\pm$ 9,15	29,3 $\pm$ 1,67 ***	9,0 $\pm$ 1,46 **	7,3 $\pm$ 0,66

Примітки: * – $p < 0,05$ щодо контролю; ** – $p < 0,01$ щодо контролю; *** – $p < 0,001$ щодо контролю.

Зміни біохімічного складу жовчі гідрокортизон-навантажених щурів відобразились у відсотковому вмісті гліко- та таурохолатів та концентрації холової кислоти. Зокрема, відбувалось значне збільшення концентрацій не лише таурохолевой та глікохолевой кислот, а й відносного вмісту суміші згаданих кон'югатів у жовчі тварин експериментальної групи при помітній пригнічуючій дії глюкостертикоїду на утворення холової кислоти. Виражений стимулюючий вплив гормону на виведення таурохолевой кислоти із жовчу щурів спостерігався впродовж всього експерименту ($p < 0,01$; $p < 0,001$). Як у контрольній, так і у дослідній групах концентрація ТХК у секреті тримався практично на одному рівні впродовж дослідів, але за умов гідрокортизону навантаження цей рівень був значно вищим 141,1 $\pm$ 3,18 мг% ($p < 0,01$) проти 225,5 $\pm$ 9,64 мг% ($p < 0,001$) (в п'ятій пробі). Рівень глікохолевой кислоти в жовчі щурів експериментальної групи збільшився після введення гідрокортизону, проте статистично значимі відмінності у показниках порівняно із тваринами контрольної групи спостерігались лише в 1-й та 3-й пробах ($p < 0,01$ та $p < 0,05$ відповідно). Результати проведених аналізів свідчать про значний стимулюючий вплив гідрокортизону на виділення суміші ТХДХК+ТДХК з жовчу у дослідних щурів порівняно з тваринами контрольної групи. Однак, слід зазначити, що вміст зазначених кислот у контролі знижувався з

часом, тоді як гідрокортисон сприяв підтриманню практично сталого високого значення вмісту зазначених кислот у жовчі тварин експериментальної групи. Вміст суміші глікохолатів у жовчному секреті тварин зрілої групи статистично збільшувався після введення гідрокортизону порівняно з контрольною групою, але впродовж дослідів їх вміст мав тенденцію до зниження. Стоєвню вмісту вільної холової кислоти в жовчі щурів, то гідрокортисон справляв яскраво виражений пригнічуючий вплив. Так, у тварин дослідної групи відбувалось достовірне зниження вмісту в жовчі холової кислоти внаслідок введення гідрокортизону. До того ж гальмівний ефект був постійним впродовж дослідів. Вміст суміші ХДХК+ДХК не мав чітко визначеної тенденції після застосування гормону та коливався як у бік збільшення, так і у протилежному напрямку на різних етапах експерименту. Зменшення вмісту вільної холової кислоти у жовчі експериментальних тварин може бути не лише наслідком гальмуючого впливу гідрокортизону на навантаження на синтез кислот de novo, а й значною мірою залученням великої їх частки до процесу утворення кон'югованих холатів.

Достатньо інформативними є показники гідроксилування та кон'югації, які ми також порівнювали у наших дослідженнях (Табл. 2).

Таблиця 2. Коефіцієнти кон'югації (КК) та гідроксилування (КГ) жовчних кислот щурів під впливом гідрокортизону навантаження ($M \pm m$; $n=20$)

Показник	Група тварин/Номер проби, час (хв.)	0-30	30-60	60-90	90-120	120-150
КК	Контроль	10,91 $\pm$ 0,79	12,82 $\pm$ 2,24	11,45 $\pm$ 0,96	11,9 $\pm$ 1,12	11,14 $\pm$ 1,19
	Гідрокортисон	40,72 $\pm$ 4,85 **	37,37 $\pm$ 5,14 *	34,61 $\pm$ 3,61 **	34,04 $\pm$ 3,94 **	32,97 $\pm$ 3,69 **
КГ	Контроль	3,11 $\pm$ 0,07	3,19 $\pm$ 0,08	3,18 $\pm$ 0,14	3,24 $\pm$ 0,11	3,33 $\pm$ 0,09
	Гідрокортисон	2,32 $\pm$ 0,14 **	2,34 $\pm$ 0,13 **	2,47 $\pm$ 0,21 *	2,38 $\pm$ 0,18 *	2,38 $\pm$ 0,12 **

Примітки: * – $p < 0,05$ щодо контролю; ** – $p < 0,01$ щодо контролю.

Застосування гідрокортизону сприяє збільшенню коефіцієнта кон'югації за рахунок стимулювання процесів кон'югації з гліцином та таурином, що позитивно впливає на сольобілізаційні властивості секрету. Збільшені значення коефіцієнтів кон'югації мають тенденцію до зниження впродовж експерименту.

Зазначимо, що після введення гормону спостерігалось статистично значуще зниження показників коефіцієнту гідроксилування, що є свідченням впливу гідро-

кортизону на систему перетворення жовчних кислот із переважанням утворення диоксихоланових кислот. Пригнічуюча дія гідрокортизону на процеси гідроксилування виявлялась впродовж всього дослідів, зберігаючи показники на стабільно низьких рівнях.

Окрім змін відносного вмісту (концентрація) хімічних складових жовчі у досліджуваних тварин вивчали абсолютний вміст (дебіт) зазначених речовин, оскільки він характеризує продуктивні можливості печінки в цілому (Табл. 3).

Таблиця 3. Зміни дебіту жовчних кислот у щурів зрілої групи під впливом гідрокортизонового навантаження (мкг/г маси тіла тварини; M±m; n=10)

Номер проби	Група тварин	ТХК	ТХДХК+ТДХК	ГХК	ГХДХК+ГДХК	ХК	ХДХК+ДХК
1	Контроль	2,16±0,19	1,14±0,11	1,72±0,19	0,13±0,008	0,38±0,06	0,1±0,02
	Гідрокортизон	3,42±0,21 *	1,85±0,12 *	2,68±0,17 *	0,68±0,16 *	0,11±0,02 *	0,1±0,013
2	Контроль	2,63±0,19	1,35±0,09	2,1±0,07	0,16±0,03	0,45±0,03	0,11±0,01
	Гідрокортизон	3,23±0,25	1,72±0,1	2,21±0,06	0,58±0,14 *	0,12±0,03 ***	0,1±0,012
3	Контроль	2,33±0,037	1,18±0,02	1,84±0,07	0,14±0,014	0,38±0,03	0,11±0,02
	Гідрокортизон	3,21±0,38	1,61±0,25	2,17±0,18	0,57±0,1 *	0,12±0,03 **	0,1±0,02
4	Контроль	2,26±0,14	1,1±0,07	1,75±0,05	0,14±0,03	0,34±0,02	0,1±0,02
	Гідрокортизон	3,04±0,28	1,62±0,23	1,97±0,15	0,47±0,08 *	0,12±0,03 **	0,1±0,02
5	Контроль	1,93±0,133	0,93±0,04	1,6±0,08	0,12±0,02	0,32±0,05	0,1±0,02
	Гідрокортизон	3,31±0,43 *	1,83±0,29 *	2,11±0,27	0,43±0,07 **	0,14±0,04 *	0,1±0,02

Примітки: * – p<0,05 щодо контролю; ** – p<0,01 щодо контролю; *** – p<0,001 щодо контролю.

Результати, отримані у щурів експериментальної групи показують переважання у жовчі загального вмісту кон'югованих жовчних кислот: ТХК, ТХДХК+ТДХК та ГХК у тварин контрольної та експериментальної груп. Також підвищується рівень ГХДХК+ГДХК після введення гормону, а рівні ХК та ХДХК+ДХК незначно знижуються чи навіть лишаються практично незмінними після гормонального впливу.

Вміст таурохолевої кислоти у жовчі гідрокортизон-індукованих щурів має статистично значиме переважання порівняно із контрольною групою. Вміст суміші ТХДХК+ТДХК в жовчі щурів експериментальної групи має достовірно вищі показники, ніж у контрольній групі, особливо на початку та в кінці дослідження. Застосування гормону сприяє максимальному підвищенню вмісту у жовчі тварин кон'югованих з гліцином жовчних кислот на початку експерименту. Впродовж дослідження цей показник поступово знижувався, хоча і був значно вищим за контрольні значення. Статистично значимі відмінності спостерігались для рівнів суміші ГХДХК+ГДХК у жовчі дослідної групи. Однак зміни рівня вільних жовчних кислот в жовчі тварин зазнав зворотних тенденцій після введення гідрокортизону – спостерігалось статистично значиме зниження абсолютного вмісту холевої кислоти. Загалом, можна вважати, що гідрокортизон сприяє інтенсифікації процесів кон'югації з таурином та гліцином (+46,45%), тим самим покращуючи колоїдні властивості секрету. Це в певній мірі співпадає з виявленими ефектами гідрокортизону на активацію інтрацелюлярного біосинтезу та експорту протеїнів і, можливо, є одним із молекулярних механізмів холеретичної дії глюкокортикоїдів [12, 15]. Одночасно відбувається гальмування утворення вільних жовчних кислот та їх сумішей (-52,98%). Однак гальмівний вплив речовини є частковим, оскільки значна частина синтезованих вільних холатів приймає участь в утворенні кон'югованих жовчних кислот. Стимулюючий вплив на утворення кон'югатів можна вважати модулюючим, оскільки переважання гліцин – та тауринвмісних кислот спостерігалось і у контрольній групі.

Висновки. Підсумовуючи викладену інформацію, можна робити висновки про деякий холеретичний ефект гідрокортизону, стимулюючий вплив застосування глюкокортикоїду на утворення кон'югатів з гліцином та таурином у жовчі щурів, що є свідченням нормальної роботи поліферментних систем, які забезпечують утворення жовчі та певний гальмівний вплив гормону на утворення вільних холатів. Одночасно із посиленням

процесу кон'югації, гідрокортизонове навантаження стримує процеси гідроксилювання в гепатоцитах. Зниження рівня вільних жовчних кислот в секреті може бути частково пов'язане із гідрокортизон – індукованими змінами у роботі поліферментних систем, які забезпечують синтез кислот *de novo* та одночасним залученням значної частини вільних холатів до утворення кон'югованих жовчних кислот.

Список використаних джерел

1. Барабой В.А. Стресс: природа, биологическая роль, механизмы, исходы / Барабой В.А. – Киев: Фитосоциогенет, 2006. – 424 с.
2. Биць Н.В. Експресія ліпополісахаридних рецепторів на клітинах печінки щура у нормі та при запаленні / Биць Н.В., Хижняк С.В. // Укр. біохім. журн. – 2004. – Т.76, №1. – С. 17-22.
3. Весельский С.П., Лященко П.С., Лукьяненко И.А. А.с.№1624322. Способ определения желчных кислот в биологической жидкости. Опул. в Бюлл., 1991, №4.
4. Ганиткевич Я.В. Роль желчи и желчных кислот в физиологии и патологии организма / Ганиткевич Я.В. – К.: Наукова думка, 1980. – 170 с.
5. Саратиков А.С. Желчеобразование и желчегонные средства. Изд. 2-е, перераб. и дополн. / Саратиков А.С., Скакун Н.П. – Томск: Изд-во Том. ун-та, 1991. – 260 с.
6. Kvetnansky R., Fukuhara K., Pacák K., Cizza G., Goldstein D.S., Kopin I.J. Endogenous glucocorticoids restrain catecholamine synthesis and release at rest and during immobilization stress in rats. *Endocrinology*. 1993 Sep;133(3):1411-9.
7. Klusek J. The effect of hydrocortisone on the concentration of triacylglycerols and cholesterol in the liver and of micromaintained on two diets differing in protein level / Klusek J., Seta E., Świdarska-Kolacz G., Jozwik A., Kolataj J.A. // *Animal Science and Reports*. – 2007. – Vol. 25, №2.
8. Kvetnansky R., Micutkova L., Rychkova N., Kubovcova L., Mravec B., Filipenko M., Sabban E.L., Krizanova O. Quantitative evaluation of catecholamine enzymes gene expression in adrenal medulla and sympathetic ganglia of stressed rats. *Ann NY Acad Sci*. 2004;1018:356-369.
9. Kvetnansky R., Mikulaj L. Adrenal and urinary catecholamines in rats during adaptation to repeated immobilization stress. *Endocrinology*. 1970;87:738-743.
10. Kvetnansky R., Sabban E.L., Palkovits M. Catecholaminergic systems in stress: structural and molecular genetic approaches. *Physiol Rev*. 2009;89:535-606.
11. Kullak-Ublick G.A. Hepatobiliary transport / Kullak-Ublick G.A., Beuers U., Paumgartner G. // *J. Hepatology*. – 2000. – Vol. 32. – P. 3-18.
12. Masiuk A.I. The hormonal regulation of bile secretion due to the activation of protein biosynthesis in the hepatocytes. *Fiziol Zh Im I M Sechenova*. 1993 Jun;79(6):147-53.
13. Sabban E.L. Catecholamines in stress: molecular mechanisms of gene expression. *Endocrine Regulations*. 2007;41:61-73.
14. Sadowski R.N., Jackson G.R., Wiczorek L., Gold P.E. Effects of stress, corticosterone, and epinephrine administration on learning in place and response tasks. *Behav. Brain. Res.* 2009 Dec 14;205(1).
15. Seckin S., Alptekin N., Dogru-Abbasoglu S., Kocak-Toker N., Toker K., Uysal M. 1997: The effect of chronic stress on hepatic and gastric lipid peroxidation in long-term depletion of glutathione in rats. *Pharmacol. Res.* 36(1): 55-57.
16. Wong C., Hamlin N., Legaspi E. *The Medicine Consult Handbook*, 4th edition. Seattle, WA, 2011.

Надійшла до редколегії 20.12.13.

Ю. Винник, асп., П. Цапенко, канд. биол. наук, Т. Лященко, канд. биол. наук, С. Весельский, д-р биол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

ЖЕЛЧЕСЕКРЕТОРНАЯ ФУНКЦИЯ ПЕЧЕНИ КРЫС В УСЛОВИЯХ ГИДРОКОРТИЗОНОВОЙ НАГРУЗКИ

В острых условиях на крысах исследовано влияние гидрокортизона (40 мг/кг массы тела животного) особенности воспроизведения печенью внешне секреторной функции. Установлено, что этот гормон способствует усилению процессов конъюгации желчных кислот с глицерином и таурином в гепатоцитах печени крыс и обеспечивает незначительный холеретический эффект. Отметим, что нагрузка исследуемой дозой улучшает коллоидные и солюбилизационные свойства секрета. В условиях гидрокортизон – индуцированного стресса наблюдается значительное снижение уровня, что может быть частично следствием ингибирующего действия гормона на ферментные системы синтеза *de novo*.

Ключевые слова: гидрокортизон, печень, желчные кислоты.

Yu. Vinnuk, Phd stud., P. Tsapenko, PhD., T. Lyaschenko, PhD., S. Veselskiy, DSc.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv

BILIARY SECRETION OF BRATS LIVER IN HIDROCORTIZONE LOAD

It was investigated the influence of hydrocortisone (40 mg/kg b wt) on bile secretion of acute experiment on rats. It was estimated that this hormone promoted increasing of bile acids conjugation with taurin and glycine in rat hepatocytes and provided a minor choleretic effect. It should be indicated that loading of mentioned dose improve solubilising and colloidal properties of the bile. It was observed significant decrease of free-bile-acid level under conditions of hydrocortisone-induced stress. It may be partially caused by inhibition effect of hormone on enzymatic system.

Key words: hydrocortisone, bile acids.

УДК: 616-092.4

М. Бурлова-Васильєва, асп., Н. Кравченко, канд. біол. наук, О. Савчук, д-р біол. наук
КНУ імені Тараса Шевченка, Київ,
В. Мельник, канд. мед. наук
Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, Київ

РІВЕНЬ ФАКТОРУ ФОН ВІЛЛЕБРАНДА ЗА УМОВ АТЕРОТРОМБОТИЧНОГО ІШЕМІЧНОГО ІНСУЛЬТУ ТА КАРДІОЕМБОЛІЧНОГО ІШЕМІЧНОГО ІНСУЛЬТУ НА ФОНІ МИГОТЛИВОЇ АРИТМІЇ

Визначити рівень фактору фон Віллебранда у плазмі крові пацієнтів з атеротромботичним ішемічним інсультом та пацієнтів з кардіоемболічним ішемічним інсультом на фоні миготливої аритмії, а також дослідити можливий внесок тромбоцитів у коливання рівня даного фактору. У дослідженні взяли участь 80 пацієнтів з діагнозом атеротромботичний ішемічний інсульт та кардіоемболічний ішемічний інсульт на фоні миготливої аритмії. Рівень фактору фон Віллебранда визначали методом імуноферментного аналізу. Активність тромбоцитів досліджували на фотооптичному агрегометрі AP2110 "Солар" (Білорусь). Рівень фактору фон Віллебранда перевищував норму на 63 % за кардіоемболічного ішемічного інсульту на фоні миготливої аритмії, тоді як суттєве підвищення агрегації тромбоцитів навпаки було характерним для хворих з атеротромботичним ішемічним інсультом. Отримані результати можуть свідчити про те, що вагомий внесок у зростання рівня фактору фон Віллебранда у плазмі крові належить саме ендотеліальним клітинам, дисфункція яких є більш вираженою за кардіоемболічного ішемічного інсульту на фоні миготливої аритмії.

Ключові слова: атеротромботичний ішемічний інсульт, кардіоемболічний ішемічний інсульт на фоні миготливої аритмії, фактор фон Віллебранда, тромбоцити.

Вступ. За даними ВОЗ інсульт є другою за частотою причиною смертності в світі [17]. Щорічно інсульт переносять близько 6 млн. людей. За цей же період в Україні діагноз "інсульт" ставиться більш ніж 100 тис. пацієнтам [2]. Враховуючи, що лікування інсульту є обмеженим, найкращий спосіб зменшити негативні наслідки від цього патологічного стану – вчасне первинне попередження, індивідуалізоване лікування та реабілітація [5]. На сьогоднішній день вкрай необхідним є як вивчення причин та механізмів розвитку інсульту та його підтипів, так і пошук нових біомаркерів, які можуть бути застосовані в діагностиці для виявлення осіб з високим ризиком розвитку інсульту, а також контролю та оптимізації лікування хворих.

Серед випадків ішемічного інсульту, атеротромботичний та кардіоемболічний інсульт є одними з найпоширеніших підтипів [3]. Атеротромботичний інсульт зазвичай виникає на фоні атеросклерозу церебральних артерій. Атеросклеротична бляшка звужує просвіт судини та сприяє тромбоутворенню. Кардіоемболічний інсульт виникає за повної чи часткової закупорки мозкової артерії емболом за кардіогенної емболії при клапанних пороках серця або за інших вражень серця, що супроводжуються утворенням в його порожнинах пристінкових тромбів. Часто кардіоемболічний інсульт розвивається внаслідок пароксизму миготливої аритмії [1].

В основі розвитку обох патологічних станів дуже важливу роль відіграє ендотеліальна дисфункція – стан, що передуює атеросклерозу та тромбозу [10]. Одним з ефективних маркерів ендотеліальної функції є плазматичний рівень фактору фон Віллебранда (vWF) [6]. Фактор фон Віллебранда (фактор Віллебранда, *von Willebrand factor* (vWF) – глікопротеїн плазми крові, що синтезується, депонується та секретується клітинами ендотелію судин, а також тромбоцитами [7]. Не дивлячись на те, що багато дослідників у всьому світі вивчало залежність між рівнем плазматичного vWF та ішемічним інсультом, досліджень щодо асоціації між рівнем vWF та розвитком різних підти-

пів даної патології недостатньо [4]. Нашою метою було визначити рівень vWF у плазмі крові пацієнтів з атеротромботичним ішемічним інсультом (АІІ) та пацієнтів з кардіоемболічним ішемічним інсультом (КІІ) на фоні миготливої аритмії, а також дослідити можливий внесок тромбоцитів у коливання рівня даного фактору за перебігу патології, що досліджувались.

Матеріали та методи. Проведено клініко-лабораторне обстеження 80 хворих з гострим ішемічним інсультом. В залежності від підтипу інсульту пацієнти були відкритим методом рандомізовані на дві групи: 1 група – пацієнти з атеротромботичним ішемічним інсультом (n = 44) та 2 група – пацієнти з кардіоемболічним ішемічним інсультом (n = 36).

Вік хворих на момент огляду варіював від 43 до 91 років, складаючи в середньому $73,62 \pm 8,9$ років. Хворі перебували на стаціонарному лікуванні в I та II неврологічних відділеннях Київської міської клінічної лікарні №4. Діагноз ішемічного інсульту був підтверджений нейровізуалізаційно (КТ- або МРТ-головного мозку). Всі хворі або їх родичі були попереджені про проведення клінічного дослідження та давали письмову згоду на участь у ньому.

Кардіоемболічний підтип ішемічного інсульту був діагностований за наявності у хворого миготливої аритмії: постійної, пароксизмальної форми або перенесеного гострого інфаркту міокарда в анамнезі та їх поєднання. Діагноз миготлива аритмія вважали достовірним, якщо даний стан був підтверджений на електрокардіограмі або за наявності пароксизмальної форми миготливої аритмії, що було зафіксовано у амбулаторній карті та пароксизмом миготливої аритмії перед розвитком ішемічного інсульту. Перенесений інфаркт міокарда теж був підтверджений на електрокардіограмі у вигляді постінфарктного кардіосклерозу та задокументований у амбулаторній картці. В дослідження не включали хво-

рих у стані коми, хворих з вираженою дихальною недостатністю або з підозрою на онкологічне захворювання.

При надходженні до стаціонару усі хворі на першу добу отримували аспірин 325 мг внутрішньо. Забір венозної крові проводили пункцією ліктьової вени з 8 до 9 години ранку натщесерце, в пробірку з розчином лимоннокислого натрію (38 г/л) в кінцевому співвідношенні 9:1.

Плазму крові та плазму крові, збагачену тромбоцитами отримували згідно рекомендацій для роботи з фотооптичним агрегометром AP2110 "Солар" (Білорусь). Рівень фактора фон Віллебранда визначали у плазмі крові методом імуноферментного аналізу, який проводили за стандартною методикою для розчинних білків [16]. Плазму крові розводили 50 мМ трис-НСІ буфером, рН 7,4 у співвідношенні 1:100 та інкубували у комірках планшетів за 37°C протягом 60 хв. Для видалення реагентів, що не зв'язалися, використовували 50 мМ трис-

НСІ буфер, рН 7,4. Блокування неспецифічних місць зв'язування проводили 5% розчином знежиреного молока протягом ночі. Первинні (Millipore, USA) та вторинні (Bio-Rad, USA) антитіла готували відповідно до рекомендацій виробника, інкубацію проводили за 37°C протягом 60 хв. Візуалізацію реакції проводили субстратом для лужної фосфатази за 37°C протягом 60 хв. Оптичне поглинання вимірювали за довжин хвилі 405 нм та 492 нм на мікроридері BioTek Instruments.

Результати та обговорення. При дослідженні тромбоцитарної ланки системи гемостазу хворих з АІІ та КІІ на фоні миготливої аритмії було виявлено тенденцію до зростання швидкості агрегації тромбоцитів хворих з АІІ відносно донорів, а також тенденцію до зниження кількості тромбоцитів у плазмі крові обох груп хворих. Максимальна амплітуда агрегації хворих з АІІ перевищувала показник донорів на 26 % (Табл. 1.).

Таблиця 1. Показники тромбоцитарної ланки гемостазу за атеротромботичного ішемічного інсульту та кардіоемболічного ішемічного інсульту на фоні миготливої аритмії

Група	Швидкість агрегації тромбоцитів на 30-й сек., %	Максимальна амплітуда агрегації тромбоцитів, %	Кількість тромбоцитів, ×1000/мкл
Донори	51,58±9,85	66,28±6,51	205,67±47,64
Атеротромботичний ішемічний інсульт (АІІ)	61,05±11,32	83,43±8,93*	148,67±36,58
Кардіоемболічний ішемічний інсульт (КІІ) на фоні миготливої аритмії	50,07±10,23	74,32±11,11	139,80±55,03

* – достовірні зміни відносно контролю, $p \leq 0,05$.

Відомо, що vWF секретується не лише з активованих тромбоцитів, а й підвищується в разі активації або пошкодження ендотеліальних клітин судин. В місці пошкодження vWF виступає посередником агрегації та адгезії тромбоцитів, тобто стимулює початок тромбоутворення, завдяки прикріпленню тромбоцитів до ділянки пошкодженої судини. Це відбувається шляхом з'єднання тромбоцитарного рецептора GPIb-IX-V із субендотеліальним колагеновим матриксом через vWF. Крім цього, vWF є носієм фактора згортання крові VIII, стабілізує його структуру і доставляє до місця ушкодження [11]. Підвищення рівня vWF у плазмі крові було виявлено за наступних патологій: легенева гіпертензія [9], хронічна серцева не-

достатність [8], ішемічна хвороба серця [13], мігрень [14], хронічний ішемічний інсульт на фоні миготливої аритмії [12] та ішемічний інсульт [15], що вказує на те, що vWF є важливим маркером у прогнозуванні тромбозу.

За КІІ на фоні миготливої аритмії спостерігалось значне зростання рівня фактору фон Віллебранда, який перевищував норму на 63%. Для хворих з АІІ була характерна тенденція до підвищення рівня фактору фон Віллебранда у плазмі крові, який перевищував показник донорів до 42 %. Значне варіювання індивідуальних показників у групі хворих з АІІ, не дало змоги встановити статистично достовірні зміни рівня фактору фон Віллебранда відносно групи донорів.

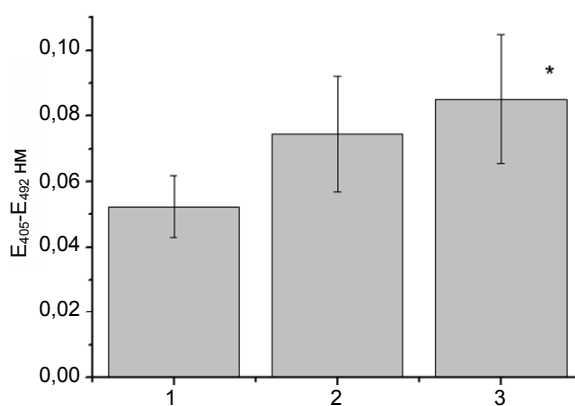


Рис. 1. Рівень фактору фон Віллебранда у плазмі крові
1 – донорів; 2 – хворих з атеротромботичним ішемічним інсульт (АІІ);
3 – хворих з кардіоемболічним ішемічним інсульт (КІІ) на фоні миготливої аритмії

* – достовірні зміни відносно контролю, $p \leq 0,05$.

Висновки. При порівнянні показників тромбоцитарної активності та рівня фактору фон Віллебранда за обох патологічних станів було показано значне зростання плазматичного фактору фон Віллебранда за КІІ, тоді

як суттєве підвищення агрегації тромбоцитів навпаки було характерним для АІІ. Отримані результати можуть свідчити про те, що вагомий внесок у зростання рівня плазматичного фактору фон Віллебранда належить саме

ендотеліальним клітинам, дисфункція яких є більш вираженою за КІІ на фоні миготливої аритмії.

Список використаних джерел

1. Суслина З. А., Верещагин Н. В., Пирадов М. А. Подтипы ишемических нарушений мозгового кровообращения: диагностика и лечение // Consilium Medicum. – 2001. – Том 3, № 5. С.218-221.
2. Чепелевська Л.А., Любінець О.В. Динаміка і структура смертності населення України від зовнішніх причин смерті // Вісник соціальної гігієни та організації охорони здоров'я. – 2008. – №2. – С. 4-9.
3. De Jong G, van Raak L, Kessels F, Lodder J. Stroke subtype and mortality. a follow-up study in 998 patients with a first cerebral infarct. J Clin Epidemiol. 2003 Mar;56(3):262-8.
4. De Meyer S. F., Stoll G., Wagner D.D. et al. Von Willebrand Factor: An Emerging Target in Stroke Therapy. Stroke. 2012; 43: 599-606.
5. Goldstein L.B., Adams R., Becker K., et al. Primary prevention of ischemic stroke: a statement for healthcare professionals from the Stroke Council of the American Heart Association. Circulation – 2001; 103: 163-182.
6. Horvath B., Hegedus D., Szapary L. et al. Measurement of von Willebrand factor as the marker of endothelial dysfunction in vascular diseases. Exp Clin Cardiol. 2004 Spring; 9(1): 31-34.
7. Kanaji S, Fahs SA, Shi Q, Haberichter SL, Montgomery RR. Contribution of platelet vs. endothelial VWF to platelet adhesion and hemostasis. J Thromb Haemost. 2012 Aug;10(8):1646-52.
8. Penny W.F., Weinstein M., Salzman E.W., et al. Correlation of circulating von Willebrand factor levels with cardiovascular hemodynamics. Circulation 1991;83:1630-1636.

9. Rabinovitch M, Andrew M, Thom H, et al. Abnormal endothelial factor VIII associated with pulmonary hypertension and congenital heart defects. Circulation 1987;76: 1043-1052.

10. Roquer J, Segura T, Serena J, Castillo J. Endothelial dysfunction, vascular disease and stroke: the ARTICO study. Cerebrovasc Dis. 2009;27 Suppl 1:25-37.

11. Sadler J.E. Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. Annu Rev Biochem. 1998;67:395-424.

12. Sato M, Suzuki A, Nagata K, Uchiyama S. Increased von Willebrand factor in acute stroke patients with atrial fibrillation. J Stroke Cerebrovasc Dis. 2006 Jan-Feb;15(1):1-7.

13. Spiel A.O., Gilbert J.C. and Jilma B. Von Willebrand Factor in Cardiovascular Disease: Focus on Acute Coronary Syndromes. Circulation. 2008; 117: 1449-1459.

14. Tietjen G.E., Al-Qasbi M.M., Athanas K., et al. Increased von Willebrand factor in migraine. Neurology 2001;57: 334-336.

15. Wieberdink R.G., van Schie M.C., Koudstaal P.J. et al. High von Willebrand Factor Levels Increase the Risk of Stroke: The Rotterdam Study. Stroke. 2010;41:2151-2156.

16. Selected methods for antibody and nucleic acid probes / Cold Spring Harbor Laboratory Press. – USA, 1993.

17. The 10 leading causes of death in the world, 2000 and 2011. Geneva: World Health Organization. – 2013. <http://who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>.

Надійшла до редколегії 22.01.14

М. Бурлова-Васильева, асп., Н. Кравченко, канд. биол. наук, О. Савчук, д-р биол. наук
КНУ імені Тараса Шевченка, Київ

В. Мельник, канд. мед. наук

Национальный медицинский университет имени О.О. Богомольца, Киев

УРОВЕНЬ ФАКТОРА ФОН ВИЛЛЕБРАНДА ПРИ АТЕРОТРОМБОТИЧЕСКОМ ИШЕМИЧЕСКОМ ИНСУЛЬТЕ И КАРДИОЭМБОЛИЧЕСКОМ ИШЕМИЧЕСКОМ ИНСУЛЬТЕ НА ФОНЕ МЕРЦАТЕЛЬНОЙ АРИТМИИ

Определить уровень фактора фон Виллебранда в плазме крови пациентов с атеротромботическим ишемическим инсультом и пациентов с кардиоэмболическим ишемическим инсультом на фоне мерцательной аритмии, а также исследовать возможный вклад тромбоцитов в колебания уровня данного фактора. В исследовании приняли участие 80 пациентов с диагнозом атеротромботический ишемический инсульт и кардиоэмболический ишемический инсульт на фоне мерцательной аритмии. Уровень фактора фон Виллебранда определяли методом иммуноферментного анализа. Активность тромбоцитов исследовали на фотооптическом агрегометре AP2110 "Солар" (Беларусь). Уровень фактора фон Виллебранда превышал норму на 63% при кардиоэмболическом ишемическом инсульте на фоне мерцательной аритмии, тогда как существенное повышение агрегации тромбоцитов наоборот было характерным для больных с атеротромботическим ишемическим инсультом. Полученные результаты могут свидетельствовать о том, что весомый вклад в рост уровня фактора фон Виллебранда в плазме крови принадлежит именно эндотелиальным клеткам, дисфункция которых более выражена при кардиоэмболическом ишемическом инсульте на фоне мерцательной аритмии.

Ключевые слова: атеротромботический ишемический инсульт, кардиоэмболический ишемический инсульт на фоне мерцательной аритмии, фактор фон Виллебранда, тромбоциты.

M. Burlova-Vasylleva, PhD stud., N. Kravchenko, PhD., O. Savchuk, DSc.

Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv,

V. Melnyk, PhD

Bogomolets National Medical University, Kyiv

VON WILLEBRAND FACTOR LEVEL IN PATIENTS WITH ATHEROTHROMBOTIC ISCHEMIC STROKE AND CARDIOEMBOLIC ISCHEMIC STROKE WITH ATRIAL FIBRILLATION

To define the level of von Willebrand factor in plasma of patients with atherothrombotic ischemic stroke and patients with cardioembolic ischemic stroke with atrial fibrillation and to investigate the possible contribution of platelets in the fluctuations of this factor. The study involved 80 patients diagnosed with atherothrombotic ischemic stroke and cardioembolic ischemic stroke with atrial fibrillation. Von Willebrand factor level was determined by ELISA. Platelet activity was assessed using photooptical aggregometer AR2110 "Solar" (Belarus). Results: levels of von Willebrand factor exceeded the norm by 63% in patients with cardioembolic ischemic stroke and atrial fibrillation, whereas a significant increase in platelet aggregation was detected in patients with atherothrombotic ischemic stroke. Conclusions: our results may indicate that a significant contribution to the elevation of von Willebrand factor level in blood plasma belongs to endothelial cells, dysfunction of which is more pronounced in patients with cardioembolic ischemic stroke with atrial fibrillation.

Keywords: atherothrombotic ischemic stroke, cardioembolic ischemic stroke with atrial fibrillation, von Willebrand factor, platelets.

УДК: 582.951.4:581.95

О. Шиндер, канд. биол. наук, Ю. Неграш, асп.
Національний ботанічний сад імені М.М. Гришка НАН України, Київ

SCOPOLIA CARNIOLICA JACQ. (SOLANACEAE) НА ЗАХОДІ ПОДІЛЬСЬКОЇ ВИСОЧИНИ: ПОШИРЕННЯ, УМОВИ МІСЦЕЗРОСТАНЬ І СТАН ПОПУЛЯЦІЙ

Представлено результати вивчення особливостей поширення, ценотичних умов місцезростань і стану популяцій рідкісного виду флори України – *Scopolia carniolica* – на заході Подільської височини. Виявлено і описано нове місце знаходження досліджуваного виду.

Ключові слова: *Scopolia carniolica*, Західне Поділля, місцезростання, хорология, популяції.

Вступ. *Scopolia carniolica* – рідкісний вид флори України, занесений до Червоної книги. В Україні він перебуває на північно-східній межі ареалу і більшість

його місцезнаходжень відомі з Карпат, рідше – західних регіонів України і лише окремі локалітети виявлено на Придніпровській височині [15, С. 605]. Як рідкіс-

© Шиндер О., Неграш Ю., 2014

ний вид із цінними лікарськими властивостями, *S. carniolica* потребує всебічного дослідження природних місцезростань і моніторингу популяцій *in situ*. Відомості про характер поширення *S. carniolica* у цьому регіоні, а також, про умови місцезростань виду і стан його популяцій розрізнені та не узагальнені, що обумовлює необхідність у подальшому дослідженні місцезростань даного виду *in situ*.

Матеріали і методи. На основі літературних джерел [1-5; 7-10; 12-14; 16-18] і матеріалів гербаріїв Інституту ботаніки імені М.Г. Холодного НАН України (KW), Національного ботанічного саду імені М.М. Гришка НАН України (KWHN), Київського національного університету імені Тараса Шевченка (KWU), Державного природознавчого музею НАН України (LWS) та Волинського краєзнавчого музею (LUM) ми уточнили хорологічні відомості про досліджуваний вид у західно-подільській частині його ареалу. В ході польових досліджень, проведених у травні 2013 р., нами було виявлено новий локалітет *S. carniolica*, та вивчено умови місцезростань виду і стан його популяцій. Дослідження *in situ* включали флористичну і популяційну складові і були проведені за традиційними у вітчизняній ботаніці методиками [6, 11]. Структуру популяцій досліджували з урахуванням морфо-біологічних особливостей розвитку особин *S. carniolica*. Досліджуваний вид відноситься до вегетативно-рухомих і його популяції складаються із клонових куртин, для яких не можливо застосувати класичне поняття вікової структури. Натомість, ми використовуємо показник пагонової структури, що відображає співвідношення у популяції пагонів різних умовно-вікових типів. Цей показник залежить від конкретних умов місцезростання і нашу думку об'єктивно характеризує стан популяції. Видові назви рослин наведено за чеклістом С.Л. Мосякіна і М.М. Федорончука (1999). Назви синтаксонів лісової рослинності наведено за працею В.А. Онищенко [19].

Автори висловлюють подяку за сприяння у польових дослідженнях В.Б. Порохоньку та Н. І. Воробель. Гербарні збори *S. carniolica* та рідкісних видів з досліджуваних місцезнаходжень передано до гербарію НБС імені М.М. Гришка НАН України (KWHN).

Результати і їх обговорення. Західна частина Подільської височини в адміністративному відношенні розміщена в межах Тернопільської області та, частково, на крайньому сході – Львівської. Умовно до регіону відноситься і понижена смуга по правому березі Дністра на крайньому півночі Івано-Франківської області. Всього для регіону дослідження наводиться 13 локалітетів *S. carniolica*:

Тернопільська область.

Борщівський район: м. Борщів [1]; околиці с. Монастирок (Більче-Золотецька сільрада) – ліс Більче (KW: Барбарич, Гринь, 1940);

Буцацький р-н, околиці с. Жизномир – урочище Монастирок [16, С.73];

Гусятинський район: околиці с. Копичинці (KWU: Любченко, 1989); околиці с. Волиця – Краснянське лісництво (територія природного заповідника (далі – ПЗ) "Медобори") [16, С.73]; околиці с. Личківці – квартал 35 Городницького лісництва, смуга завширшки 50 м по схилу над р. Збруч (територія ПЗ "Медобори") [13, С. 257; 16, С.73];

Заліщицький район: околиці м. Заліщики [1]; околиці с. Зелений Гай – Жежавський ботанічний заказник [9, С. 222; 10; 16, С.73];

Кременецький район: (для цієї території наводиться чимало місцезнаходжень *S. carniolica* із різним ступенем географічної прив'язки, та, очевидно, більшість їх

стосуються однієї великої і дуже інсуляризованої популяції *S. carniolica*) м. Кременець (LWS: Мондальський, Мриць, 1936); околиці с. Веселівка, ботанічний заказник загальнодержавного значення "Веселівський" – квартал 31 (виділ 39), квартали 32, 46, 45 (виділ 1, 2) Білокриницького лісництва (LUM: Маско 1936, 1937; LWS: Мондальський, 1936; Мриць, 1936;) [8; 9, С. 221; 17]; околиці с. Веселівка, гора Довга [2; 12; 18, С. 310]; гора Городисько [18, С. 310]; Чугалівська діброва [4]; гора Камінна, рів між селами Веселівка і Чугалі [2; 3]; околиці с. Великі Бережці – екологічна стежка "гора Божа" (урочище Божа гора), квартал 1 колишньої філії "Кременецькі гори" природного заповідника "Медобори" [8];

Шумський район: околиці с. Башківці – ботанічний заказник загальнодержавного значення "Довжоцький", квартал 64 Білокриницького лісництва [8; 9, С. 222; 16, С.73]; Волинське лісництво, квартал 88 [5; 16, С.73]. Усі місцезнаходження досліджуваного виду, наведені для території Кременецького і Шумського р-нів, знаходяться в межах Національного природного парку "Кременецькі гори";

Івано-Франківська область.

Тлумацький район: околиці с. Одаїв (за П.Д. Мельничуком, котрий, саме це місцезнаходження, очевидно, не зовсім вірно наводить для околиць с. Горигляди Монастирського району Тернопільської області) [7].

Крім того, без точної географічної прив'язки локалітет *S. carniolica* вказується для обширної території Національного природного парку "Дністровський каньйон" [11, С. 145 – 147; 14, С. 245; 15, С. 605]. Те ж саме стосується і природного заповідника "Медобори", для якого є гербарний збір без точної географічної прив'язки (KW: Зелінка, 1971). Також, крім вищеперелічених місцезнаходжень *S. carniolica*, ми виявили нове – в околицях с. Божиків Бережанського району Тернопільської області.

Отже, на сьогоднішній день на території Західної частини Подільської височини відомо 14 локалітетів досліджуваного виду. Більшість із них було виявлено за останні 50 рр. Так, О.Д. Віслюкіна у 1960 р. наводить лише 3 місцезнаходження *S. carniolica* для цього регіону [1]. На основі узагальнення хорологічних відомостей ми створили нову, уточнену карту поширення *S. carniolica* на заході Подільської височини (Рис. 1).

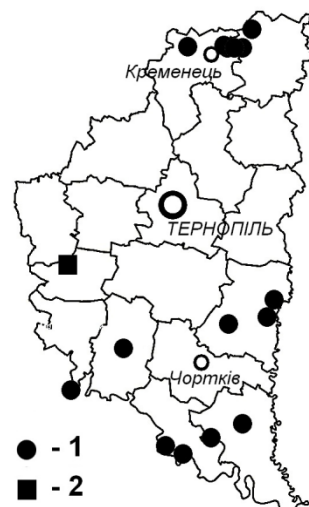


Рис.1. Поширення *Scopolia carniolica* у західній частині Подільської височини:
1 – відомі локалітети; 2 – новий локалітет

Як видно, *S. carniolica* поширений тут нерівномірно – вид зустрічається розсіяно у придністровській частині

регіону та у Кременецьких горах, в той час як у центральній частині Тернопільської області його локалітети відсутні. Це пов'язано насамперед із нерівномірним залісненням Подільської височини: будучи приуроченим до лісових ценозів, *S. carniolica* зустрічається лише у добре заліснених регіонах.

Місцезростання досліджуваного виду на заході Подільської височини приурочені до темних широколистяних, переважно букових і грабових, лісів. Відомості про умови місцезростань *S. carniolica* на Західному Поділлі не чисельні. У колективній праці [11, С. 145 – 147] вказується, що популяції досліджуваного виду у регіоні трапляються спорадично але відзначаються досить великою чисельністю. У межах популяцій особини розміщені нерівномірно, тяжіючи переважно до відслонень вапнякових порід. Чисельність пагонів може досягати 10 – 15 на m^2 але при цьому у загущених куртинах зменшується кількість плодів на одній рослині – до 5 –

10 шт. В.М. Черняк і Г.Б. Синиця вказують, що чисельність особин виду на заповідних територіях Тернопільської області стабільна, а локальні популяції нечисельні [16, С.73]. І.О. Скоропляс дослідила місцезнаходження *S. carniolica* на горі Довга. Автор описує наявність трьох локусів що складаються із 13 – 30 клонів, та характеризує лісорослинні умови місцезростань виду [12]. Синтаксономію угруповань лісової рослинності Медоборів з участю в них *S. carniolica* наводить В.А. Онищенко [19].

Ми дослідили популяції *S. carniolica* з нововиявленого місцезнаходження в околицях Божиківської сільради (Бережанський р-н) та в околицях с. Гориляди (Монастирський р-н) (на території Тлумацького р-ну Івано-Франківської області).

У Бережанському районі популяція *S. carniolica* виявлена у буковому лісі поруч хутора Раковець (Божиківська сільрада), розташованого між селами Литвинів і Мужилів Підгаєцького району (Рис. 2).

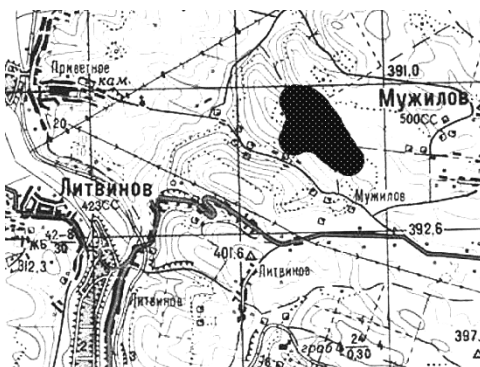


Рис. 2. Розміщення нововиявленої популяції *Scorpiola carniolica* в околицях с. Божиків

Окремі куртини і локуси тут розсіяно зустрічаються на площі близько 1 km^2 у грабово-буковому лісі, розміщеному на пересіченій місцевості. Координати центру популяції наступні: N 49°18'149"; E 25°03'484".

Умови місцезростань *S. carniolica* тут різняться залежно від складу деревостану та участі у ньому *Fagus sylvatica*, що безпосередньо впливає на ступінь сонячної інсоляції і структуру угруповання в цілому. Угруповання, у формуванні деревного ярусу яких окрім *Fagus sylvatica* приймають активну участь інші породи, вирізняються меншою зімкненістю крон дерев і більш розвиненими нижніми ярусами. Типова структура таких угруповань наступна. У деревостані (зімкненість крон 0,9) представлені *Fagus sylvatica* L. (повнота 4; вік 40 – 50 pp.) з участю *Tilia cordata* Mill. (повнота 3; вік 30 – 40 pp.), *Carpinus betulus* L. (повнота 2; вік 15 – 30 pp.) та поодинокими особинами інших деревних видів. Чагарниковий ярус сформований поодинокими і малорозвинутими особинами *Euonymus verrucosa* Scop.; розсіяний

підріст формують *Fagus sylvatica*, *Acer platanoides* L., *A. pseudoplatanus* L. У весняному аспекті травостою (проектне покриття 80%) крім *S. carniolica* представлені *Aegopodium podagraria* L. (до 10%), *Anemone ranunculoides* L., *Arum besserianum* Schott., *Asarum europaeum* L., *Carex sylvatica* Huds., *Corydalis cava* (L.) Schweigg. & Korte (до 20 %), *C. solida* (L.) Clairv. (до 20 %), *Gagea lutea* (L.) Ker-Gawl. (до 5 %), *Galanthus nivalis* L., *Hepatica nobilis* Mill., *Lamium galeobdolon* (L.) L., *Aposeris foetida* (L.) Less., *Oxalis acetosella* L., *Polygonatum multiflorum* (L.) All., *Paris quadrifolia* L., *Ranunculus lanuginosus* L., *Stellaria holostea* L.

Куртини (клони) *S. carniolica* на таких ділянках мають площу 5 – 10 m^2 . В середньому на 1 m^2 у їх складі відмічено 20,7 пагонів, із яких 2,6 – умовно-іматурні, 7,4 – умовно-віргінільні і 10,7 – генеративні. Серед останніх відмічено 63,4% – одноквіткових, 28,2% – двоквіткових, 8,4% – триквіткових.

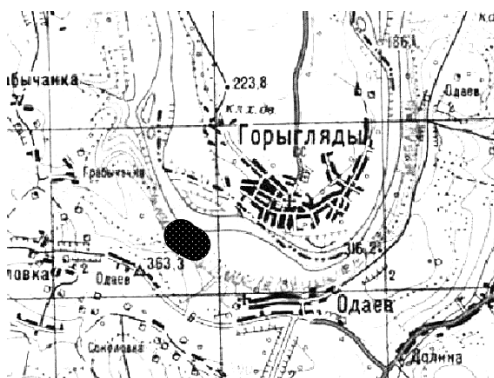


Рис. 3. Розміщення популяції *Scorpiola carniolica* в околицях с. Гориляди

Дещо інші умови місцезростань *S. carniolica* відмічені на ділянках, рослинний покрив яких представлено угрупованнями з домінуванням *Fagus sylvatica* у деревостані (повнота 9) із незначною участю *Acer platanoides* та *A. pseudoplatanus*. Такі ділянки більш затінені (зімкненість крон 0,9 – 1), а чагарниковий ярус на них практично відсутній (за винятком поодиноких молодих особин *Viburnum opulus* L.). Зустрічається розсіяний підріст *Fagus sylvatica* з участю *Acer platanoides*, *A. pseudoplatanus* і *Ulmus* sp. У весняному аспекті травостою (проективне покриття 80%) крім *S. carniolica* відмічено *Aegopodium podagraria* (співдомінант), *Anemone ranunculoides*, *Asarum europaeum* (до 25 %), *Arum besserianum*, *Corydalis cava* (до 25 %), *C. Solida* (до 25 %), *Dryopteris filix-mas* (L.) Schott, *Gagea lutea*, *Galanthus nivalis*, *Galium odoratum* (L.) Scop., *Hepatica nobilis*, *Lamium galeobdolon*, *Lathyrus vernus* (L.) Bernh., *Oxalis acetosella*, *Polygonatum multiflorum*, *Paris quadrifolia*, *Ranunculus lanuginosus*, *Stellaria holostea*, *Viola reichenbachiana* Jord. ex Boreau.

Куртини *S. carniolica* на таких ділянках займають площу по кілька десятків м². Так, одна з куртин мала розміри 6 × 10 м. У її складі на 1 м² відмічено в середньому 22,5 пагонів, із яких 3,3 – умовно-іматурні, 7,9 – умовно-віргінільні та 11,3 – генеративні. Серед останніх 10,6% – одноквіткові, 35,8% – триквіткові, 33,2% – чотиріквіткові і по 10,2% – п'яти- і шестиквіткові. В іншій куртині розміром 4 × 9 м на 1 м² відмічено в середньому 26,4 пагони, з яких 1,1 – умовно-іматурні, 18,4 – умовно-віргінільні і 6,9 – генеративні. Серед останніх відмічено 83,7% – одноквіткових, 14,4% – двоквіткових та 1,9% – триквіткових. Загалом, популяційна щільність *S. carniolica* на більш затінених ділянках помітно вища.

Отже, виявлене місцезростання *S. carniolica* в Бережанському районі приурочене до нейтрофільних букових угруповань союзу *Asperulo-Fagion* Tüxen 1955. Популяція досліджуваного виду тут порівняно велика, чисельна, зріла і стабільна. Її стан не викликає занепокоєння але в майбутньому даний локалітет варто заповідати з метою покращення охорони виду у рівнинній частині ареалу. Відмітимо і той факт, що місцеве населення іноді вирощує *S. carniolica* на квітниках.

Ще одне місцезнаходження *S. carniolica* ми дослідили в околицях с. Горигляди, (Монастирський район). Він знаходиться на протилежному від цього населеного пункту березі Дністра і адміністративно перебуває на території Тлумацького району Івано-Франківської області (найближчий населений пункт цього району – с. Одаїв) (Рис. 3). Проте, за фізико-географічним районуванням ця місцевість тяжіє саме до Подільської височини, а не до Прикарпаття. Координати локалітету: N 48°51'79"; E 25°08'58".

Місцезростання *S. carniolica* тут приурочене до обривистого залісненого наддністрянського схилу (ухил 10 – 40° північної експозиції), пересіченого струмками, улоговинами і відслоненнями вапняків. Ми простежили популяцію виду на площі біля 5 га вздовж берега Дністра. Деревостан ділянки (зімкненість крон 0,8 – 0,9) сформований (по 3) *Carpinus betulus*, *Tilia cordata* і *Ulmus glabra* Huds. з участю *Acer platanoides* (до 1). Чагарниковий ярус на окремих ділянках добре виражений і сформований різновіковими особинами *Corylus avellana* L., *Euonymus verrucosa* і *Staphylea pinnata* L. Розсіяний молодий підріст формує *Acer pseudoplatanus*.

У весняному аспекті трав'яного покриву ділянки (проективне покриття 80 – 90%) представлені наступні

види: *Aegopodium podagraria* L. (до 25%), *Allium ursinum* L. (до 20%), *Alliaria petiolata* (M. Bieb.) Cavara & Grande, *Aposeris foetida* (L.) Less, *Asarum europaeum*, *Asplenium trichomanes* L., *Corydalis solida*, *Cystopteris fragilis* (L.) Bernh., *Chrysosplenium alternifolium* L., *Dentaria glandulosa* Waldst. & Kit., *Dryopteris filix-mas*, *Ficaria verna* Huds., *Galanthus nivalis* L., *Galium aparine* L., *G. odoratum*, *Helleborus purpurascens* Waldst. et Kit., *Lamium galeobdolon* (L.) Ehrend. & Polatschek, *L. maculatum* L., *Lilium martagon* L., *Lunaria rediviva* L., *Oxalis acetosella*, *Paris quadrifolia*, *Phyllitis scolopendrium* (L.), *Polypodium vulgare* L., *Pulmonaria obscura* Dumort. (до 15%), *Polygonatum multiflorum*, *Ranunculus lanuginosus* тощо. У синтаксономії лісової рослинності описане угруповання належить до союзу *Carpinion betuli* Issler 1931.

Загальна популяційна щільність *S. carniolica* тут порівняно невисока, особини виду зростають у складі невеликих але густих куртин площею 1 – 3 м². У віковій структурі представлені лише умовно-віргінільні та генеративні пагони – в середньому на 1 м² припадає відповідно 4,1 і 31,9 їх. Серед генеративних пагонів представлено в середньому 13,8% – одноквіткових, 16,3% – двоквіткових, 16,9% – триквіткових, 18,2% – чотиріквіткових, 22,3% – п'ятиквіткових, 3,5% – шестиквіткових і 9,0% – семиквіткових. Дану популяцію ми відносимо до малочисельних і стабільних. Враховуючи наявність у рослинному покриві описаної ділянки рідкісних видів, її необхідно взяти під охорону.

В ході експедиційного дослідження ми, також, відвідали територію Жежаського ботанічного заказника (Заліщицький район), територія якого охоплює лісовий масив на лівому березі Дністра. На території заказника представлено широкий комплекс флорокомплексів: лісовий, лучно-степовий, болотний – у складі яких наводяться ряд видів із Червоної книги України: *Dictamnus albus* L., *Galanthus nivalis*, *Pulsatilla grandis* Wender., *P. pratensis* (L.) Mill., *Staphylea pinnata* L. тощо, а серед них – і *S. carniolica*. Проте в ході польового обстеження території заказника нам не вдалося виявити популяцію останнього виду, тож для її підтвердження необхідні подальші польові дослідження.

Отже, умови місцезростання *S. carniolica* досліджених нами популяцій є типовими для Західного Поділля – вид приурочений до тіннистих угруповань зі складу союзу *Asperulo-Fagion* та *Carpinion betuli* із домінуванням у деревостані *Carpinus betulus*, *Fagus sylvatica*, *Tilia cordata* за участю деяких інших деревних порід. У формуванні рослинного покриву таких лісів значну участь приймають середньоєвропейські і неморальні тіньовитривалі мезофітні види, серед яких – досліджуваний. Велика частина таких видів перебувають в Україні на східній межі ареалу, що обумовлює потребу в їх охороні. Відмітимо, що загалом локалітети *S. carniolica* на заході Подільської височини порівняно добре інтегровані у заповідну мережу.

Щодо структури популяцій, *S. carniolica* відноситься до вегетативно-рухомих видів, дослідження яких вимагає специфічного підходу. За основу ми використовували щільність надземної пагонової системи даного виду і частку у ній пагонів різного типу. Їх співвідношення залежить від умов зростання і значною мірою характеризує стан популяції. Результати досліджень пагонової структури вищеописаних популяцій *S. carniolica* представлено у таблиці.

Таблиця 1. Спектри пагонової структури досліджених популяцій *S. carniolica*

Локалітет, тип деревостану	Пагони, %		
	умовно-іматурні	умовно-віргінільні	генеративні
околиці с. Божиків <i>Fagus sylvatica</i> (4)+ <i>Tilia cordata</i> (3)+ <i>Carpinus betulus</i> (2)	12,6	35,7	51,7
<i>Fagus sylvatica</i> (9)	9,5	51,9	38,6
разом	11,2	44,3	44,5
околиці с. Гориляди <i>Carpinus betulus</i> (3)+ <i>Tilia cordata</i> (3)+ <i>Ulmus glabra</i> (3)	0	11,4	88,6

Як видно, у великій і щільній популяції *S. carniolica* з околиць с. Божиків у пагоновій структурі загалом переважають прогенеративні пагони, причому, на більш освітлених ділянках їх частка зменшується і навпаки – на більш затінених. У даній популяції через її значну загущеність спостерігається порівняно низька частка генеративних пагонів, що збігається з дослідженнями інших авторів [11]. Практично, у межах цієї популяції склалися оптимальні умови для швидкого розростання клонів *S. carniolica*, що призводить до збільшення вегетативної маси. Така популяція відноситься до умовно лівосторонніх та несправжньо-молодих. В той же час, у пагоновій структурі розрідженої популяції з околиць с. Гориляди частка генеративних пагонів дуже висока. Така популяція відноситься до умовно правосторонніх та зрілих.

Таким чином, ми доповнили і уточнили хорологічні відомості про *S. carniolica* на заході Подільської височини. В ході польових досліджень вивчено ценотичні особливості місцезростань досліджуваного виду і стан та структуру його популяцій у двох локалітетах. Результати досліджень загалом підтверджують існуючі відомості і суттєво доповнюють їх.

Список використаних джерел

- Вісюліна О.Д. *Scopolia* Jacq. / О.Д. Вісюліна // Флора УРСР. – К.: Вид-во АН УРСР, 1960. – Т. 9. – С. 378 – 380.
- Глінська С.О. Поширення реліктових рослин на Кременецьких горах / С.О. Глінська // Актуальні проблеми гуманітарної освіти: збірник наук. праць. – Кременець, 2006. – Вип. 2. – С. 94 – 98.
- Глінська С.О. Рідкісні види Кременецького горбогір'я з регресивними змінами ареалів / С.О. Глінська, А.С. Оніщук // Навколишнє середовище і здоров'я людини: матеріали міжн. конф. – Кам'янець-Подільський, 2008. – С. 175 – 177.
- Заверуха Б.В. Реліктові і ендемічні рослини Кременецьких гір та необхідність їх охорони / Б.В. Заверуха // Охороняйте рідну природу. – К.: Урожай, 1964. – С. 69 – 78.
- Мельник В.І. Рідкісні лісові угруповання Кременецьких гір / В.І. Мельник, М. І. Парубок, С.О. Глінська // Інтродукція рослин. – № 2. – Київ, 2006. – С. 26 – 31.
- Мельник В.І. Редкие виды флоры равнинных лесов Украины / В.І. Мельник. – Киев: Фитосицицентр, 2000. – 212 с.

7. Мельничук П.Д. Морфолого-анатомическое строение корневика и корней Скополии карниольской / П.Д. Мельничук // Труды Ленинградского химико-фармацевтического института Министерства здравоохранения РСФСР. Вопросы фармакогнозии. – Ленинград, 1961. – Т. XII. – С. 55 – 58.

8. Наукове обґрунтування створення Національного природного парку "Кременецькі гори". Київський національний університет імені Тараса Шевченка. Кафедра економічної та соціальної географії. НДЛ "Регіональні проблеми економіки і політики" [Електронний ресурс]. – Київ, 2005. <http://www.geo.univ.kiev.ua/scientific-information-3.html>.

9. Природно-заповідний фонд України: території та об'єкти загальнодержавного значення / за ред. К.М. Ситника. – К.: Центр екологічної освіти та інформації, 2009. – 332 с.

10. П'ятківський І. Жежавський ботанічний заказник / І. П'ятківський // Тернопільський енциклопедичний словник. Т.1. А–Й. – Тернопіль: Збруч, 2004. – С. 571–572.

11. Раритетний фітогенотип західних регіонів України (созологічна оцінка й наукові засади охорони) / С.М. Стойко, П.Т. Яценко, О.О. Кагалю та ін. – Львів: Ліра-Прес, 2004. – 232 с.

12. Скороплюс І. О. Поширення рідкісних та зникаючих видів рослин на горі Довга (Кременецькі гори) // І. О. Скороплюс. – Природно-заповідний фонд України – минуле, сьогодення, майбутнє: матеріали міжн. наук.-практ. конф., присвяч. 20-річчю природ. заповідника "Медобори", (26–28 трав. 2010 р., смт. Гримайлів). – Тернопіль, 2010. – С. 537 – 539.

13. Фіторізноманіття заповідників і національних природних парків України. Ч.1. Біосферні заповідники. Природні заповідники / Під ред. В.А. Онищенко і Т.Л. Андрієнко. – Київ: Фітосоціоцентр, 2012. – 406 с.

14. Фіторізноманіття заповідників і національних природних парків України. Ч.2. Національні природні парки / Під ред. В.А. Онищенко і Т.Л. Андрієнко. – Київ: Фітосоціоцентр, 2012. – 580 с.

15. Червона книга України. Рослинний світ / за ред. Я.П. Дідуха. – К.: Глобалконсалтинг, 2009. – 900 с.

16. Черняк В.М. Рідкісні та зникаючі рослини Тернопільщини з Червоної книги України / В.М. Черняк, Г.Б. Синиця. – Тернопіль: Навчальна книга – Богдан, 2008. – 224 с.

17. Шиманська В.О. Заповідні ділянки-місця охорони і відтворення ресурсів лікарських рослин на Тернопільщині / В.О. Шиманська, С.В. Зелінка, М.М. Бригінець // Охорона природи та раціональне використання природних ресурсів у Зх. обл. УРСР: тези доп. міжобл. конф. – Львів, 1974. – С. 136 – 138.

18. Motyka J. Rozmieszczenie i ecologia roślin naszyniowych na polnocnej krawedzi zachodniego Podola / J. Motyka. – Lublin, 1947. – 400 p.

19. Onyshchenko V.A. Forests of order Fagitalia sylvaticae in Ukraine / ed.: S.L. Mosyakin. – Kyiv: Alterpress, 2009. – 212 p.

Надійшла до редколегії 23.01.14

А. Шиндер, канд. биол. наук, Ю. Неграш, асп.
Національний ботанічний сад імені Н.Н. Гришка НАН України Київ

SCOPOLIA CARNIOLICA Jacq. (SOLANACEAE) НА ЗАПАДЕ ПОДОЛЬСКОЙ ВОЗВЫШЕННОСТИ: РАСПРОСТРАНЕНИЕ, УСЛОВИЯ МЕСТООБИТАНИЙ И СОСТОЯНИЕ ПОПУЛЯЦИЙ

Представлены результаты изучения особенностей распространения, ценотических условий местобитаний и состояния популяций редкого вида флоры Украины – *Scopolia carniolica* – на западе Подольской возвышенности. Выявлено и описано новое местонахождение изучаемого вида.

Ключевые слова: *Scopolia carniolica*, Западная Подолия, местобитание, хорология, популяции.

O. Shynder, Ph.D., J. Nehrash, graduate student
M.M. Gryshko National Botanical Garden, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

SCOPOLIA CARNIOLICA Jacq. (SOLANACEAE) IN THE WESTERN PART OF PODOLSK UPLAND: DISTRIBUTION, CONDITIONS HABITATS AND POPULATION STATUS

The results of the study of distribution in the western part of Podolsk Upland *Scopolia carniolica*, a rare species of flora Ukraine, are presented. The coenotic terms and condition of habitats populations are described. The new localities of this species were found and investigated.

Keywords: *Scopolia carniolica*, Podolsk Upland, habitat, chorology, populations.

УДК 577.359/57.053:57.042:57.041

М. Мельник, асп., В. Мартинюк, д-р біол. наук, О. Артеменко, канд. біол. наук
КНУ імені Тараса Шевченка, Київ

ВПЛИВ СЛАБКИХ НАДНИЗЬКОЧАСТОТНИХ ЕЛЕКТРОМАГНІТНИХ ПОЛІВ НА СИНТЕЗ NO В ГЛАДЕНЬКОМ'ЯЗОВИХ КЛІТИНАХ

Досліджено дію наднизькочастотного електромагнітного поля 8 Гц 25 мкТл на синтез NO в гладеньком'язових клітинах шлунку щурів під час їх стимуляції K⁺-деполяризацією. Показана відсутність впливу електромагнітного поля 50 Гц 25 мкТл на синтез NO в стимульованих K⁺-деполяризацією клітинах, та в клітинах у стані спокою. Показано відсутність впливу електромагнітного поля 8 Гц 25 мкТл на рівень NO в клітинах у стані спокою і активацію синтезу NO при збудженні гладеньком'язових клітин гіперкалієвим розчином. Факт активуючої дії електромагнітного поля 8 Гц 25 мкТл на продукцію NO дозволяє пояснити раніше встановлений феномен пригнічення K⁺-індукованого скорочення гладеньких м'язів.

Ключові слова: електромагнітне поле, синтез NO, гладеньком'язові клітини.

Вступ. Гладенькі м'язи являють собою невід'ємну структурну та функціональну частину нашого організму. Регуляція їх активності відповідає за тонус кровоносних судин, за перистальтику та скоротливу діяльність травного тракту, за скорочення сечового міхура, матки та проток сечостатевої системи. Для здійснення цієї регуляції необхідні певні агенти, що проникаючи крізь клітинну мембрану, або приєднуючись до відповідних рецепторів, викликають каскади сигнальних шляхів, які, в свою чергу, впливають на скоротливі білки і викликають або скорочення, або розслаблення гладеньком'язових клітин (ГМК). Одним із фізіологічно важливих факторів розслаблення гладеньких м'язів є монооксид азоту (NO). Роль цієї молекули та її сигнальні шляхи є на сьогодні відомими. За синтез NO відповідають NO-синтази (NOS) [8]. В залежності від місця та функцій розрізняють три типи NOS: ендотеліальна NOS (eNOS), нейрональна NOS (nNOS) та індукцйбельна (iNOS), що активується у відповідь на запальні процеси та знаходиться в більшій степені в імунних клітинах. Окрім цього відомо, що NO може синтезуватись й іншими клітинами, зокрема ГМК [2, 8]. При цьому, eNOS та nNOS являються Ca²⁺- та кальмодулін-залежними, а iNOS – незалежними від них.

Останнім часом не зменшується інтерес щодо впливу електромагнітних полів різних частотних діапазонів на біологічні процеси. На цей час існує великий масив даних, який свідчить про біологічну дію слабких наднизькочастотних електромагнітних полів (ННЧ ЕМП) [6]. В попередній роботі [14] було показано, що слабкі ННЧ ЕМП можуть змінювати концентрацію внутрішньоклітинного кальцію в ГМК шлунку щурів. Але, наразі, механізм впливу ЕМП на ГМК залишається не відомим. Останнім часом з'являються дані, які показують збільшення рівня синтезу NO в різних клітинах внаслідок дії ННЧ ЕМП на NOS. Зокрема, показано, що дія ЕМП частотою 50 Гц та індукцією 1 мТл збільшувала синтез NO в ендотеліальних клітинах пупочної вени людини [7]. Також було продемонстровано, що ННЧ ЕМП частотою 60 Гц, 2 мТл активувало nNOS мозку щурів та, відповідно, збільшувало синтез NO [1]. Інші дослідження показали, що ННЧ ЕМП збільшували експресію eNOS та iNOS в людських кератиноцитах лінії HaCaT [9]. Крім того було показано, що ННЧ ЕМП (60 Гц, 0,1 мТл) викликали підвищення активності NOS в печінці щурів [12]. Окрім цього у попередніх дослідженнях показано, що ННЧ ЕМП пригнічують амплітуду скорочення гладенького м'язу травного тракту, викликаного K⁺-деполяризацією ГМК [15]. Через це ціка-

вим є питання про можливість ННЧ ЕМП впливати на синтез NO в ГМК.

Отже, враховуючи вище зазначене **метою роботи** було з'ясування особливостей впливу ННЧ ЕМП різних частот на рівень синтезу NO в ГМК шлунку щурів у стані спокою та при стимуляції гіпертонічним розчином хлориду калію (80 mM KCl).

Матеріали і методи. В експериментах використовувались нелінійні білі щури. Тварини утримувались в стандартних умовах віварію ННЦ "Інститут біології" Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Для експерименту брали тварин вагою близько 250 г. Щурів швидко декапітували та вилучали шлунок для подальших досліджень. Вся робота проводилась відповідно до конвенції Ради Європи щодо захисту хребетних тварин, яких використовують у наукових цілях.

Шлунок розтинали по великій кривизні, промивали в розчині нормального Кребсу та відчищали від сполучних тканин. Відчищену гладеньком'язову тканину звільняли від залишків розчину Кребса за допомогою фільтрувального паперу та зважували. В розчині Кребсу тканину нарізали на дрібні шматочки розміром близько 2x2 мм. Потім поміщали їх в бюкс з 5 мл розчину Кребса з додаванням L-аргініну (1,74 мг на 1 мл розчину) та залишали на 30 хв.

Вимірювання концентрації NO проводили з використанням реактиву Грісса. За основу було взято метод спектрофотометричного визначення рівня метаболітів NO в біологічних зразках [13]. Розчин реактиву Грісса готували розчиненням сухого реактиву Грісса в співвідношенні 1:1 у 12% оцтовій кислоті. Для визначення концентрації NO вміст бюксу зі зразками тканини обережно перемішували піпеткою з оплавленим кінчиком і потім давали випасти шматочкам тканини в осад. Відбирали 1,5 мл надосадного розчину в кювету та додавали до нього 1,5 мл розчину реактиву Грісса. Розчини перемішували та залишали на 12 хв в темряві. Після цього інтенсивність кольору розчинів вимірювали на спектрофотометрі СФ-46 на довжині хвилі 540 нм. Спектрофотометричним контролем був розчин реактиву Грісса змішаний з водою у співвідношенні 1:1. Отримані дані оптичної густини D перераховували у концентрацію NO (М/л) шляхом лінеаризації за попередньо отриманою калібрувальною кривою з використанням KNO₂ (рис. 1). Калібрувальна крива мала класичний S-подібний вигляд. У подальшому значення концентрації NO нормували на масу тканини шлунку експериментальної тварини (NO, М/(л*г тканини)).

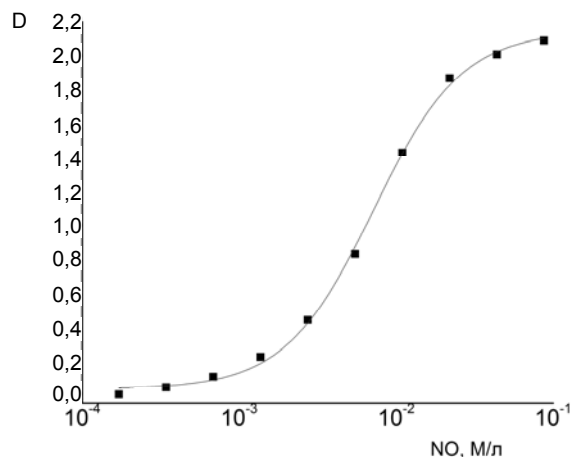


Рис. 1. Калібрувальна крива для визначення концентрації NO

Для вимірювання концентрації NO під час гіперкалієвої деполяризації в бюкс зі зразками тканини додавали розчин 80 мМ KCl та залишали так на 15 хв. Потім, за зазначеною вище схемою, відбирали 1,5 мл розчину з бюксу та проводили спектрофотометричне вимірювання.

Електромагнітне поле наднизьких частот генерували за допомогою котушок Гельмгольца та генератора Г6-28. Вектор індукції електромагнітного поля, що створювалось кільцями Гельмгольца, був паралельним вертикальній компоненті геомагнітного поля. Бюкси зі зразками м'язової тканини піддавали впливу імпульсного електромагнітного поля частотою 8 або 50 Гц з індукцією 25 мкТл. Час експозиції складав 15 хв. Далі, проводили спектрофотометричний аналіз за зазначеною ви-

ще схемою. Вибір частот 8 і 50 Гц був обумовлений їх біологічною активністю [6], в тому числі і по відношенню до гладеньких м'язів [14, 15].

Статистичну обробку результатів здійснювали загальноприйнятим методом дисперсійного аналізу ANOVA [16].

Результати та їх обговорення. На рисунку 2 наведено результати дослідження впливу електромагнітного поля різних частот і гіперкалієвого розчину та комбінації цих факторів на продукцію NO гладеньком'язовою тканиною шлунку щурів. Як видно, вплив електромагнітного поля як частотою 8 Гц, так і 50 Гц практично не впливав на утворення NO в гладеньких м'язах, які знаходились у стані спокою (рис. 2А і 2Б).

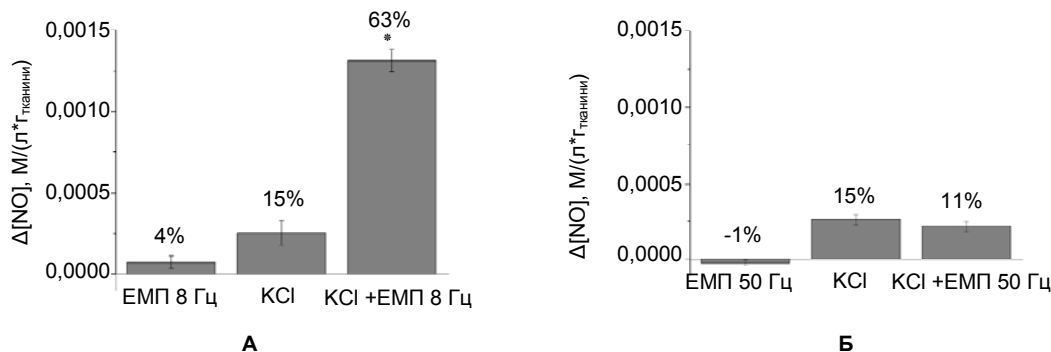


Рис. 2. Зміна концентрації NO в ГМК під дією ЕМП з частотою 8 Гц (А) і 50 Гц (Б) при аплікації 80 мМ KCl та при комбінованій дії ЕМП й 80 мМ KCl у порівнянні з контролем

Примітки: за "0" прийнято контрольні значення; * – $P < 0,05$ порівняно з контролем.

Збудження гладеньком'язових клітин гіперкалієвим розчином не призводило до достовірних змін продукції NO, але спостерігалась певна тенденція до зростання його концентрації, що відтворювалось у повторних дослідженнях (рис. 2). Наявність цієї тенденції скоріше за все свідчить про слабку стимуляцію синтезу NO при гіперкалієвій деполяризації гладеньком'язових клітин, але зміни продукції NO за короткий час інкубації в нашому експерименті були малими і знаходились на межі чутливості експерименту. Щодо вказаної тенденції варто відмітити, що активацію синтезу NO при збудженні гладеньком'язових клітин спостерігали різні дослідники, при чому стимуляцію викликали різними чинниками – естрогеном [10], АТФ [10], активацією Ca^{2+} -залежних K^{+} -каналів малої та середньої провідності (SK_{Ca} - та IK_{Ca} -канали, відповідно) [11].

Під час K^{+} -деполяризації активуються потенціал керувані натрієві та кальцієві канали. Відкриття кальцієвих каналів призводить до стрімкого збільшення внут-

рішньоклітинної концентрації кальцію. Окрім того, збільшення концентрації кальцію внаслідок активації потенціал керуванних кальцієвих каналів викликає цілий каскад регуляторних реакцій. Паралельно запускається механізм кальцій-індукованого вивільнення кальцію із саркоплазматичного ретикулу. Все це у свою чергу призводить до ініціації скорочення ГМК та активації продукції NO, що є одним з механізмів обмеження скорочення і подальшої релаксації ГМК [5, 8].

Вплив імпульсного електромагнітного поля частотою 8 Гц 25 мкТл достовірно на 64% порівняно з контролем підвищував продукцію NO в гладеньких м'язах, які були стимульовані додаванням гіперкалієвого розчину (рис. 2А). На цей час добре відомо, що NO пригнічує скоротливу активність гладеньких м'язів [8]. Таким чином, отримані в даній роботі результати в цілому збігаються з раніше проведеними тензометричними дослідженнями на гладеньком'язових смужках сліпої киш-

ки щурів, в яких показано пригнічуючу дію електромагнітного поля частотою 8 Гц 25 мТл на індуковані ацетилхоліном і гіперкалієвим розчином скорочення гладеньких м'язів [15]. Наведені факти свідчать про залучення NO-залежних шляхів регуляції в клітинних механізмах дії електромагнітних полів. NO є одним з головних факторів вазодилатації, ця сигнальна молекула також відіграє роль агента релаксації в ГМК травного тракту. Відомо, що NO синтезується ферментами NOS [2, 8]. Мала молекула монооксиду азоту здатна легко проникати крізь мембрану клітин. NO вважається ідеальною релаксуючою сигнальною молекулою, оскільки викликає швидке розслаблення гладеньких м'язів, бо проникає крізь мембрану не потребуючи спеціальних переносників чи мембранних рецепторів. Після проникнення в клітину, монооксид азоту активує гуанілатциклазу, яка синтезує цГМФ із ГТФ. Збільшення рівня цГМФ активує, в свою чергу, протеїнкіназу G, яка відкриває Ca^{2+} -залежні K^{+} -канали великої провідності (BK_{Ca} -канали). Падіння концентрації внутрішньоклітинного кальцію призводить до інактивації кінази легких ланцюгів міозину, що згодом призводить до розслаблення ГМК [2]. З іншого боку, результати досліджень окремих дослідницьких груп, отримані на моделях гранулярних клітин мозочка щурів, свідчать про активуючий вплив низькочастотних магнітних полів (50 Гц, 1 мТл) на потенціал керовані натрієві канали [4]. Цей вплив дослідники пов'язують з системою синтезу простагландинів E_2 , в якій чутливою ланкою скоріше за все є циклооксигенази-2. А експресія цих ферментів, як було показано, запущується активними формами кисню [3].

У дослідженнях впливу електромагнітного поля частотою 50 Гц 25 мТл достовірних змін у продукції NO не виявлено (рис. 2Б). Виходячи з теоретичних уявлень про механізми дії NO, можна очікувати стимулюючу дію електромагнітного впливу на частоті 50 Гц на скорочення гладеньких м'язів, що варто експериментально верифікувати у подальших дослідженнях.

Висновки. Отримані результати показують, що ННЧ ЕМП частотою 8 і 50 Гц 25 мТл не впливають на продукцію NO в гладеньких м'язах, що знаходяться у стані спокою. Дія ННЧ ЕМП частотою 8 Гц при K^{+} -деполяризації ГМК викликає достовірне збільшення синтезу NO, тоді як ЕМП частотою 50 Гц не є ефективною, що свідчить про наявність вираженої частотної залежності біологічної ефективності ЕМП. Факт підвищення продукції NO при K^{+} -деполяризації ГМК свідчить про залученість NO-залежних шляхів внутрішньоклітин-

ної регуляції в механізмах біологічної дії електромагнітних полів наднизької частоти на гладенькі м'язи.

Список використаних джерел

1. S. I. Cho, Y. S. Nam, L. Y. Chu, and other. Extremely low-frequency magnetic fields modulate nitric oxide signaling in rat brain // Bioelectromagnetics. – October 2012. – Vol. 33, Issue 7. – P. 568–574.
2. R. K. Dubey, D. G. Gillespie and E. K. Jackson. Cyclic AMP-Adenosine Pathway Induces Nitric Oxide Synthesis in Aortic Smooth Muscle Cells // Hypertension. – 1998. – № 31. – P. 296–302.
3. Feng L., Xia Y., Garcia G.E., Hwang D., Wilson C.B. Involvement of reactive oxygen intermediates in cyclooxygenase-2 expression induced by interleukin-1, tumor necrosis factor- α , and lipopolysaccharide // J Clin Invest. – 1995, Apr. – Vol. 95, № 4. – P. 1669–75.
4. He Y.-L., Liu D.-D., Fang Y.-J., Zhan X.-Q., Yao J.-J., Mei Y.-A. Exposure to Extremely Low-Frequency Electromagnetic Fields Modulates Na^{+} Currents in Rat Cerebellar Granule Cells through Increase of A A/PGE_2 and EP Receptor-Mediated cAMP/PKA Pathway // PLOS ONE. – January 2013. – Vol. 8, Issue 1. – P. 1–13.
5. Karaki H., Ozaki H., Hori M., and other. Calcium Movements, Distribution, and Functions in Smooth Muscle // Pharmacological Reviews. – 1997. – Vol. 49, № 2.
6. V. S. Martynyuk, Yu. V. Tseysslyer, N. A. Temuryants. Interference of the mechanisms of influence that weak extremely low frequency electromagnetic fields have on the human body and animals // Izvestiya, Atmospheric and Oceanic Physics. – 2012. – Vol. 48, № 8. – P. 832–846.
7. H. Miyata, K. Ishizawa, M. Ishido, K. Sugawara, M. Murase and T. Hondou. The effect of a 50-Hz sinusoidal magnetic field on nitric oxide (NO) production by human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) // Journal of Physics: Conference Series. – 2012. – № 344. – P. 1–9.
8. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells // FASEB J. – 1992. – № 6. – P. 3051–3064.
9. A. Patruno, P. Amerio, M. Pesce, and other. Extremely low frequency electromagnetic fields modulate expression of inducible nitric oxide synthase, endothelial nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in the human keratinocyte cell line HaCat: potential therapeutic effects in wound healing // British Journal of Dermatology. – February 2010. – Vol. 162, Issue 2. – P. 258–266.
10. Sheng J.Z., Arshad F., Braun J.E., Braun A.P. Estrogen and the Ca^{2+} -mobilizing agonist ATP evoke acute NO synthesis via distinct pathways in an individual human vascular endothelium-derived cell // Am J Physiol Cell Physiol. – 2008, Jun. – Vol. 294, № 6. – P. 1531–41.
11. Sheng J.Z., Braun A.P. Small- and intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels directly control agonist-evoked nitric oxide synthesis in human vascular endothelial cells // Am J Physiol Cell Physiol. – 2007, Jul. – Vol. 293, № 1. – P. 458–67.
12. T. Yoshikawa, M. Tanigawa, T. Tanigawa, and other. Enhancement of nitric oxide generation by low frequency electromagnetic field // Pathophysiology. – July 2000. – Vol. 7, Issue 2. – P. 131–135.
13. Мажитова М.В. Спектрофотометрическое определение уровня метаболитов монооксида азота в плазме крови и ткани мозга белых крыс // Современные проблемы науки и образования. – 2011. – № 3.
14. Мельник М.І., Артеменко О.Ю., Мартинюк В.С. Вплив слабких низькочастотних електромагнітних полів на внутрішньоклітинну концентрацію кальцію гладеньком'язових клітин // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського, Серія "Біологія, хімія". – 2013. – Том 26 (65), № 2. – С. 123–132.
15. Цимбалюк О.В., Мартинюк В.С. Влияние магнитного поля крайне низкой частоты на вызванную K^{+} -деполяризацией и ацетилхолином сократительную активность интестинальных гладких мышц // Фізика живого. – 2011. – № 1. – С. 20–24.
16. Шеффе Г. Дисперсионный анализ, пер. с англ. – М., 1963.

Надійшла до редколегії 16.01.14

М. Мельник, асп., В. Мартинюк, д-р биол. наук, А. Артеменко, канд. биол. наук
КНУ імені Тараса Шевченка, Київ

ВЛИЯНИЕ СЛАБЫХ СВЕРХНИЗКОЧАСТОТНЫХ ЭЛЕКТРОМАГНИТНЫХ ПОЛЕЙ НА СИНТЕЗ NO В ГЛАДКОМЫШЕЧНЫХ КЛЕТКАХ

Исследовано действие сверхнизкочастотного электромагнитного поля 8 Гц 25 мТл на синтез NO в гладкомышечных клетках желудка крыс при их стимуляции K^{+} -деполяризацией. Показано отсутствие влияния электромагнитного поля 50 Гц 25 мТл на синтез NO в стимулированных K^{+} -деполяризацией клетках, и в клетках в состоянии покоя. Показано отсутствие влияния электромагнитного поля 8 Гц 25 мТл на уровень NO в клетках в состоянии покоя и активацию синтеза NO при возбуждении гладкомышечных клеток гиперкаліевым раствором. Факт активирующего воздействия электромагнитного поля 8 Гц 25 мТл на продукцию NO позволяет объяснить ранее установленный феномен подавления K^{+} -индуцированного сокращения гладких мышц.

Ключевые слова: электромагнитное поле, синтез NO, гладкомышечные клетки.

M. Melnyk, PhD stud., V. Martynyuk, DSc, O. Artemenko, PhD
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv

THE INFLUENCE OF WEAK EXTREMELY LOW-FREQUENCY ELECTROMAGNETIC FIELDS ON NO SYNTHESIS OF SMOOTH MUSCLE CELLS

Effect of extremely low-frequency electromagnetic field 8 Hz 25 μT on NO synthesis in smooth muscle cells of a rats' stomach upon K^{+} -depolarization was discovered. It was shown that electromagnetic field 50 Hz 25 μT doesn't influence on NO synthesis in smooth muscle cells during K^{+} -depolarization and in unstimulated cells. It was demonstrated that electromagnetic field 8 Hz 25 μT doesn't influence on NO level in unstimulated cells, but activate NO synthesis during high potassium induced excitation of the cells. The activating effect of electromagnetic field 8 Hz 25 μT on NO production can explain the previously established inhibition phenomenon of K^{+} -induced contraction of smooth muscles.

Key words: electromagnetic field, NO synthesis, smooth muscle cells.

УДК 57.024+591.512.16+612.821.44+615.31

О. Бондаренко, асп.
КНУ імені Тараса Шевченка, Київ,
Н. Гула, д-р біол. наук
Інститут біохімії ім. О.В. Паладіна НАН України, Київ,
М. Макарчук, д-р біол. наук
КНУ імені Тараса Шевченка, Київ,
Т. Горідько, канд. біол. наук
Інститут біохімії ім. О.В. Паладіна НАН України, Київ

ВПЛИВ РІЗНИХ ДОЗ N-СТЕАРОІЛЕТАНОЛАМІНУ НА РІВЕНЬ ТРИВОЖНОСТІ АЛКОГОЛІЗОВАНИХ ЩУРІВ

Досліджували поведінку (рівень тривожності) щурів в хрестоподібному припіднятому лабіринті (ХПЛ) в нормі, після вживання алкоголю, а також при вживанні алкоголю і введенні на його фоні N-стеароїлетаноламіну (NSE) в дозі 0.1 та 5 мг/кг. Виявлено, що NSE в обох досліджуваних дозах змінює поведінку алкоголізованих щурів. З'ясовано, що 30-ти денна хронічна алкоголізація зменшує тривожно-подібну поведінку та емоційну активність в ХПЛ. При цьому у щурів, які на фоні алкоголю отримували NSE, анксиолітичний ефект, викликаний алкоголем, зменшується. Вплив NSE на досліджувані форми поведінки виявляє просту лінійну залежність, він був тим більшим, чим більшою була доза NSE.

Ключові слова: N-стеароїлетаноламін, алкоголь, хрестоподібний припіднятий лабіринт, тривожність.

Вступ. Наявні натеper клінічні та доклінічні спостереження дозволяють обґрунтовано стверджувати про наявність взаємозв'язку між стресом, тривожністю та алкоголізмом [1-4]. Все ж, незважаючи на наявні докази взаємозв'язку між тривожністю та розладами, які викликані вживанням алкоголю [2, 5, 6], етіологічний характер цього зв'язку не зовсім зрозумілий. Спостереження за хворими та експериментальні дослідження на тваринах показали, що гострий вплив низьких та помірних доз етанолу виявляє переважно анксиолітичну дію [2, 7], тоді як хронічне вживання етанолу та абстиненція здатні призводити до стійкого збільшення рівня тривожності [3, 8, 9]. При цьому було з'ясовано, що хронічне вживання етанолу здатне підвищувати рівень ендogenous лігандів канабіноїдних рецепторів, анандаміду (AEA), в клітинах нейробластоми (10) та викликає зростання рівня ендоканабіноїдів в мозку [11].

Загалом експериментальні дослідження дозволяють стверджувати, що ендоканабіноїдна система мозку здатна модулювати протікання різних видів стресу та тривожно-подібної поведінки [12,13]. Разом з тим застосування агоністів CB1 рецепторів здатне викликати протилежні ефекти. Так при застосуванні низьких доз виявляється переважно анксиолітична дія, тоді як високі дози, як правило, справляють анксиогенний вплив [12]. Крім того було з'ясовано, що одна й та сама доза дельта 9-тетрагідроканнабінолу може виявляти анксиолітичну дію при введенні в префронтальну кору та анксиогенну при її мікроінєкції в базолатеральну мигдалину [14]. Подібні біполярні ефекти канабіноїдів були продемонстровані не лише на тваринних моделях тривожності [15, 16], але й спостерігаються у людини. У деяких курців коноплі можуть посилюватися негативні відчуття – від різного рівня тривоги аж до панічних нападів [17]. Вживання ж тетрагідроканнабінолу взагалі здатне призводити до станів, які нагадують собою великі психози [18]. Схожі бімодальні відповіді були зареєстровані і при використанні антагоністів CB1 рецепторів та інших препаратів, які блокують нормальне функціонування ендоканабіноїдної системи мозку [15]. Найкраще вивченим серед ендоканабіноїдів являється анандамід. Дана сполука синтезується "на вимогу" та інактивується ферментом амід-гідролазою жирних кислот [19, 20]. Після інгібування амід-гідролази жирних кислот у мозку підвищується рівень анандаміду та знижується стрес-залежна поведінка як у щурів, так і у мишей [21, 22]. На противагу цьому, фармакологічна блокада канабіноїдних CB1 рецепторів посилює тривожну поведінку в хрестоподібному припіднятому лабіринті (ХПЛ) [23, 24] та в чорно-білій камері [25]. Миші, позбавлені CB1 рецепторів, схильні до тривожно- та депресивно-подібної пове-

дінки [26, 27]. Взаємозв'язок між інтенсивністю вживання коноплі та тривожністю і афективними розладами був описаний і в людини [28]. Загальний висновок, який умовно можна зробити зі складної та часто суперечливої літератури є таким, що інгібування ендоканабіноїдної сигналізації збільшує стрес та тривожність, тоді як помірне пригнічення в ендоканабіноїдній сигналізації зменшує стрес та тривожність. Таким чином, ендоканабіноїдна система може грати провідну роль в модуляції емоційних реакцій нервовою системою.

Натеper показано, що у мозку одночасно з анандамідом синтезується низка інших N-ацилетаноламінів [29], функціональні властивості яких не цілком з'ясовані. Втім насиченим довголанцюговим N-ацилетаноламінам притаманна низька афінність до канабіноїдних рецепторів. Перспективним для досліджень вважається N-стеароїлетаноламін (NSE), який входить до групи N-ацилетаноламінів – ацильних похідних моноетаноламіну. Дана речовина виявляє певні канабіміметичні властивості, однак для нього не встановлено зв'язування з канабіноїдними рецепторами. В попередніх наших дослідженнях ми з'ясували, що NSE в дозі 5 мг/кг протягом 7 днів пригнічує локомоторну та вертикальну активність щурів та суттєво не впливає на показники емоційної активності [30]. Проте для сучасної фармакології вкрай важливим є встановлення мінімальної ефективної дози, адже фармакологічний ефект не завжди прямо пропорційно залежить від концентрації та дози речовини. Тому в даному експерименті ми вирішили застосувати дозу, яка в 50 разів менша за попередню і порівняти поведінку саме алкоголізованих щурів після введення NSE в дозі 5 мг/кг та 0,1 мг/кг.

Метою роботи була оцінка фізіологічної дії NSE в різних дозах на фоні хронічної 30-ти денної алкоголізації та виявлення можливості корегування N-стеароїлетаноламіном негативних наслідків хронічного вживання етанолу.

Матеріали та методи. Дослідження було проведено в умовах хронічного експерименту на 72 білих щурах-самцях масою 150-200 г. (на початку експерименту), що утримувались в стандартних умовах віварію з вільним доступом до води та їжі. Всі маніпуляції проводились у відповідності до біоетичних норм. Поведінку щурів оцінювали використовуючи ХПЛ, чорно-білу камеру та відкрите поле (ВП) [31, 32].

Поведінкові реакції щурів у відкритому полі та чорно-білій камері використовували для формування зрівноважених груп. Після тестування щури за всіма зареєстрованими показниками були поділені на 4 групи:

I група – "Контроль" (n=13) – інтактні тварини;

II група – "Алкоголь" (n=20) – щури з моделлю хронічної 30-ти денної АІ;

© Бондаренко О., Гула Н., Макарчук М., Горідько Т., 2014

III група – "Алк+NSE-0,1" (n=20) – щури, які останні 7 днів 30-ти денної алкоголізації отримували NSE в дозі 0,1 мг/кг;

IV група – "Алк+NSE-5" (n=19) – щури, які останні 7 днів 30-ти денної алкоголізації отримували NSE в дозі 5 мг/кг.

Тварин I, II та III групи утримували на стандартному раціоні віварію і вільному доступі до води та їжі. Тварини IV, V та VI групи протягом періоду введення алкоголю обмежувались в доступі до води, але без харчової депривації протягом всього експерименту.

Далі проводили хронічну алкоголізацію та введення досліджуваної речовини.

Хронічну алкогольну інтоксикацію (AI) здійснювали в 2 етапи: на I етапі визначали схильність щурів до етанолу за допомогою "двопляшкового" методу. Тварин, які не мали до цього контакту з етанолом, саджали в індивідуальні клітки оснащені двома поїлками: одна з водою, інша з 15% розчином етанолу. Протягом цієї фази тварини впродовж 14 днів мали вільний вибір між розчином етанолу та водою. Раз на добу знімали показники індивідуального об'єму випитого спирту за одиницю часу (г/кг/добу) та відсоткове співвідношення випитого спирту до об'єму всієї рідини. В роботі [5] описано, що вроджена схильність до вживання етанолу має зв'язок з рівнем поведінкових реакцій, тому цей етап дозволив до початку 30-ти денної примусової алкоголізації зрівноважити щурів IV, V та VI групи не лише на основі поведінкових характеристик, а й за рівнем спонтанного споживання етанолу. На II етапі проводили примусову алкоголізацію шляхом використання етанолу як єдиного джерела рідини впродовж 30 днів [36].

Водні суспензії NSE (NSE було синтезовано в відділі біохімії ліпідів Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАНУ) вводили тваринам інтрагастрально, використовуючи пластиковий зонд із розрахунку 0,1 та 5 мг/кг маси тіла, протягом останніх 7 днів хронічної 30-ти денної алкогольної інтоксикації. В попередніх наших дослідженнях [30] нами не виявлено жодних статистично значущих відмінностей в тесті ВП між тваринами інтактного контролю та тваринами, яким вводили воду через зонд, що вказує на відсутність впливу даної процедури на поведінкові реакції щурів.

Після закінчення алкоголізації та введення NSE проводили тестування тварин в ХПЛ. Тест ХПЛ в даному дослідженні використовувався як основний методичний прийом для оцінки рівня тривожності у щурів різних груп. Дослідження поведінки щурів та мишей в ХПЛ широко

використовується в доклінічній оцінці терапевтичної ефективності можливих ансіолітиків [33-35]. Індуковане препаратами збільшення часу перебування у відкритих рукавах свідчить про ансіолітичний ефект, в той час як збільшення часу, проведеного в закритих рукавах свідчить про ансіогенний ефект. В даній установці ми протягом 5 хвилин реєстрували такі показники: час проведення у відкритих та закритих рукавах, час проведений в центрі, кількість заходів у відкриті та закриті рукава, кількість перетинань центральної платформи, кількість заглядань вниз та виглядань з центральної платформи, кількість та тривалість грумінгу, кількість стійок на стіну.

Для статистичного аналізу даних використовували програму Statistica for Windows 7.0 (StatSoft). За критерієм Шапиро-Вілکا було визначено, що вибірки даних активності поведінки належать до ненормально розподілених. При ненормальному розподілі для порівняння незалежних вибірок кількісних даних (між групами) використовували критерій Манна-Уїтні та представляли у вигляді медіани та 25 і 75 % квантилів. Критичний рівень значущості при перевірці статистичних гіпотез приймали рівним 0,05.

Результати та їх обговорення. Тестування тварин у ХПЛ після завершення алкоголізації та введення NSE показало, що у щурів IV групи спостерігається тенденція до зменшення часу перебування у відкритих рукавах лабіринту ($p=0,06$) та статистично значуще збільшується час перебування в закритих рукавах лабіринту ($p<0,05$) порівняно з тваринами II групи (Рис.1.), що може свідчити про збільшення тривожно-подібної поведінки у щурів, які на фоні алкоголю отримували NSE в дозі 5 мг/кг порівняно з тваринами, які отримували лише алкоголь. Важливим показником для оцінки ступеня ноофільності тварини являється співвідношення між часом перебування у відкритих/закритих рукавах, адже вважається, що чим більший цей показник тим більш ноофільною є тварина. В наших дослідженнях ми виявили статистично значуще зменшення даного показника у тварин IV групи ($p<0,05$) та тенденцію до зменшення у щурів III групи ($p=0,08$) порівняно з тваринами II групи (Рис.2.), що також може свідчити про певне посилення тривожності у тварин, яким вводили NSE на фоні алкоголю, в порівнянні з тваринами, які отримували лише алкоголь. Проте порівняння поведінки щурів, яким вводили NSE в обох дозах, з поведінкою контрольних тварин за всіма вище згаданими показниками не виявило ніякої різниці.

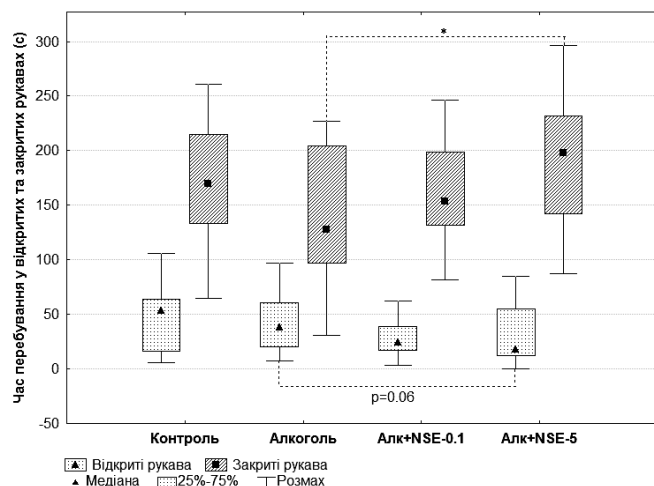


Рис.1. Час перебування у відкритих та закритих рукавах у щурів I-IV групи в хрестоподібному припіднятому лабіринті

Примітка: * – $p<0,05$.

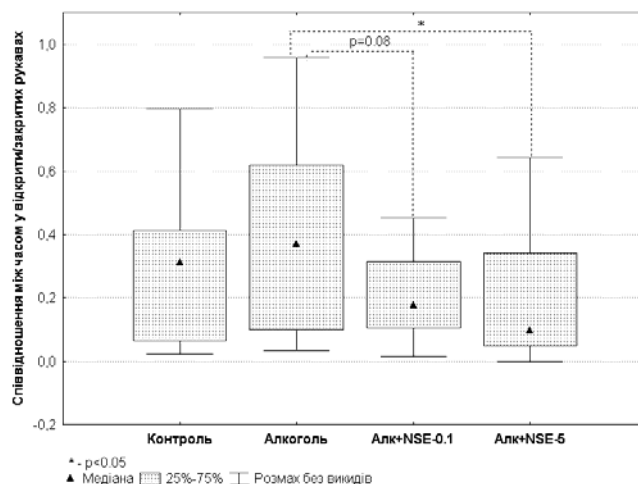


Рис.2. Співвідношення між часом перебування у відкритих та закритих рукавах у щурів I-IV групи в хрестоподібному припіднятому лабіринті

Що стосується часу перебування в центральній частині лабіринту, то у тварин III групи спостерігається тенденція до його збільшення порівняно з тваринами I групи ($p=0,09$). У щурів IV групи достовірних відмінностей порівняно з тваринами I групи немає, проте виявлена тенденція до зниження даного показника порівняно з тваринами III групи ($p=0,09$). Аналіз вертикальної активності тварин (кількість стійок на стіну) показав, що тварини, які отримували лише етанол, мають найвище значення даного показника порівняно з усіма іншими групами тварин. Кількість стійок на стіну у щурів II групи є статистично значуще більшою порівняно з тваринами III ($p<0,01$) та IV ($p<0,05$) групи та має тенденцію до зменшення порівняно з тваринами I групи ($p=0,09$), що може свідчити про зменшення емоційної напруги у щурів, які отримували лише етанол.

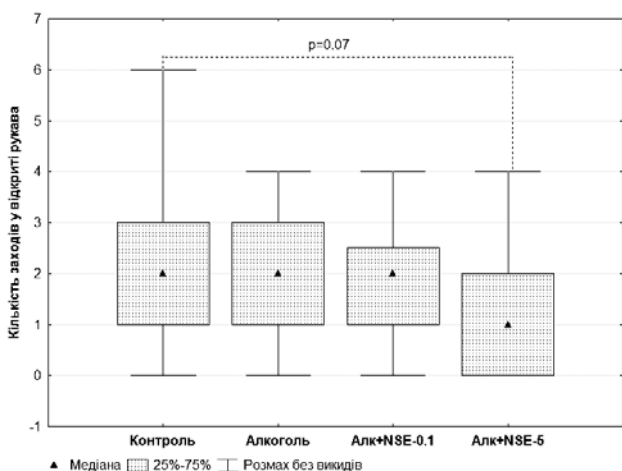


Рис.3. Кількість заходів у відкриті рукава у щурів I-IV групи в хрестоподібному припіднятому лабіринті

Примітка: * – $p<0,05$; ** – $p<0,01$.

Аналіз грумінгової активності у тварин різних груп показав, що кількість реакцій грумінгу у тварин II групи статистично значуще менша, порівняно з тваринами I групи ($p<0,05$). Що стосується тривалості грумінгу (рис.4.), то у щурів II групи цей показник також статистично значуще менший порівняно з тваринами I групи ($p<0,01$), що може свідчити про зниження емоційної напруги у тварин, які вживали лише алкоголь. Аналіз грумінгової активності тварин, які на фоні алкоголю отримували NSE, виявив статистично значуще зменшення тривалості грумінгу у щурів III групи порівняно з тваринами I групи ($p<0,05$). Порівняння між собою всіх груп тварин, які піддавалися впливу алкоголю, не виявляє достовірної різниці як за кількістю, так і за тривалістю грумінгу, проте спостерігається лінійний дозозалежний ефект NSE, що проявляється у збільшенні кількості та тривалості грумінгової активності у щурів. Чим більша доза NSE тим більшою є кількість і тривалість грумінгу.

Загалом, аналізуючи отримані результати, можна констатувати, що у тварин після 30-ти денної хронічної алкогольної інтоксикації зменшується тривожно-подібна поведінка та емоційна напруга в умовах хрестоподібного ХПЛ. Це проявляється у достовірному зниженні кількості та тривалості грумінгу та тенденцією до збільшення вертикальної активності тварин порівняно з інтактними тваринами. Крім того, у таких тварин зростає показник співвідношення часу перебування у відкритих/закритих променях. Загалом все вище згадане вказує на анксиолітичний ефект хронічної 30-ти денної алкоголізації на поведінку тварин в хрестоподібному при-

піднятому лабіринті. Що стосується кількості заходів у відкриті рукава (Рис.3.), то у тварин IV групи цей показник має тенденцію до зменшення порівняно з тваринами II групи ($p=0,07$). Крім того у щурів IV групи спостерігається тенденція до зменшення кількості перетинань центральної платформи лабіринту порівняно з тваринами I та II групи ($p=0,07$). Але ми не виявили достовірних відмінностей по кількості заходів у закриті рукава, що може свідчити про певне зниження дослідницької активності у тварин, які отримували на фоні алкоголю NSE в дозі 5 мг/кг. Варто зазначити, що у тварин, які на фоні алкоголю отримували NSE в дозі 0,1 мг/кг кількість заходів в закриті промені дещо знижується як в порівнянні з контрольними щурами, так і з тваринами, які отримували лише алкоголь.

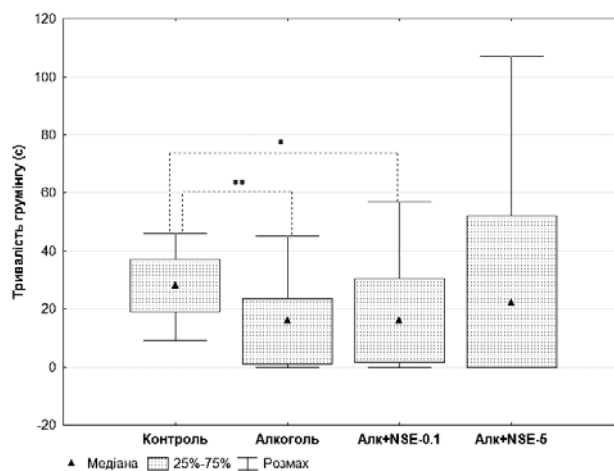


Рис.4. Тривалість грумінгу у щурів I-IV групи в хрестоподібному припіднятому лабіринті

піднятому лабіринті. Тоді як у тварин, які на фоні алкоголю отримували NSE, такий анксиолітичний ефект не проявляється. Навіть навпаки, у щурів, які отримували NSE в дозі 5 мг/кг на фоні алкоголю, спостерігається тенденція до зменшення кількості заходів у відкриті рукава та кількості перетинань центральної платформи порівняно з інтактними тваринами. Крім того у таких щурів порівняно з тваринами, які вживали лише алкоголь спостерігається зниження ноофілії, що проявляється у достовірному зниженні показника співвідношення часу у відкритих/закритих променях. Також спостерігається збільшення часу перебування в закритих променях лабіринту та зниження вертикальної активності. А виявлена тенденція до зниження кількості перетинань центральної платформи та часу перебування в ній в сукупності з вище описаними змінами може свідчити про посилення тривожно-подібної поведінки у щурів, яким на фоні алкоголю вводили NSE в дозі 5 мг/кг. Така різниця чітко виявляється лише в порівнянні з тваринами, які вживали алкоголь, адже відмінності з контрольними тваринами не є достовірними. Аналіз поведінки тварин, які на фоні алкоголю отримували NSE в дозі 0,1 мг/кг не виявив посилення тривожності у таких тварин, як в порівнянні з контрольними щурами, так і з тваринами, які вживали лише алкоголь. Хоча при цьому і спостерігається достовірне зменшення тривалості грумінгу та тенденція до збільшення часу перебування в центральній частині платформи порівняно з інтактними тваринами, що може свідчити про дещо інший ефект вище згаданої дози, який не посилює тривожно-подібної поведінки.

Порівнюючи між собою поведінку всіх тварин, які піддавалися впливу алкоголю та введенні на його фоні NSE в різних дозах можна припустити, що виявлений анксиогенний ефекти комбінованого впливу NSE та алкоголю скоріше свідчать не про посилення тривожності цих тварин, а про зниження анксиолітичного ефекту, викликаного вживанням алкоголю. Це дозволяє зробити висновок, що NSE в обох досліджуваних дозах може мати вплив на поведінку алкоголізованих тварин, що є перспективним для подальшої оцінки ефективності застосування даної речовини в умовах хронічної алкогольної інтоксикації. Крім того спостерігається лінійний дозозалежний ефект NSE, і він тим більший, чим більша доза NSE. А виявлена тенденція до зменшення кількості заходів у відкриті промені порівняно з контрольними тваринами теоретично може свідчити про те, що доза NSE 5 мг/кг, з великою вірогідністю, є граничною межею застосування даної речовини, і подальше використання більших доз може мати більш виражений анксиогенний вплив на поведінку як алкоголізованих, так і контрольних щурів.

Список використаних джерел

1. Piazza P.V., Le Moal M. The role of stress in drug self-administration // Trends Pharmacol Sci. – 1998. – Vol.19. – P.67–74.
2. Kushner M.G., Abrams K., Borchardt C. The relationship between anxiety disorders and alcohol use disorders: a review of major perspectives and findings // Clin Psychology Rev. – 2000. – 20(2). – P.149–171.
3. Roberts A.J., Heyser C.J., Cole M. et. al. Excessive ethanol drinking following a history of dependence: animal model of allostasis // Neuropsychopharmacology. – 2000. – 22(6). – P.581–594.
4. Weiss F., Ciccocioppo R., Parsons L.H. et. al. Compulsive drug-seeking behaviour and relapse. Neuroadaptation, stress, and conditioning factors // Ann NY Acad Sci. – 2001. – 937. – P.1–26.
5. Bradizza C.M., Stasiewicz P.R., Paas N.D. Relapse to alcohol and drug use among individuals diagnosed with co-occurring mental health and substance use disorders: a review // Clin Psychol Rev. – 2006. – 26(2). – P.162–178.
6. Cosci F., Schruers K.R., Abrams K., Griez E.J. Alcohol use disorders and panic disorder: a review of the evidence of a direct relationship // J Clin Psychiatry. – 2007. – 68(6). – P.874–880.
7. Koob G.F. A role for GABA mechanisms in the motivational effects of alcohol // Biochem Pharmacol. – 2004. – 68(8). – P.1515–1525.
8. Valdez G.R., Roberts A.J., Chan K. et. al. Increased ethanol self-administration and anxiety-like behavior during acute ethanol withdrawal and protracted abstinence: regulation by corticotropin-releasing factor // Alcohol Clin Exp Res. – 2002. – 26(10). – P.1494–1501.
9. Santucci A.C., Cortes C., Bettica A., Cortes F. Chronic ethanol consumption in rats produces residual increases in anxiety 4 months after withdrawal // Behav Brain Res. – 2008. – 188(1). – P.24–31.
10. Hungund B.L., Szakall I., Adam A. et. al. Cannabinoid CB1 receptor knockout mice exhibit markedly reduced voluntary alcohol consumption and lack alcohol-induced dopamine release in the nucleus accumbens // J Neurochem. – 2003. – 84(4). – P.698–704.
11. Basavarajappa B.S., Hungund B.L. Chronic ethanol increases the cannabinoid receptor agonist anandamide and its N-arachidonoylphosphatidyl-ethanolamine in SK-N-SH cells // J Neurochem. – 1999. – 72(2). – P.522–528.
12. Viveros M., Marco E.M., File S. E. Endocannabinoid system and stress and anxiety responses // Pharmacol Biochem Behav. – 2005. – 81(2). – P.331–342.
13. Lutz B. Endocannabinoid signals in the control of emotion // Curr Opin Pharmacol. – 2009. – 9(1). – P.46–52.
14. Rubino T., Guidali C., Vigano D. CB1 receptor stimulation in specific brain areas differently modulate anxiety-related behavior // Neuropharmacology. – 2008. – 54(1). – P.151–160.
15. Lafenetre P., Chaoulouff F., Marsicano G. The endocannabinoid system in the processing of anxiety and fear and how CB1 receptors may modulate fear extinction // Pharmacol Res. – 2007. – 56(5). – P.367–381.
16. Hill M.N., Gorzalka B.B. The endocannabinoid system and the treatment of mood and anxiety disorders // CNS Neurol Disord Drug Targets. – 2009. – 8(6). – P.451–458.
17. Hall W., Solowij N. Adverse effects of cannabis // Lancet. – 1998. – 352(9140). – P.1611–1616.
18. Linszen D., van Amelsvoort T. Cannabis and psychosis: an update on course and biological plausible mechanisms // Curr Opin Psychiatry. – 2007. – 20(2). – P.116–120.
19. Desarnaud F., Cadas H., Piomelli D. Anandamide amidohydrolase activity in rat brain microsomes. Identification and partial characterization // J Biol Chem. – 1995. – 270(11). – P.6030–6035.
20. Hillard C.J., Jarrahian A. Accumulation of anandamide: evidence for cellular diversity // Neuropharmacology. – 2005. – 48(8). – P.1072–1078.
21. Bortolato M., Mangieri R.A., Fu J., et. al. Antidepressant-like activity of the fatty acid amide hydrolase inhibitor URB597 in a rat model of chronic mild stress // Biol Psychiatry. – 2005. – 62(10). – P.1103–1110.
22. Moreira F.A., Kaiser N., Monory K., Lutz B. Reduced anxiety-like behaviour induced by genetic and pharmacological inhibition of the endocannabinoid-degrading enzyme fatty acid amide hydrolase (FAAH) is mediated by CB1 receptors // Neuropharmacology. – 2008. – 54(1). – P.141–150.
23. Arevalo C., de Miguel R., Hernandez-Tristan R. Cannabinoid effects on anxiety-related behaviours and hypothalamic neurotransmitters // Pharmacol Biochem Behav. – 2001. – 70(1). – P.123–131.
24. Patel S., Hillard C.J. Pharmacological evaluation of cannabinoid receptor ligands in a mouse model of anxiety: further evidence for an anxiolytic role for endogenous cannabinoid signaling // J Pharmacol Exp Ther. – 2006. – 318(1). – P.304–311.
25. Akinshola B.E., Chakrabarti A., Onaivi E.S. In-vitro and in-vivo action of cannabinoids // Neurochem Res. – 1999. – 24(10). – P.1233–1240.
26. Haller J., Bakos N., Szirmay M., et. al. The effects of genetic and pharmacological blockade of the CB1 cannabinoid receptor on anxiety // Eur J Neurosci. – 2002. – 16(7). – P.1395–1398.
27. Haller J., Varga B., Ledent C., Freund T.F. CB1 cannabinoid receptors mediate anxiolytic effects: convergent genetic and pharmacological evidence with CB1-specific agents // Behav Pharmacol. – 2004. – 15(4). – P.299–304.
28. Degenhardt L., Hall W., Lynskey M. The relationship between cannabis use, depression and anxiety among Australian adults: findings from the National Survey of Mental Health and Well-Being // Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol. – 2001. – 36(5). – P.219–227.
29. Maccarrone M., Carboni A., Parolaro D. et al. Cannabinomimetic activity, binding, and degradation of stearyl ethanolamide with in the mouse central nervous system // Mol. Cell Neurosci. – 2002. – 21(1). – P.126–140.
30. Бондаренко О., Гула Н., Макачук М., та ін. Вплив N-стеароїлетаноламіну та хронічної алкоголізації на поведінку щурів в тесті "Відкрите поле" // Вісник Львівського університету. Серія біологічна, 2013. – Вип.62. – С.285–293.
31. Belzung C., Griebel G. Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review // Behav Brain Res. – 2001. – 125(1-2). – P.141–149.
32. Bogdanov V.B., Bogdanova O.V., Koulchitsky S.V. et. al. Behavior in the open field predicts the number of KCl-induced cortical spreading depressions in rats // Behav Brain Res. – 2013. – 236(1). – P.90–93.
33. Carobrez A.P., Bertoglio L.J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on // Neurosci Biobehav Rev. – 2005. – 29(8). – P.1193–1205.
34. Hogg S. A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety // Pharmacol Biochem Behav. – 1996. – 54(1). – P.21–30.
35. Pellow S., Chopin P., File S.E., Briley M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat // J Neurosci Methods. – 1985. – 14(3). – P.149–167.
36. Пархоменко Ю. М., Донченко Г. В., Пилипчук С. Ю. Характерные метаболические нарушения в тканях крыс вызванные длительным приемом алкоголя // Укр. біохім. журн. – 2007. – Т.79. – № 3. – С.62–68.

Надійшла до редколегії 27.01.14

О. Бондаренко, асп.

КНУ імені Тараса Шевченка, Київ,

Н. Гула, д-р біол. наук

Інститут біохімії ім. О.В. Паладіна НАН України, Київ,

М. Макачук, д-р біол. наук

КНУ імені Тараса Шевченка, Київ,

Т. Горидько, канд. біол. наук

Інститут біохімії ім. О.В. Паладіна НАН України, Київ

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ДОЗ N-СТЕАРОИЛЭТАНОЛАМИНА НА УРОВЕНЬ ТРИВОЖНОСТИ АЛКОГОЛИЗИРОВАННЫХ КРЫС

Исследовали поведение (уровень тревожности) крыс в крестообразном приподнятом лабиринте (КПЛ) в норме, после употребления алкоголя, а также при употреблении алкоголя и введении на его фоне N-стеароилэтанолamina (NSE) в дозе 0,1 и 5 мг/кг. Выявлено, что NSE в обеих исследуемых дозах изменяет поведение алкоголизованных крыс. Выяснено, что 30-ти дневная хроническая алкоголизация уменьшает тревожно-подобное поведение и эмоциональную активность в КПЛ. При этом у крыс, которые на фоне алкоголя получали NSE, анксиолитический эффект, вызванный алкоголем, уменьшается. Влияние NSE на исследуемые формы поведения проявляло простую линейную зависимость, он был тем больше, чем больше была доза NSE.

Ключевые слова: N-стеароилэтанолaмин, алкоголь, крестообразный приподнятый лабиринт, тревожность.

O. Bondarenko, PhD stud.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv,
N. Gula, DSc.
Palladin Institute of Biochemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine (NASU), Kyiv,
N. Makarchuk, Dsc.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv,
T. Goridko, PhD
Palladin Institute of Biochemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine (NASU), Kyiv

EFFECT OF DIFFERENT DOSES OF N-STEAROYLETHANOLAMINE ON ANXIETY LEVEL IN RATS AFTER ALCOHOLIZATION

The rats' behavior (anxiety level) in the elevated plus maze (EPM) while normal conditions, after alcohol consumption and introduction of N-stearoylethanolamine (NSE) in the dose of 0.1 and 5 mg/kg on the background of alcohol consumption was investigated. Analysis revealed alteration of the behavior's parameters of the rats during consumption of NSE at both doses. It was found that chronic alcoholization during 30 days decreased anxious behavior and emotional activity in EPM. In addition, reduction of anxiological effect caused by alcohol was shown in the group of rats that consumed NSE on the background of alcohol. Impact of NSE on the analyzed behavior pattern revealed linear dependence: the higher dose of NSE, the higher impact of NSE.

Keywords. N-stearoylethanolamine, alcohol, elevated plus maze, anxiety.

УДК 59.085

А. Путніков, пров. інж., В. Позур, д-р біол. наук, В. Святецька, інж. 1-кат.
КНУ імені Тараса Шевченка, Київ,
Л. Закордонець, асист.
Національний медичний університет імені О.О.Богомольця, Київ

РЕАКЦІЯ ІМУННОЇ СИСТЕМИ ЩУРІВ НА ВВЕДЕННЯ МУЛЬТИПРОБІОТИКА "СИМБІТЕР" НА ФОНІ КУРСОВОГО ЗАСТОСУВАННЯ ЦЕФТРИАКСОНУ

Метою роботи було дослідження реакції імунної системи щурів на введення мультипробіотика "Симбітер" на фоні курсового застосування цефтриаксону. Показано, що застосування пробіотика як самостійно, так і на фоні курсу ін'єкцій цефтриаксону, супроводжувалося зростанням вагового індекса та клітинності селезінки, підвищенням вагового індексу тимусу без статистично достовірних змін його клітинності. У групі тварин, котрі отримали "Симбітер" на тлі курсового застосування антибіотика, зареєстровано підвищення рівня циркулюючих імунних комплексів. Отже, отримані дані свідчать на користь здатності пробіотика "Симбітер" стимулювати гуморальні імунні реакції.

Ключові слова: "Симбітер", цефтриаксон, органи імунної системи, циркулюючі імунні комплекси.

Вступ. Курсове введення антибіотиків супроводжується порушеннями імунологічної реактивності як системного, так і локального характеру. Внаслідок розвитку дисбактеріозу, спричиненого застосуванням антибіотиків, знижується кількість лейкоцитів (у тому числі Т-лімфоцитів, нейтрофілів) та рівень деяких цитокінів (ІЛ-2, ІЛ-3, гранулоцитарно-макрофагального колонієстимулювального фактору (ГМ-КСФ)), знижується фагоцитоз макрофагів, маса селезінки та спостерігаються ознаки порушення гемопоезу. Рівень таких порушень корелює зі зменшенням кількості біфідобактерій. Таким чином, баланс мікробного профілю кишечника відіграє важливу роль у підтримці нормального функціонування імунної системи [8, 14]. Для корекції антибіотико-асоційованих порушень мікрофлори застосовують пробіотичні препарати. Пробіотики, як відомо, здатні знижувати побічні ефекти антибіотиків, а також зменшувати прояви асоційованої з антибіотиками діареї [18, 19]. Пре-, про- та симбіотики володіють широким спектром позитивних ефектів при патологічних станах, пов'язаних з порушеннями імунітету, що було показано на тваринних моделях [9]. Експериментальні дані свідчать, що пробіотики ефективно пригнічують хронічні запальні процеси у кишечнику та здатні справляти позитивний вплив при ожирінні. Також деякі із препаратів пробіотиків попереджають або затримують пухлинний ріст [20]. Цей ефект, як припускають, пов'язаний із їх впливом на міцеву мікрофлору та з їх імунорегуляторною дією [11, 12].

"Симбітер" багатокомпонентний пробіотичний препарат, що містить у своєму складі від 14 до 25 бактеріальних штамів роду *Bifidobacterium* (*B. bifidum*, *B. longum*), *Lactobacillus* (*L. fcidophilus*, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *L. helveticus*), *Propionibacterium* (*P. freudenreichii* ssp. *shermanii*, *P. acidipropionici*), *Streptococcus* (*S. salivarius*

ssp. *thermophilus*), а також штами *Acetobacter aceti* та *Lactococcus lactis*. Цей препарат показав широкий спектр пробіотичних властивостей та був запропонований як додатковий засіб в комплексній терапії ряду патологічних станів алергічної та аутоімунної етіології [1].

Метою даної роботи була оцінка впливу мультипробіотика "Симбітер", застосованого на фоні курсового введення цефтриаксону, на відносні вагові індекси та клітинність лімфоїдних органів, а також сироватковий рівень циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) щурів.

Матеріали та методи досліджень. В експерименті були використані щури-самці лінії Вістар ($m=180-230$ г), яких утримували в стандартних умовах виварію ННЦ "Інститут біології" Київського національного університету імені Тараса Шевченка (12:12 цикл день:ніч, $T_{сер}=21^{\circ}C$). Перед початком досліджень тварини були рандомізовані за вагою і розподілені на 4 групи: I – інтактний контроль (щурам щоденно вводили внутрішньом'язово (в/м) 0,1 мл води для ін'єкцій, а через 4 год – 1 мл води для ін'єкцій перорально (*per os*)), $n=8$; II – щурам щоденно вводили в/м 0,1 мл води для ін'єкцій, а через 4 год – 0,16 мл/кг симбітеру *per os* $n=8$; III – щурам щоденно вводили внутрішньом'язово 50 мг/кг цефтриаксону (БАТ "Київмедпрепарат", Україна), розведеного у воді для ін'єкцій, а через 4 год, вводили *per os* 1 мл води для ін'єкцій $n=8$; IV – щурам щоденно вводили в/м 50 мг/кг цефтриаксону, а через 4 год, вводили *per os* 0,16 мл/кг "Симбітер" $n=8$. "Симбітер ацидофільний" (SYMBITER® ACIDOPHILUS, ТОВ "Пролісок", Україна) містить біомасу живих клітин симбіоза пробіотичних мікроорганізмів, КУО/мл, не менш ніж: лактобацили і лактококи – $1,0 \cdot 10^9$, біфідобактерії – $1,0 \cdot 10^8$, пропіоновокислі бактерії – $3,0 \cdot 10^7$, оцтовокислі бактерії – $1,0 \cdot 10^5$.

Реакцію лімфоїдних органів оцінювали за відносною масою селезінки та тимусів (ваговий індекс), котру розраховували за відношенням маси органу до загальної маси тварини ($X100\%$), а також за відносною клітинністю – відношенням абсолютної кількості каріоцитів до маси органу [13].

Абсолютну кількість каріоцитів селезінки та тимусу визначали у тканинному гомогенаті, отриманому шляхом ручної гомогенізації з наступним осмотичним лізисом еритроцитів. Для визначення сироваткового рівня ЦІК використовували метод преципітації в 3,75% поліетиленгліколі (ПЕГ) 6000 (в мікомодифікації) з наступним фотометричним вимірюванням оптичної густини преципітату. Паралельні розведення досліджуваної сироватки інкубували 1 год. при кімнатній температурі в борно-боратному буфері ($pH=8,4$) та ПЕГ. Вимірювали оптичну густину при довжині хвилі 450 нм [3].

Статистичну обробку отриманих результатів проводили загальноприйнятими методами варіаційної статистики з розрахунком середнього значення (M), середнього квадратичного відхилення (σ) та середньої квадратичної похибки (m). Для визначення вірогідності відмінності показників між дослідом та контролем використовували t -критерій Стьюдента [4].

Результати досліджень та їх обговорення. Оцінка вагових та клітинних показників лімфоїдних органів відображає загальний стан імунної реактивності на рівні організму. Для адекватної оцінки реакції органів імунної системи необхідно здійснювати одночасний облік та аналіз обох показників, оскільки збільшення маси лімфоїдного органа може відбуватись не лише за рахунок лімфоїдних клітин, а, наприклад, за рахунок накопичення специфічних білкових продуктів таких, як тафтинсин і пропердин або імунних комплексів у селезінці, розростання сполучної тканини або жирової дисплазії тощо [7, 16, 17, 21]. Мікрооточення селезінки сприяє міжклітинним контактам і генерації імунної відповіді. Головні події, які відбуваються в селезінці – індукція Т-залежної В-клітинної імунної відповіді, генерація антитілопродукуючих В-лімфоцитів і проліферація $CD8^+$ Т-лімфоцитів. Весь цей час селезінка перебуває у стані транзитної спленомегалії, рівень якої пропорційний рівню активації імунної відповіді [10]. Введення цефтриаксону не призводило до достовірних змін відносної ваги та клітинності селезінки у порівнянні з аналогічними показниками у інтактних тварин (Рис.1.). Застосування пробіотика викликало підвищення як вагового індексу селезінки (на 38 %), так і відносної кількості спленічних каріоцитів (на 46%). Оскільки в селезінці відбуваються процеси антитілоутворення, зазначені зміни її показників можуть вказувати на активацію гуморальної імунної відповіді антигенними структурами бактерій, що входять до складу препарату.

Активаторна дія "Симбітеру" зберігалась також при одночасному введенні з антибіотиком. Відносна кількість спленічних каріоцитів у щурів цієї групи була на 53% вищою, а відносна вага самого органу – на 28%, у порівнянні з показниками контрольної групи ($p<0,05$). Одним з ключових лімфоїдних органів в розвитку імунної від-

повіді є тимус, який спричиняє регуляторний вплив на рівень як клітинного, так і гуморального імунітету шляхом експорту на периферію ефекторних та регуляторних клітин [22]. Введення цефтриаксону сприяло збільшенню досліджуваних показників тимусу. Так, відносна вага органу у щурів цієї групи підвищувалась на 36 %, а клітинність зростала у 2,8 рази, у порівнянні з контрольними тваринами (Рис.1.). Ймовірно причиною зареєстрованого феномену може бути відомий з літератури негативний вплив антибіотика на міграцію і апоптоз лейкоцитів [5]. У групі тварин, яким вводили "Симбітер", спостерігалось збільшення відносної ваги тимусу на 33 % у супроводі зі зниженням вмісту клітин в 1,5 рази відносно контролю. Це може пояснюватись активаторною дією "Симбітеру" на міграцію лімфоїдних клітин на периферію. З літератури відома здатність пробіотичних бактерій спричиняти збільшення кількості циркулюючих регуляторних $CD4^+Foxp3^+$ Т-клітин [15].

Комбінування "Симбітеру" з антибіотиком також призводило до підвищення відносної ваги тимусу, однак його клітинність була на рівні контрольних значень.

Утворення імунних комплексів (ІК) – один из компонентів нормальної імунної відповіді. В нормі ІК, що утворилися в кровообігу, фагоцитуються і руйнуються. За фізіологічних умов, утворення та присутність циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) в рідинах є одним з проявів імунної відповіді організму на надходження антигенів та важливим чинником, що забезпечує імунітет. Утворені імунні комплекси, за цих умов, деякий час циркулюють в лімфі і крові, після чого відбувається їх елімінація фагоцитами. Взаємодія ЦІК з імунокомпетентними клітинами призводить до модуляції імунної відповіді. В крові імунні комплекси можуть знаходитись у вільному та зв'язаному стані, однак останні майже не виявляють негативного впливу на організм, тому більший інтерес складають саме вільні ЦІК [2].

Важливим показником імунологічної реактивності є рівень ЦІК в сироватці крові. Цей показник є відображенням деструктивно-дегенеративних явищ в організмі з одного боку, оскільки деструктивні процеси в тканинах результуються експозицією великої кількості розчинних антигенів, які нейтралізуються та елімінуються антитілами, що призводить до зростання вмісту ЦІК у циркулюючій крові. З іншого боку вміст ЦІК може слугувати характеристикою процесів біосинтезу антигенов в цілому [6]. За результатами наших досліджень, рівень ЦІК у сироватці щурів контрольної групи склав 86 у.о. (Рис 2.). Застосування цефтриаксону майже не впливало на концентрацію ЦІК в крові тварин. Введення "Симбітеру" супроводжувалось підвищенням рівня ЦІК на 40 %, однак воно було недостовірним у порівнянні з показниками щурів контрольної групи. У сироватці щурів IV групи, яким вводили препарати одночасно, рівень ЦІК був найвищим серед дослідних груп і перевищував контрольні значення на 53%. Слід зазначити, що сироваткові рівні імунних комплексів у дослідних тварин всіх груп характеризувалися значною індивідуальною варіабельністю.

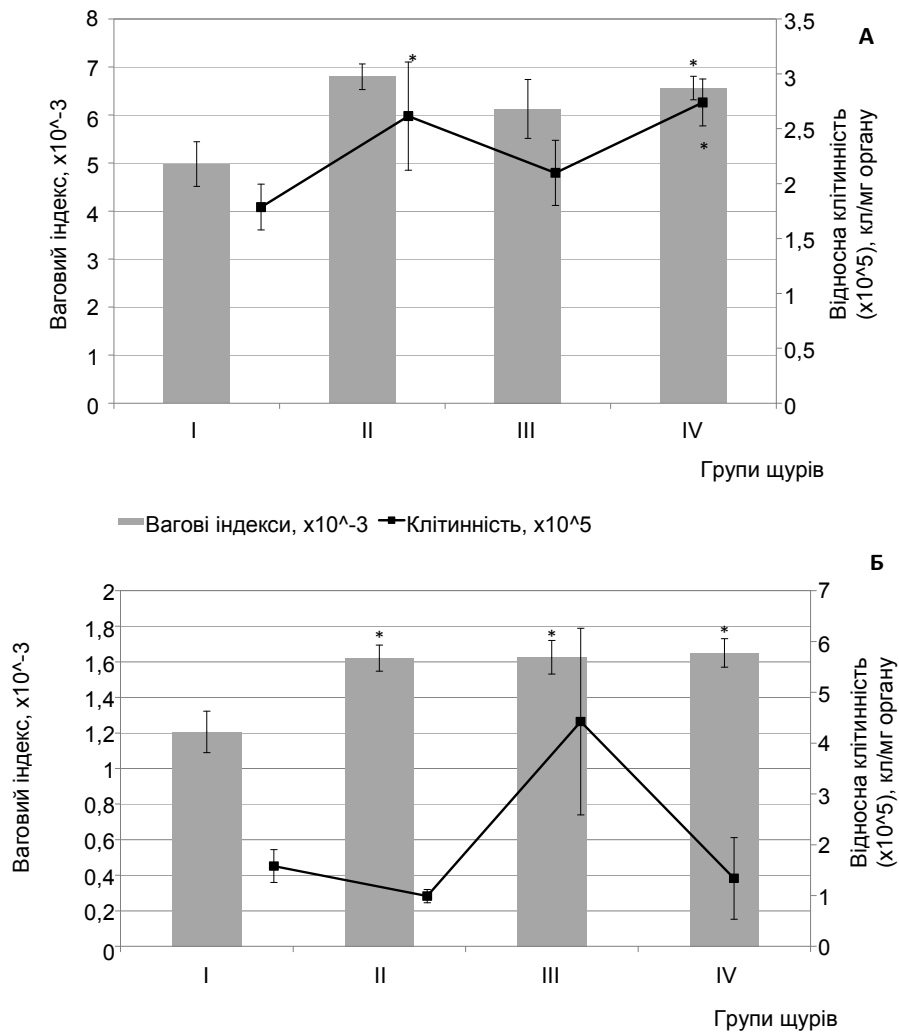


Рис.1. Вагові індекси і відносна клітинність селезінки (А) і тимусу (Б) щурів, що отримали мультипробіотик "Симбітер" на фоні курсового введення цефтриаксону. I – інтактні контрольні тварини (n=8); II – тварини, яким вводили "Симбітер" (n=8); III – тварини, яким вводили цефтриаксон (n=8); IV – тварини, яким вводили "Симбітер" і цефтриаксон (n=8)

* – $p < 0,05$, у порівнянні з показниками щурів контрольної групи.

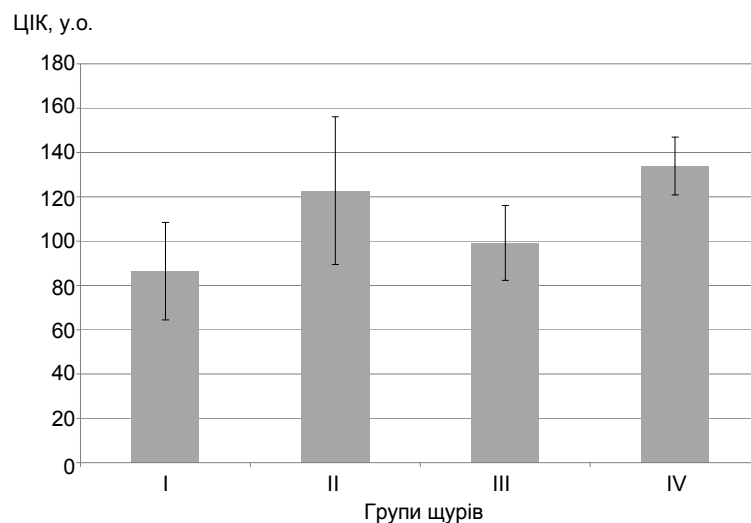


Рис.2. Рівень циркулюючих імунних комплексів у сироватці крові щурів, що отримали мультипробіотик "Симбітер" на фоні курсового введення цефтриаксону. I – інтактні контрольні тварини (n=8); II – тварини, яким вводили "Симбітер" (n=8); III – тварини, яким вводили цефтриаксон (n=8); IV – тварини, яким вводили "Симбітер" і цефтриаксон (n=8)

Висновки. Таким чином, зміна цитоморфологічних показників селезінки та рівнів ЦІК у сироватці тварин, що отримували "Симбітер", вказують на здатність препарату стимулювати гуморальні імунні реакції, розви-

ток яких асоціюється з протизапальною поляризацією імунної відповіді.

Список використаних джерел

1. Волосовець О.П., Прохорова М.П., Кривопустов С.П., Бичкова Н.Г., Слюсар Н.А. Ефективність мультипробиотика "Симбітер" у комплексному лікуванні atopічного дерматиту та дерматореспіраторного синдрому у дітей. *Современная педиатрия* 1(29) 2010;168-171.
2. Імунологія. Вершигора А.Ю., Пастер Є.У., Колибо Д.В. та ін. – Київ: Вища школа – 2005. – С.599.
3. Клиническая иммунология. Руководство для врачей / Под ред. Е.И. Соколова, Москва: Медицина – 1998. – С.272.
4. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных – Москва: МедиаСфера – 2002. – 312 с.
5. Al-Banna NA, Pavlovic D, Gründling M, Zhou J, Kelly M, Whynt S. Impact of antibiotics on the microcirculation in local and systemic inflammation // *Clin Hemorheol Microcirc*. 2013;53(1-2):155-69.
6. Egner W. The use of laboratory tests in the diagnosis of SLE. *J Clin Pathol*. 2000; v.53; №6: 424-32.
7. Eichner ER. Splenic function: normal, too much and too little. *Am J Med*. 1979 Feb;66(2):311-20.
8. Gao F., Li M., Liu Yi. Intestinal dysbacteriosis induces changes of T lymphocyte subpopulations in Peyer's patches of mice and orients the immune response towards humoral immunity. *Gut Pathogens*. 2012; 4; 19.
9. Hwang J.S., Im C.R., Im S.H. Immune disorders and its correlation with gut microbiome. *Immune network*. 2012; 12 (4); 129-138.
10. Immunology: the immune system in health & disease. C.A. Jeneway, P. Travers, M. Walport, M. Shlomchik Fifth edition: New York and London Garland Publishing. – 2002. – P.732.
11. Jirillo E., Jirillo F., Magrone T. Healthy effects exerted by prebiotics, probiotics, and symbiotics with special reference to their impact on the immune system. *Int J Vitam Nutr Res*. 2012;83 (3); 200-208.
12. Konieczna P., Akdis C.A., Quigley E.M., Shanahan F., O'Mahony L. Portrait of an immunoregulatory Bifidobacterium. *Gut Microbes*. 2012; 3(3); 261-266.
13. Kozłowska E., Kopec-Szlezak J., Drela N., Michur H., Izdebska-Szymona K. Sensitivity of mouse lymphoid and nonlymphoid organs to Silesian air pollutants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 1997; №37; №1; 10-16.
14. Liang Q.H., Zhang L., Duan S.C. et al. Influence of intestinal dysbacteriosis on immune and hematopoietic function in mice. *Zhonghua Er Ke Za Zhi*. 2004; 42; 708-711.
15. Liu Y, Fatheree NY, Dingle BM, Tran DQ, Rhoads JM. Lactobacillus reuteri DSM 17938 changes the frequency of Foxp3+ regulatory T cells in the intestine and mesenteric lymph node in experimental necrotizing enterocolitis. *PLoS One*. 2013;8(2):e56547.
16. Mebius RE, Kraal G. Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol*. 2005 Aug;5(8):606-16.
17. Nishino M, Ashiku SK, Kocher ON, Thurer RL, Boisselle PM, Hatabu H. The thymus: a comprehensive review. *Radiographics*. 2006 Mar-Apr; 26(2):335-48.
18. Ouwehand AC, Donglian C, Weijian X, Stewart M, Ni J, Stewart T, et al. Probiotics reduce symptoms of antibiotic use in a hospital setting: A randomized dose response study. *Vaccine*. 2013 Nov 26. pii: S0264-410X(13)01587-9. doi: 10.1016/j.vaccine.2013.11.053.
19. Singh VP, Sharma J, Babu S, Rizwanulla, Singla A. Role of probiotics in health and disease: a review. *J Pak Med Assoc*. 2013 Feb;63(2):253-7.
20. Uccello M, Malaguarnera G, Basile F, et al. Potential role of probiotics on colorectal cancer prevention. *BMC Surg*. 2012;12 Suppl 1:S35.
21. Wluka A, Olszewski WL. Innate and adaptive processes in the spleen. *Ann Transplant*. 2006;11(4):22-9.
22. Yarin A.A. Cytokines in the thymus: production and biological effects. *Curr. Med. Chem*. 2004; №11; P.447-464.

Надійшла до редколегії 28.01.14

А. Путников, вед. инж., В. Позур, д-р биол. наук, В. Святецкая, инж. 1-кат.
КНУ имени Тараса Шевченко, Киев,
В. Закордонетс, асист.
Национальный медицинский университет имени А.А.Богомольца, Киев

РЕАКЦИЯ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ КРЫС НА ВВЕДЕНИЕ МУЛЬТИПРОБИОТИКА "СИМБИТЕР" НА ФОНЕ КУРСОВОГО ПРИМЕНЕНИЯ ЦЕФТРИАКСОНА

Целью работы было исследование реакции иммунной системы крыс на введение мультипробиотика "Симбитер" на фоне курсового применения цефтриаксона. Показано, что применение пробиотика как самостоятельно, так и на фоне курса инъекций цефтриаксона, сопровождалось увеличением весового индекса и клеточности селезенки, повышением относительного веса тимуса без статистически достоверных изменений его клеточности. В группе животных, которые получили "Симбитер" на фоне курсового применения антибиотика, зарегистрировано повышение уровня циркулирующих иммунных комплексов. Таким образом, полученные данные свидетельствуют в пользу способности пробиотика "Симбитер" активировать гуморальные иммунные реакции.

Ключевые слова: "Симбитер", цефтриаксон, органы иммунной системы, циркулирующие иммунные комплексы.

A. Putnikov, ing., V. Pozur, DSc., V. Svyatetskaya, ing.,
Taras Shevchenko National University of Kiev, Kiev,
L. Zakordonets, assist.
Bogomolets national medical university, Kyiv

THE REACTION OF THE IMMUNE SYSTEM OF RATS ON MULTIPROBIOTIC SYMBITER ON THE BACKGROUND A COURSE OF CEFTRIAXONE

The immune system response on multiprobiotic "Symbiter" against the background of the course of injections of ceftriaxone was investigated in rats. It was shown, that probiotic use alone and against the background of the course of ceftriaxone antibiotic was associated with the increase of weight indices and the cellularity of spleen as well as the increase of the relative weight of the thymus without statistically significant changes in the cellularity of this organ. Increased levels of circulating immune complexes were registered in rats received multiprobiotic "Symbiter" against the background of the course of injections of ceftriaxone. It suggests the ability of "Symbiter" to activate humoral immune reaction.

Keywords: "Symbiter", ceftriaxone, organs of the immune system, circulating immune complexes.

УДК 581.5

О. Омельчук, асп., Б. Проць, канд. біол. наук.
Державний природознавчий музей НАН України, Львів

РАРИТЕТНІ ФІТОЦЕНОЗИ РІЧКОВО-ДОЛИННИХ КОРИДОРІВ ЗАКАРПАТТЯ

У зв'язку з посиленням трансформації природних екосистем, обов'язковою умовою забезпечення охорони фіторізноманіття є облік та проведення оцінки стану раритетних угруповань рослинності. У межах річково-долинних коридорів Закарпаття нами виявлено 9 формацій та 64 асоціації раритетних синтаксонів. З них 10 лісових, 5 лучних та 49 водних. Більшість осередків раритетних угруповань перебувають під охороною у межах регіонального ландшафтного парку "Притисянський" (6 формацій, представлені 57 асоціаціями). Частина локалітетів угруповань формації марсилії чотирилистої (*Marsilea quadrifoliae*) та латаття білого (*Nymphaea albae*), потребують включення до території об'єктів природо-заповідного фонду. 86% кількості раритетних рослинних угруповань знаходяться у високому ступені ризику їх життєдіяльності та потребують проведення нагальних активних природоохоронних заходів.

Ключові слова: раритетні угруповання, Зелена книга, поширення, Закарпаття.

Вступ. Головними засадами сучасної концепції охорони природи є збереження біорізноманіття, у тому числі рідкісних й зникаючих видів флори, цінних рослинних

угруповань та оселищ. Охорона рідкісних видів рослин може бути забезпечена лише тоді, коли охороняються фітоценози, компонентами, або едифікаторами яких во-

ни є [10]. У світлі постійного посилення антропогенного пресу, актуальним завданням сьогодення є не лише обґрунтування наукових засад охорони рідкісних і зникаючих видів, але й рослинних угруповань, а також екологічних умов їх існування як основи забезпечення спонтанного розвитку фітобіоти й перебігу еволюційного процесу [7].

Закарпатська область розташована на південно-західних схилах Українських Карпат і на прилеглій до них Закарпатській низовині і займає площу 12,8 тис. км² (Рис.1). Усі річки та потічки, які формуються по долинах і ущелинах гір, а їх у Закарпатті понад 9000, належать до басейну р. Тиса, та є її притоками. Найбільші з них – це річки Тересва, Теребля, Ріка, Боржава, Латориця і Уж. Дві останні впадають у р. Бодрог на території Словаччини, яка в подальшому впадає у р. Тиса. Водний режим річок є дуже мінливий [3,4].

Завдяки своєму географічному положенню та особливим орографічним та кліматично-гідрологічним умовам, заплавні фітосистеми Закарпаття не мають аналогів у рослинному покриві України і слугують осередком підтримання біорізноманіття в регіоні [2, 9]. Закарпатська область займає чільне місце серед усіх регіонів України за кількістю заповідних об'єктів (456 одиниць різного рангу, зокрема 34 із них – загальнодержавного значення), а його природо-заповідний фонд охоплює близько 14% території. Найбільшими за площею територіями об'єктів природно-заповідного фонду є Карпатський біосферний заповідник, національні парки – "Синевир", "Ужанський" та "Зачарований край" і регіональний ландшафтний парк "Притисянський".

Водночас, фіторізноманіття річково-долинних коридорів Закарпаття зазнає постійного антропогенного впливу протягом останніх десятиліть [15]. Певна засміченість водних потоків, меліоративні роботи, а також несанкціонований забір гравію спричинили фрагментацію та збіднення природного рослинного покриву. Оцінка раритетних фітоценозів річково-долинних коридорів Закарпаття це нагальна передумова розроблення заходів щодо їх відновлення та забезпечення належною охороною.

Завдяки вище наведеним причинам, територія Закарпаття була вибрана як територія досліджень. Метою роботи було встановити синтаксономічне різноманіття раритетної рослинності річково-долинних коридорів Закарпаття, з'ясувати її просторовий розподіл та оцінити її соціологічну вартість.

Дослідження раритетної рослинності річково-долинних коридорів Закарпаття проводили протягом 2008-2012 років. Матеріали польових досліджень включають понад 500 описів. Методичною основою досліджень були домінуюча методологія [5, 6] та флористична методологія Браун-Бланке [11, 14, 17]. Одиницями опису вибрані однорідні ділянки у межах рослинних формацій (ліс, болото, лука, стариця, ставок, канал, річка). Розмір описової ділянки становив між 200 та 600 м² для лісових екосистем, 50-100 м² – для кущової рослинності, 20-30 м² – для лук та 4 м² – для водної рослинності.

Вивчення рослинності проводили шляхом поєднання детально-маршрутних та напівстаціонарних досліджень. Для забезпечення повноти виявлення синтаксонів здійснювали повторні відвідування деяких екотопів протягом різних фенологічних періодів. Дослідження річково-долинних коридорів проводилось у місцях видимого геоморфологічного виділення такого коридору з його шириною щонайменше 50 м. Висотний розподіл досліджене сягав між висотою 98 та 700 м над рівнем моря території Закарпатської області.

Назви синтаксонів у флористичній класифікації наводили за Matuszkiewicz J.M. [13], у домінуючій – за Зеленою книгою України [1] та Червоним списком рідкіс-

них фітоценозів Закарпаття [8]. Отримані дані описів рослинності опрацьовані з використанням бази даних рослинності TURBOVEG [12], програмні пакети JUICE [16] та програмного пакету HITAB 5.0 [18].

Результати досліджень та їх обговорення. На основі польових досліджень, матеріалів "Зеленої книги України" [1] та роботи С.М.Стойка зі співавторами [7] на території досліджень у межах річково-долинних коридорів Закарпаття нами виявлено 9 формацій та 64 асоціації раритетних синтаксонів. З них 10 лісових, 5 лучних та 49 водних за критеріями домінуючої класифікації. Згідно ознак флористичної класифікації, рідкісні угруповання представлені 6 класами, що охоплюють 7 порядків, 8 союзів, 8 асоціацій та одне безрангове угруповання.

Співвідношення між двома синтаксономічними системами та характеристика синтаксонів "Зеленої книги України" [1] є представлені нижче. На підставі "Зеленої книги України" (2009) для нижче наведених 64 раритетних синтаксонів Закарпаття нами визначені синфітосо-зологічні класи (СФК).

Продромус раритетних угруповань та їх характеристика:

I. Формація звичайно-дубових лісів (*Querceta roboris*)

Синтаксони за флористичною класифікацією: Cl. *Querceto-Fagetum* Br.-Bl. et Vlieger 1937, Ord. *Fagetalia sylvaticae* Pawl. 1928, All. *Carpinion* Issler 1931, suball. *Querceto-Carpinion* j. et M. Michalko 1985: *Primulo veris-Carpinetum* Neuhäusel et Neuhäuslová ex et Neuhäuslová-Novotná 1964, *Querceto-Carpinetum* Soó et Pócs 1957.

1. грабово-звичайнодубовий ліс плющовий (*Carpinetum (betuli)-Quercetum (roboris) hederosum (helicis)*)

Синтаксон перебуває під загрозою зникнення. Синфітосо-зологічний клас: I

Забезпеченість охороною: Зелена книга України, охороняються на території РЛП "Притисянський".

Поширення: заплави річок Тиси і Боржави (Берегівський р-н.) околиці с. Квасово в ур. Атак і ур. Лапош, окол. с. Мужієво, с.Квасово, в ур. Нодьгеть, окол.с Вари та смт. Боржава в ур. Боржава, ур.Великий Ліс; (Хустський р-н.) м. Хуст; (Мукачівський р-н.) м. Мукачево.

2. звичайнодубовик звичайноліщиновоєвропейсько-копитняковий *Q. coryloso (avellanae)-asarosum (europaei)*

3. звичайнодубовик звичайноліщиновозвичайноконвалієвий *Q. coryloso (avellanae)-convallariosum (majalis)*

4. звичайнодубовик звичайноліщиновожовтозеленчуковий *Q. coryloso (avellanae)-galeobdolosum (lutei)*

5. грабовозвичайнодубовик звичайнояглицевий *Carpinetum (betulis) – Quercetum (roboris) aegopodiosum (podagrariae)*

6. грабовозвичайнодубовик ведмежоцибулевий *C. – Q. alliosum (ursini)*

7. грабовозвичайнодубовик волосистоосоковий *C. – Q. caricosum (pilosae)*

8. буковозвичайнодубовик ведмежоцибулевий *Fagetum (sylvaticae) – Quercetum (roboris) alliosum (ursini)*

Синтаксони 2-8 є типовими, вразливими. Синфітосо-зологічний клас: II, III

Поширення: частими є у межах Вигорлат-Гутинського хребта, а також трапляється у заплавах річок Тиси і Боржави (Берегівський р-н.) околиці с. Квасово в ур. Атак і ур. Лапош, околиці с. Мужієво в ур. Нодьгеть, ур. Боржава; (Тячівський р-н.) ур. Мочарка в окол. смт. Буштино; заплави р. Латориці (Ужгородський р-н.) ур. Переш в окол. с. Червоне.

Забезпеченість охороною: включені до списку регіонально-рідкісних угруповань, охороняються на території РЛП "Притисянський".

II. Угрупування клейковільхових лісів (*Alnetum glutinosae*) з домінуванням у травостой страусового пера звичайного.

Синтаксони за флористичною класифікацією: Cl. *Alnetea glutinosae* Br.-Bl. et R. Tüxen 1943, Ord. *Alnetalia glutinosae* R. Tüxen 1937, All. *Alnion glutinosae* (Malcuit 1929) Meijer-Drees 1936: *Carici elongatae-Alnetum* Koch 1926.

9. клейковільховий ліс страусовоперовий (*Alnetum glutinosae matteucciosum (struthiopteris)*)

Синтаксон 9 перебуває під загрозою зникнення. Синфітосозологічний клас: I

Поширення: заплави річки Боржави (Берегівський р-н.) околиці с. Квасово в ур. Атак і ур. Лапош, ур. Нодьгет та смт. Боржава в ур. Боржава, на р.Тиса с.Гетиня, с.Фанчико.

Забезпеченість охороною: Зелена книга України, охороняються на території РЛП "Притисянський".

III. Угрупування сіровільхових лісів (*Alnetum incanae*) з домінуванням у травостой страусового пера звичайного.

Синтаксони за флористичною класифікацією: Cl. *Quercu-Fagetum* Br.-Bl. et Vlieger 1937, Ord. *Fagetalia sylvaticae* Pawł. 1928, All. *Alnion incanae* Pawł. 1928: *Cardamino amarae-Alnetum incanae* Somsak 1961.

10. сіровільховий ліс страусовоперовий (*Alnetum incanae matteucciosum (struthiopteris)*).

Синтаксон 10 типовий, проте вразливий. Синфітосозологічний клас: II

Поширення: синтаксон не рідкісний, трапляється на усіх річках гірської частини Закарпаття, проте кількість локалітетів швидко скорочується.

Забезпеченість охороною: Зелена книга України, охороняються на території КБЗ та НПП "Синевир", "Зачарований край", "Ужанський парк".

I V. Угрупування формації нарцису вузьколистого (*Narcissietum angustifolii*).

Синтаксони за флористичною класифікацією: Cl. *Molinio-Arrhenatheretea* R. Tx. 1937, Ord. *Molinietalia caeruleae* W. Koch 1926, All. *Molinion caeruleae* W. Koch 1926: com. *Narcissus angustifolius* (dom.).

11. лучнокострицево-вузьколистонарцисова (*Narcissietum (angustifolii) festucosum (pratensis)*)

12. молінієво-вузьколистонарцисова (*Narcissietum (angustifolii) molinosum (caeruleae)*)

13. пахучотравово-вузьколистонарцисова (*Narcissietum (angustifolii) anthoxanthosum (odorati)*)

14. тонкомітлицево-вузьколистонарцисова (*Narcissietum (angustifolii) agrostidosum (tenuis)*)

15. червонокострицево-вузьколистонарцисова (*Narcissietum (angustifolii) festucosum (rubrae)*)

Синтаксони 11-15 є рідкісними та вразливими. Синфітосозологічний клас: I

Поширення: заплави річки Тиси (Хустський р-н.) с. Киреші

Забезпеченість охороною: Зелена книга України, охороняються на території КБЗ (заповідний масив "Долина нарцисів").

V. Угрупування формації водяного горіху плаваючого (*Trapaetum natantis*)

Синтаксони за флористичною класифікацією: Cl. *Potamogetonetea pectinati* R. Tüxen et Preising 1942, Ord. *Potamogetonetalia pectinati* W. Koch 1926, All.

Nympheion albae Oberdorfer 1957: *Trapaetum natantis* Kárpáti 1963.

16. берхтольддордесниково-водяногоріхова (*Trapaetum (natantis) potamogetosum (berchtoldii)*)

17. водяногоріхова чиста (*Trapaetum natantis purum*)

18. гребінчастордесниково-водяногоріхова (*Trapaetum (natantis) potamogetosum (pectinati)*)

19. щитолістоплавуново-водяногоріхова (*Trapaetum (natantis) nymphoidosum (peltatae)*).

Синтаксони 16-19 є типовими угрупованнями прісноводних водойм евтрофного типу. Синфітосозологічний клас: I

Поширення: меліоративні канали Закарпатської низовини, рідко.

Забезпеченість охороною: Зелена книга України, охороняються на території РЛП "Притисянський".

20. плаваючewoodяногорішник темнозеленушировий *T. ceratophyllum (demersi)*

21. плаваючewoodяногорішник плоскооостокушировий *T. ceratophyllum (platyacanthi)*

22. плаваючewoodяногорішник земноводногірчаковий *T. polygonosum (amphibii)*

23. плаваючewoodяногорішник блискучордесниковий *T. potamogetosum (lucentis)*

24. плаваючewoodяногорішник плаваючордесниковий *T. potamogetosum (natantis)*

25. плаваючewoodяногорішник пронизанолістордесниковий *T. potamogetosum (perfoliati)*

26. плаваючewoodяногорішник плаваючесальвінієвий *T. salviniosum (natantis)*

27. плаваючewoodяногорішник багатокореневоспірделовий *T. spirodelosum (polyrhizae)*

28. плаваючewoodяногорішник звичайнопухирниковий *T. utriculariosum (vulgaris)*

Синтаксони 20-28 є типовими угрупованнями прісноводних водойм евтрофного типу. Синфітосозологічний клас: II, III

Поширення: меліоративні канали по всій Закарпатській низовині, не рідко.

Забезпеченість охороною: включені до списку регіонально рідкісних угруповань, охороняються на території РЛП "Притисянський".

VI. Угрупування формації глечиків жовтих (*Nupharetum luteae*)

Синтаксони за флористичною класифікацією: Cl. *Potamogetonetea pectinati* R. Tüxen et Preising 1942, Ord. *Potamogetonetalia pectinati* W. Koch 1926, All. *Nympheion albae* Oberdorfer 1957: *Nymphaeo albi-Nupharetum luteae* Nowiński 19286 *Nymphoidetum peltatae* Bellot 1951.

29. водяногоріхово-жовтоглечикова (*Nupharetum (luteae) traposum natantis*)

30. плаваючосальвінієво-жовтоглечикова (*Nupharetum (luteae) salviniosum (natantis)*)

31. щитолістоплавуново-жовтоглечикова (*Nupharetum (luteae) nymphoidosum (peltatae)*).

Синтаксони 29-31 є типовими угрупованнями прісноводних водойм евтрофного типу. Синфітосозологічний клас: I

Поширення: часто трапляється у меліоративних каналах, рідко – у заплаві р. Латориці (Ужгородський р-н.), с. Велика Добронь, с. Мала Добронь, с. Есень; (Мукачівський р-н.) с. Страбичово, с. Горонда, с. Нове Давидкове, с. Великі Лучки, с. Малі Лучки; рідко також – у

заплаві р. Тиси (Берегівський р-н.) с. Квасово, с. Кидьош.

Забезпеченість охороною: Зелена книга України, охороняються на території РЛП "Притисянський".

32. жовтогличник темнозеленокушировий
Nupharetum (luteae) ceratophyllosum (demersi)
33. жовтогличник плоскоостокушировий
N. ceratophyllosum (platyacanthi)
34. жовтогличник підводнокушировий
N. ceratophyllosum (submersi)
35. жовтогличник канадськоелодєєвий
N. elodeosum (canadensis)
36. жовтогличник водянососонковий
N. hippurosium (vulgaris)
37. жовтогличник злаколистордесниковий
N. potamogetosum (graminei)
38. жовтогличник блискучордесниковий
N. potamogetosum (lucensis)
39. жовтогличник плаваючордесниковий
N. potamogetosum (natantis)
40. жовтогличник вузлуватордесниковий
N. potamogetosum (nodosi)
41. жовтогличник туполистордесниковий
N. potamogetosum (obtusifolii)
42. жовтогличник гребінчастордесниковий
N. potamogetosum (pectinati)
43. жовтогличник пронизанолитордесниковий
N. potamogetosum (perfoliati)
44. жовтогличник чистий *N. purum*
45. жовтогличник звичайнопухирниковий
N. utriculariosum (vulgaris)

Синтаксони 32-45 є типовими угрупованнями прісноводних водойм евтрофного типу. Синфітосозологічний клас: II

Поширення: не рідко трапляється у меліоративних каналах та у заплаві р. Латориці (Ужгородський р-н.), с. Велика Добронь, с. Мала Добронь, с. Есень; (Мукачівський р-н.) с. Серне, с. Страбичово, с. Горонда, с. Нове Давидкове, с. Великі Лучки, с. Малі Лучки; заплави р. Тиси (Берегівський р-н.) с. Квасово, с. Кидьош.

Забезпеченість охороною: включені до списку регіонально рідкісних угруповань, охороняються на території РЛП "Притисянський".

VII. Угрупування формації латаття білого (*Nymphaeeta albae*)

Синтаксони за флористичною класифікацією: Cl. *Potamogetonetea pectinati* R. Tüxen et Preising 1942, Ord. *Potamogetonetalia pectinati* W. Koch 1926, All. *Nymphaeion albae* Oberdorfer 1957: *Nymphaeo albi-Nupharetum luteae* Nowiński 19286 *Nymphoidetum peltatae* Bellot 1951.

46. водяногоріхово-білолататтєва (*Nymphaeetum (albae) traposum (natantis)*)

47. напівзануренокуширово-білолататтєва (*Nymphaeetum (albae) ceratophyllosum (submersi)*)

48. плаваючосальвінієво-білолататтєва (*Nymphaeetum (albae) salviniosum (natantis)*)

49. щитолістоплауново-білолататтєва (*Nymphaeetum (albae) nymphoidosum (peltatae)*).

Синтаксони 46-49 є рідкісними угрупованнями прісноводних водойм евтрофного типу. Синфітосозологічний клас: I, II

Поширення: заплава річки Латориці та меліоративні канали (Ужгородський р-н.), с. Велика Добронь, с. Мала Добронь, с. Есень.

Забезпеченість охороною: Зелена книга України, охороняються на території РЛП "Притисянський".

VIII. Угрупування формації марсилії чотирилистої (*Marsileeta quadrifoliae*).

Синтаксони за флористичною класифікацією: Cl. *Isoeto-Littorelletea* Br.-Bl. et Vlieger in Vlieger 1937, Ord. *Littorelletalia uniflorae* W. Koch 1926, All. *Eleocharition acicularis* Pietsch 1967: *Marsilea quadrifolia* Kleefern 1926.

50. плаваючосальвінієво-марсилієві (*Marsileetum (quadrifoliae) salviniosum (natantis)*)

51. марсилієва чиста (*Marsileetum quadrifoliae purum*)

Синтаксони 50-51 перебувають під загрозою зникнення. Синфітосозологічний клас: I

Поширення: заплава річки Латориці (Ужгородський р-н.), с. Велика Добронь, с. Мала Добронь.

Забезпеченість охороною: Зелена книга України.

52. чотирилистомарсилієвик фенхелевидноводяножовтецевий *Marsilieta (quadrifoliae) batrachiosum (circinati)*

53. чотирилистомарсилієвик темнозеленокушировий *M. ceratophyllosum (demersi)*

54. чотирилистомарсилієвик плоскоостокушировий *M. ceratophyllosum (platyacanthi)*

55. чотирилистомарсилієвик підводнокушировий *M. ceratophyllosum (submersi)*

56. чотирилистомарсилієвик берхтольдордесниковий *M. potamogetosum (berchtoldii)*

Синтаксони 52-56 перебувають під загрозою зникнення. Синфітосозологічний клас: I

Поширення: заплава річки Латориці (Ужгородський р-н.), с. Велика Добронь, с. Мала Добронь.

Забезпеченість охороною: включені до списку регіонально-рідкісних угруповань, охороняються на території РЛП "Притисянський".

IX. Угрупування формації сальвінії плаваючої (*Salvinietum natantis*).

Синтаксони за флористичною класифікацією: Cl. *Lemnetea* O. de Bolòs & Masclans 1955, Ord. *Lemnetalia minoris* O. de Bolòs & Masclans 1955, All. *Lemnion minoris* O. de Bolòs & Masclans 1955: *Spirodelo-Salvinietum natantis* Slavnic 1956.

57. малорясково-плаваючосальвінієва (*Salvinietum (natantis) lemnosum (minoris)*),

58. плаваючосальвінієва чиста (*Salvinietum natantis purum*)

59. триборозенчаторясково-плаваючосальвінієва (*Salvinietum (natantis) lemnosum (trisulcae)*).

Синтаксони 57-59 є типовими угрупованнями прісних водойм евтрофного типу. Синфітосозологічний клас: II

Поширення: заплава річки Латориці (Ужгородський р-н.), с. Есень, с. Руські Геївці, с. Малі Геївці, с. Соломоново.

Забезпеченість охороною: Зелена книга України, охороняються на території РЛП "Притисянський".

60. плаваючосальвінієвик папоротевидноазоловий *S. azollozum (filiculoiditis)*

61. плаваючосальвінієвик темнозеленокушировий *S. ceratophyllosum (demersae)*

62. плаваючесальвінієвик горбаторясковий *S. lemnosum* (*gibbae*)

63. плаваючесальвінієвик чистий *S. purum*

64. плаваючесальвінієвик багатокореневоспіроделовий *S. spiradelosum* (*polyrhizae*)

Синтаксони є типовими угрупованнями прісних водойм евтрофного типу. Синфітосозологічний клас: II

Поширення: заплава річки Латориці (Ужгородський р-н.), с. Есень, с. Руські Геївці, с. Малі Геївці, с. Соломоново, (Мукачівський р-н.) с. Серне.

Забезпеченість охороною: включені до списку регіонально-рідкісних угруповань, охороняються на території РЛП "Притисянський".

Серед виявлених рідкісних синтаксонів річково-долинних коридорів Закарпаття переважають угруповання першого, найвищого синфітосозологічного класу, представлені 24 синтаксонами – це найцінніші, з огляду

на охорону, і найбільш вразливі, щодо зовнішнього впливу, угруповання. До другого синфітосозологічного класу належать 32 синтаксони, що характеризуються як регіонально рідкісні, досить вразливі угруповання. До третього синфітосозологічного класу включені 8 угруповань, які досить широко розповсюджені й досить стійкі до дії антропогенних факторів, хоча вони й належать до "Червоного списку рідкісних фітоценозів Закарпаття". Це розподіл зазначає високий ступінь ризику для 86% кількості раритетних рослинних угруповань, їх високу загроженість та потребу проведення заходів щодо їх збереження. Хоча абсолютна більшість раритетних угруповань знаходиться у межах природно-заповідного фонду, проте річково-долинні коридори є особливими зонами господарського конфлікту, тому заходи пасивної охорони вже є неефективними. Логічною є нагальна пропозиція щодо розроблення окремого плану дії (природоохоронних заходів) для збереження кожного угруповання, які належать до синфітосозологічних класів I та II.

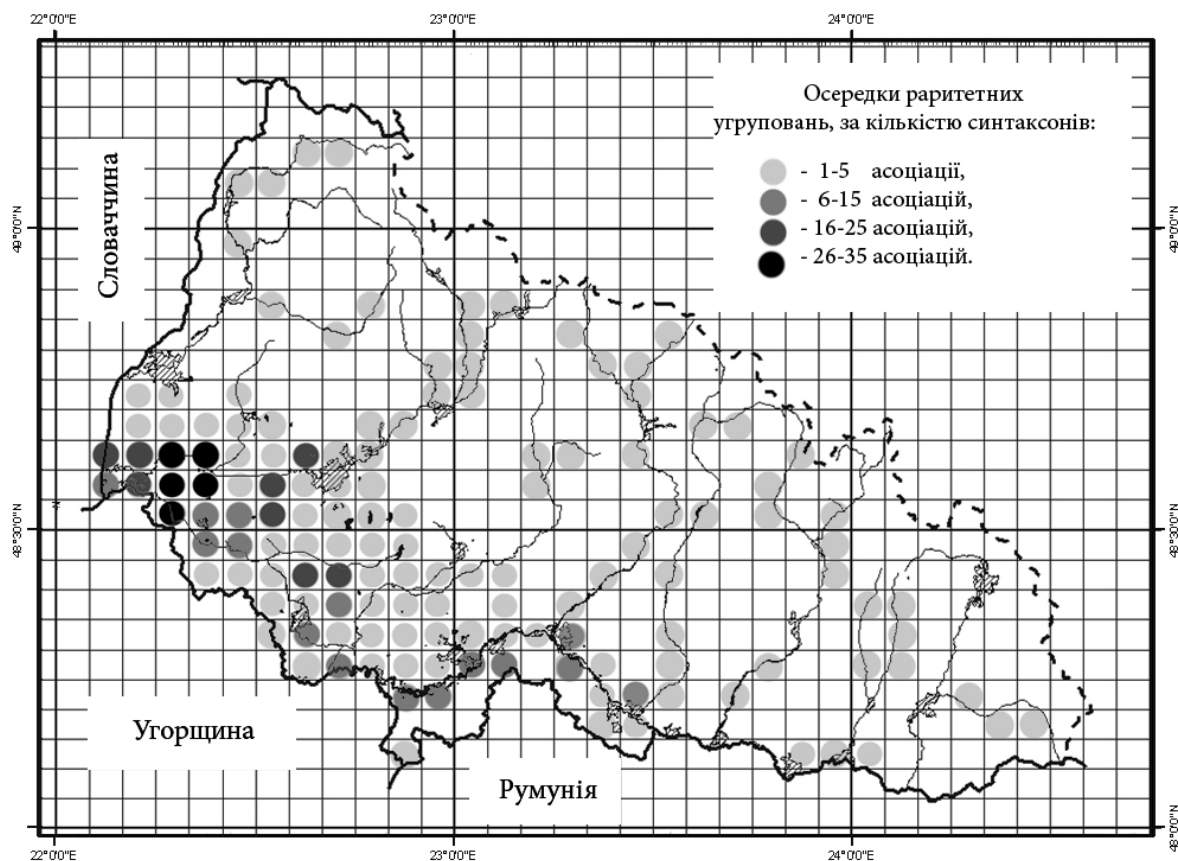


Рис.1. Просторовий розподіл раритетних рослинних угруповань у річково-долинних коридорах Закарпаття

Територіально, особливо цінними з точки зору збереження фіторізноманіття є три відокремлені ділянки, на яких зосереджено численні раритетні угруповання річково-долинних коридорів Закарпаття: Прилаторицька, Приборжавська та Притисянська (Рис.1.). Більшість осередків раритетних угруповань перебувають під охороною в межах Регіонального ландшафтного парку "Притисянський" (6 формацій, представлені 57 асоціаціями), а також Карпатського біосферного заповідника (формація нарциса вузьколистого, представлена, 5 асоціаціями) та сіривільховий ліс, 1 асоціація); та НПП "Синевир", "Зачарований край", "Ужанський парк" (сіривільховий ліс, 1 асоціація). Водночас, частина локалітетів угруповань формації марсилії чотирилистої

(*Marsilea quadrifoliae*) та латаття білого (*Nymphaeeta albae*), потребують включення до території об'єктів природо-заповідного фонду.

Угруповання звичайно-дубових лісів характеризуються рідкісним типом асоційованості пануючих видів головного ярусу із доміантом трав'яно-чагарничкового ярусу – плющом звичайним (*Hedera helix*), який є реліктом. Окрім того, у складі підлеглих ярусів виявлено 6 видів рослин, що занесені до Червоної книги України, *Carex strigosa*, *Crocus heuffelianus*, *Epipactis atrorubens*, *Epipactis purpurata*, *Neottia nidus-avis*, *Leucorum aestivum*, та 6 видів рослин, занесених до включені до "Червоного списку" судинних рослин Закарпатської області [8]: *Oenanthe banatica*, *Peucedanum palustre*,

Platanthera bifolia, *Platanthera chlorantha*, *Succisella inflexa*, *Urtica kioviensis*. Старовікові ліси (120-300 річного віку) становлять 10-15 % від загальної площі окремих територій (урочища "Атак" та "Лапош"). Більш того, площі старовікових рівнинних корінних заплавних панонських лісів на Україні (включаючи частку унікальної дубово-ясеневий фракції) є найвищими серед усіх європейських країн, де знаходяться найчисельніші їхні осередки.

Клейковільхові ліси представлені окремими локалітетами, що збереглися лише на Закарпатській низовині в окремих (чотирьох) лісових урочищах та в заплавно-му лісовому масиві "Егреш" вздовж старого річища р.Тиса. Трансформовані залишки та фрагменти відомі в ур. "Сілаш" на українсько-угорському кордоні та поодинокі – в передгір'ї. З трав'яним ярусом асоційовані 6 видів рослин занесених до регіонального червоного списку, *Hottonia palustris*, *Oenanthe banatica*, *Peucedanum palustre*, *Stellaria palustris*, *Thelypteris palustris*, *Urtica kioviensis*.

Сіровільхові ліси є флористично багатими угрупованнями, їхні місцезростання на території Закарпаття пов'язані з сильно зволженими (мокрими й сирими), часто із застійними водами, що залягають близько до поверхні ґрунту, евтрофними й мезотрофними умовами і на території Закарпаття представлені фрагментарними осередками у заплаві р. Тиси, на передгір'ї. Угруповання *Narcissus angustifolius* Curtis є рідкісними не лише для України але й для Європи. Попри це, вони перебувають під загрозою зникнення через порушення водного-ґрунтового режиму спричиненого необґрунтованими меліоративними заходами. Значну небезпеку збереженню фітоекосистем **Закарпаття** становить проникнення **інвазійних видів** рослин. Так, у складі лісових, нами виявлено значні за площею інвазійні види *Reynoutria x bohemica* Chrtek & Chrtková та *Reynoutria japonica* Houtt. Основною загрозою для раритетних водного типу угруповань є інвазія *Eloidea canadensis* Michx. Найбільший вплив від ряду високоінвазійних видів Закарпаття, таких як *Solidago canadensis*, *S. gigantea*, *Heracleum sosnowskyi*, *Helianthus tuberosus*, *Fraxinus pennsylvanica*, *Impatiens glandulifera*, *Robinia pseudoacacia*, *Reynoutria x bohemica*, *Acer negundo*, *Ambrosia artemisiifolia*, *Echinocystis lobata*, зазнає галереїне угруповання *Alnetum (incanae) matteucciosum (struthiopteris)*

Висновки. На території досліджень у межах річково-долинних коридорів Закарпаття нами виявлено 9 формацій та 64 асоціації раритетних синтаксонів. З них 10 лісових, 5 лучних та 49 водних за критеріями домінантної класифікації. Згідно ознак флористичної класифікації, рідкісні угруповання представлені 6 класами, що охоплюють 7 порядків, 8 союзів, 8 асоціацій та одне безрангове угруповання. Більшість осередків раритетних угруповань перебувають під охороною в межах Регіонального ландшафтного парку "Притисянський" (6 формацій, представлені 57 асоціаціями), а також Карпатського біосферного заповідника (формація нарциса вузьколистого, представлена, 5 асоціаціями) та сіровільховий ліс, 1 асоціація); та НПП "Синевир", "За-

чарований край", "Ужанський парк" (сіровільховий ліс, 1 асоціація). Водночас, частина локалітетів угруповань формації марсилії чотирилистої (*Marsileeta quadrifoliae*) та латаття білого (*Nymphaeeta albae*), потребують включення до території об'єктів природо-заповідного фонду. Асоціації *Carpineto (betuli)–Quercetum (roboris) hederosum (helicis)* та *Alnetum (glutinosae) matteucciosum (struthiopteris)*, що являють собою унікальні осередки фіторізноманіття, перебувають під загрозою знищення через несанкціоновані рубки та проведення необґрунтованих меліоративних заходів і потребують включення у систему природоохоронних територій, як компоненти сполучених територій у складі екологічної мережі. 86% кількості раритетних рослинних угруповань знаходяться у високому ступені ризику та потребують проведення нагальних природоохоронних заходів. Критично важливим для довготривалого забезпечення виживання раритетних синтаксонів є розроблення окремого плану дії для збереження кожного із зазначених угруповань, що належать до синфітосо-логічних класів I та II.

Список використаних джерел

1. Зелена книга України / [Під заг. ред. чл.-корр. НАН України Я.П. Дідуха]. – К.: Альтерпрес, 2009. – 448 с.
2. Кіш Р. Біотопи Natura 2000 на Закарпатській низовині / Кіш Р., Мандрик Є., Мірутенко В. – Ужгород: Мистецька Лінія, 2006. – 64 с.
3. Природні ресурси Закарпаття / Поп С.С. – Ужгород: ТОВ "Спектраль", 2003 – 296 с.:іл.
4. Природа Закарпатської області / За ред. К.І. Геренчука. – Львов: Вища школа. Вид-во при Львов. ун-ті, 1981. – 156 с.
5. Програма и методика биогеоценологических исследований / [под ред. Н.В. Дылиса]. – М.: Наука, 1974. – 404 с.
6. Работнов Т.А. Фитоценология. 3-е изд., перераб. и доп. – М.: Изд-во МГУ, 1992. – 352 с.
7. Стойко С.М. Раритетні фітоценози західних регіонів України (Регіональна "Зелена книга") / Стойко С.М., Мілкіна Л.І., Яценко П.Т. та ін. – Львів: Поллі, 1998. – 190 с.
8. Червоний список Закарпаття. Рішення Закарпатської обласної ради від 4 грудня 2008 року № 707 / [Про затвердження Переліків видів судинних рослин та рослинних угруповань, що підлягають особливій охороні на території Закарпатської області] / – (<http://www.ecores.uzh.ukrtel.net/>)
9. Чопик В.І. Флора і рослинність західної частини Українських Карпат / Чопик В.І. – К.: Вид-во АН УРСР, 1958. – 57с.
10. Шеляг-Сосонко Ю.Р., Стойко С.М. Основные аспекты и теоретические основы охраны природной среды и ее фитоценофона // Зеленая книга Украинской ССР. – К.: Наук. думка, 1987. – С. 9-22.
11. Ellenberg H. Vegetation Ecology of Central Europe. Cambridge: University Press, 1988. – 257 pp.
12. Hennekens S.M., Schaminée J.H.J. Turboveg, a comprehensive database management system for vegetation data // Journal of Vegetation Science. – 2001. – 12. – P. 589–591.
13. Matuszkiewicz J.M., Przewodnik do oznaczania zbiorowisk roślinnych Polski. (wydanie istotnie zmienione w stosunku do wydania z 1981) / J. M. Matuszkiewicz. – PWN. – Warszawa, 2001.
14. Mueller-Dombois D., Ellenberg H. Aims and methods of vegetation ecology. – Caldwell: Blackburn Press, 2002. – 547 pp.
15. Drescher A., Prots B. & Mountford O. 2003. The world of old oxbow lakes, ancient riverine forests and drained mires in the Tisza river basin // Fritschiana 11 (45):43-69.
16. Tichý L. JUICE, software for vegetation classification. – J. Veg. Sci. – 2002. – 13(3). – P. 451–453.
17. Westhoff V., Maarel E. The Braun-Blanquet approach // Handbook of vegetation science. Ordination and classification of vegetation. – Hague, 1973. – Vol. 5. – P. 619–726.
18. Wiedermann R. Pflanzensoziologisches Datenmanagement mittels PC-Programm HITAB 5. Carinthia II, 53. Sonderheft, – 1995. – S. 133–134.

Надійшла до редколегії 28.01.14

О. Омельчук, асп., Б. Проць, канд. биол. наук
Государственный природоведческий музей НАН Украины, Львов

РАРИТЕТНЫЕ ФИТОЦЕНОЗЫ РЕЧНЫХ КОРИДОРОВ ЗАКАРПАТЬЯ

В связи с усилением трансформации естественных экосистем, обязательным условием обеспечения должной охраны флоразнообразия, является учет и проведение оценки распространения раритетных сообществ. В пределах долинно-речных коридоров Закарпаття нами обнаружено 9 формацій и 64 ассоциации раритетных сообществ. Из них 10 лесных, 5 луговых и 49 водных. Большинство локалитетов раритетных сообществ находятся под охраной, в том числе на территории регионального ландшафтного парка "Притисянский" (6 формацій, представленных 57 ассоциациями). Часть локалитетов формации *Marsileeta quadrifoliae* и *Nymphaeeta albae* нуждаются в причислении к территории природо-заповедного фонда. 86% количества раритетных растительных сообществ находятся в высокой степени риска их жизнедеятельности и нуждаются в проведении неотложных активных природоохранных мероприятий.

Ключевые слова: раритетные сообщества, Зеленая книга, распространение, Закарпатье.

O. Omelchuk, PhD stud, B. Prots, PhD.
State Museum of Natural History, National Academy of Sciences of Ukraine, Lviv

RARE PHYTOCOENOSSES OF THE TRANSCARPATHIAN RIVER VALLEY CORRIDOR

The survey and assessment of the status of rare vegetation communities there is obligatory condition for plants protection due to the increasing transformation of natural ecosystems. The 9 formations and 64 associations of the rare plant communities have been found within the valley river corridors of the Transcarpathia. Of these, the 10 belong to forest type, 5 to meadow and 49 associations are linked to wetland communities. The majority of localities of rare plant communities are under protection, particularly on the territory of the Regional Landscape Park "Prytysianskyi" (6 formations represented 57 associations). Yet, the part of the localities of formation Marsileeta quadrifoliae and Nymphaeeta albae still need to be protected. The 86% of the number of rare plant communities are at high risk of their survival and an urgent active nature protection measures are need to be conducted.

Key words: rare communities, Green Book, distribution, Transcarpathia.

УДК 577.121.7

С. Гірін, канд. біол. наук, І. Савінова, мол. наук. співроб.,
Н. Науменко, мол. наук. співроб., І. Антоненко, мол. наук. співроб.
ТОВ "Каскад-Медікал Референс-Лабораторія UBI" пгт. Глеваха Київської області

ВПЛИВ НАДНИЗЬКИХ КОНЦЕНТРАЦІЙ ГЛЮКСАЛЮ ТА МЕТИЛГЛЮКСАЛЮ НА ЕНЕРГЕТИЧНИЙ ТА АЗОТИСТИЙ ОБМІН ЛІМФОЦИТІВ *IN VITRO*

*Досліджували дію наднизьких концентрацій гліюксалю ($1,29 \cdot 10^{-12}$ М) і метилгліюксалю ($1,04 \cdot 10^{-12}$ М) на окремі ланки енергетичного та азотистого обміну лімфоцитів *in vitro* протягом 72 годин. Було показано, що дані активні карбонільні сполуки викликають достовірні зміни таких показників, як альдолаза, лактатдегідрогеназа, аланінамінотрансфераза, аспартатамінотрансфераза, піруват і екстрацелюлярна глюкоза. Встановлено зворотна залежність у швидкості утилізації глюкози, між дослідченими і контрольними культурами лімфоцитів. Виявлено активізація енергетичного обміну при 3-х і 24-х годинному впливі наднизьких концентрацій гліюксалю і метилгліюксалю.*

*Ключові слова: наднизькі концентрації, енергетичний та азотний обміни, лімфоцити, *in vitro*.*

Вступ. Важливим завданням сучасної біології є дослідження різноманітних аспектів метаболізму активних карбонільних сполук (АКС). Найбільш відомими з них є гліюксаль (ГЛ) і метилгліюксаль (МГЛ). Дані сполуки постійно присутні у нормально функціонуючій клітині в якості основних та побічних продуктів окремих метаболічних шляхів: перекисного окиснення ліпідів та білків, не ферментативного окиснення деяких амінокислот та ін. В організмі концентрація ГЛ і МГЛ знаходиться в межах $1 \cdot 10^{-7}$ М – $1 \cdot 10^{-8}$ М [1]. У високих концентраціях (більше $1 \cdot 10^{-7}$ М), ГЛ і МГЛ є цитотоксичними сполуками, з тривалістю життя до однієї години. Вони здатні глікозилувати білки, ліпіди та нуклеїнові кислоти, порушуючи їх функцію [2]. У клітині існує декілька механізмів інактивації ГЛ та МГЛ, здатних підтримувати концентрації даних АКС на рівні, що близький до фізіологічного. Найбільш важливу роль у даному процесі відіграє система глутатіону. В результаті, в організмі, який нормально функціонує, існує постійний динамічний баланс між процесами утворення та деградації АКС, який може порушуватись з тих чи інших причин. [1, 2]. Так, розвиток багатьох патологій різного ґенезу, а також вплив шкідливих екзогенних факторів, в тому числі іонізуючого опромінення, можуть призводити до накопичення у організмі ГЛ та МГЛ. При цьому їх інтрацелюлярна концентрація зростає, що призводить до структурно-функціональних порушень в організмі. Цей процес дістав назву карбонільного стресу [2, 3]. Високі концентрації ГЛ та МГЛ роблять свій внесок в розвиток атеросклеротичного пошкодження судин, виникнення мікроангіопатій, нефропатій і нейропатій. Вони стимулюють секрецію запальних цитокінів, експресію ендотеліального фактора росту судин та багато іншого [3]. Карбонільний стрес ускладнює перебіг онкологічних захворювань, цукрового діабету I та II типів, катаракти, хвороби Альцгеймера та ін. [4]. На даний час окрім патологічного впливу ГЛ та МГЛ в рамках карбонільного стресу, біологи все більш активно вивчають функції даних високореактивних сполук у різноманітних фізіологічних процесах [2, 4]. Зокрема виявлена важлива роль ГЛ і МГЛ у агрегації тромбоцитів, хемотаксисі моноцитів,

клітинної сигналізації, регуляції експресії генів, імунній відповіді, енергетичному обміні [5]. Доведена участь ГЛ та МГЛ у боротьбі організму з патогенними бактеріями, вірусами, а також раковими клітинами [4]. Akhand A. з колегами показали, що ГЛ та МГЛ ініціюють деякі сигнальні шляхи у культурі ендотеліоцитів людини, що свідчить про участь даних АКС у клітинних месенджерних процесах [4, 6].

Таким чином, ГЛ і МГЛ із впевненістю можна назвати високоактивними інтрацелюлярними сполуками, які відіграють важливу роль у життєдіяльності організму. Здійснюються спроби використання високих (набагато вище за фізіологічні) концентрацій даних АКС з терапевтичною метою. У той же час лишаються маловивченими ефекти наднизьких концентрацій екзогенних ГЛ та МГЛ на різноманітні внутрішньоклітинні процеси. На сьогодні, механізми дії наднизьких концентрацій даних АКС достеменно не відомі. Однак, враховуючи структурно-функціональні особливості ГЛ та МГЛ, закономірним буде очікування найрізноманітніших ефектів у ланках метаболізму за умов дії субфізіологічних концентрацій даних сполук (менше $1 \cdot 10^{-8}$ М).

Беручи це увазі усе вищеведене, метою нашої роботи було дослідження впливу наднизьких концентрацій гліюксалю та метилгліюксалю на деякі ланки енергетичного та азотистого обміну лімфоцитів *in vitro*.

Матеріали та методи. Об'єктом дослідження були лімфоцити людини, які отримували з донорської крові дорослих людей, 8 чоловіків та 8 жінок, у віці від 25 до 62 років, без виражених клінічних симптомів захворювань, серйозних хронічних патологій та шкідливих звичок. Забір периферичної крові проводили з ліктьової вени у вакуумні пробірки з антикоагулянтом EDTA(K₂). Отримання лімфоцитів з донорської крові проводили за допомогою метода седиментації на градієнті щільності Histopaque-1077 Hybri-Max® ("Sigma", США), щільність $1,077 \pm 0,001$ г/мл [7]. Перед нашаровуванням на градієнт щільності кров з антикоагулянтом розводили стерильним PBS без Ca²⁺ і Mg²⁺ ("Sigma", США) 1:1,25. Центрифугування проводили при 400g впродовж 30 хв. Отриману мононуклеарну фракцію трикратно відмива-

ли стерильним PBS без Ca^{2+} і Mg^{2+} . Лімфоцити відокремлювали від моноцитів, використовуючи адгезію останніх до пластику (інкубували мононуклеари у чашці Петрі впродовж 30 хв). В лімфоцитарній фракції проводили підрахунок клітин та оцінку їх життєздатності у камері Горяєва після фарбування трипановим синім. Пул лімфоцитів від одного донора ділили на дві рівні частини, які у подальшому використовували у контрольних та дослідних культурах. Лімфоцити інкубували в середовищі RPMI-1640, яке містило 5% фетальної сироватки теляти, 40 мМ L-глутаміна; 10 тис. ОД пеніциліна і 10 мкг стрептоміцину (усі реактиви "Sigma", США) в 100 мл середовища у стерильних чашках Петрі (Sarstedt AG&Co, Німеччина) за 37°C у атмосфері, що містить 5% CO_2 , та за вологості 95%. Кінцева концентрація лімфоцитів у контрольних та дослідних культурах складала $3 \cdot 10^6$ /мл. Після закінчення шістнадцятигодинного терміну інкубації у дослідні культури лімфоцитів вносили гліюксаль та метилгліюксаль у 0,9% розчині NaCl ("Heel" Німеччина). Кінцеві концентрації гліюксалю та метилгліюксалю складала відповідно $1,29 \cdot 10^{-12}$ М і $1,04 \cdot 10^{-12}$ М. Наведені концентрації є наднизькими [8]. Одночасно у контрольні культури лімфоцитів вносили відповідні об'єми 0,9% розчину NaCl. До внесення гліюксалю та метилгліюксалю у дослідні культури лімфоцитів та 0,9% розчину NaCl у контрольні, а також після закінчення 3, 6, 24, 48 та 72 годин отримували проби культурального середовища, а також суспензії лімфоцитів. Останні отримували шляхом трикратного відмивання від культурального середовища PBS-ом без Ca^{2+} і Mg^{2+} (центрифугування при 1200 g 10 хв.). На наступному етапі з суспензії лімфоцитів отримували проби (лізати) шляхом трикратного заморожування-відтанення.

У лімфоцитах визначали активність ключових ферментів азотистого обміну аланінамінотрансферази (ЕС 2.6.1.2) (АЛТ), аспартатамінотрансферази (ЕС 2.6.1.1) (АСТ). Інтенсивність гліколізу оцінювали за активністю лактатдегідрогенази (ЕС 1.1.1.27) (ЛДГ) та альдолази (ЕС 4.1.2.13) [9], за вмістом піровиноградної кислоти у лімфоцитах, а також за зміною концентрації глюкози у культуральному середовищі [10]. В усіх лізатах визначали вміст білку [10]. Вищенаведені спектрофотометричні методи реалізовували за допомогою наборів реактивів фірм "ELitech", (Франція), "Sentinel Diagnostics", (Італія) та "НПО Абрис+", (Росія). Усі виміри проводили на біохімічному аналізаторі Microlab 300, "Vital Scientific", Нідерланди. Активність ферментів виражали у У/л/г білку, концентрацію глюкози та піровиноградної кислоти, відповідно, у мМоль/л/г білку та мкМоль/л/г білку. Для оцінки статистично значимих змін у дослідних пробах, в порівнянні з контрольними, використовували непараметричний критерій знаків G. Для оцінки характеру та сили взаємозв'язків між контрольною та дослідною групами використовували показники парної кореляції r. Для усіх видів аналізу критичний рівень значимості для статистичних критеріїв приймали таким, що дорівнює $p < 0,05$ [11].

Результати та їх обговорення. В експерименті, що був проведений in vitro протягом 72 годин, було досліджено вплив наднизьких концентрацій ГЛ та МГЛ на енергетичний і азотистий обміни лімфоцитів. Визначали інтрацелюлярну активність ключових ферментів, а також концентрація найбільш важливих метаболітів даних процесів (табл. 1 та 2).

Таблиця 1. Показники енергетичного та азотистого обміну лімфоцитів за умов дії на них гліюксалю та метилгліюксалю ($M \pm m$, $n=16$)

Показник	Лімфоцити	Тривалість досліджу					
		0 годин	3 години	6 годин	24 години	48 годин	72 години
Піруват, мкМоль/л/г білка	контроль	46,07±0,65	80,10±5,22	100,23±7,32	84,36±11,86	74,42±11,81	77,49±14,29
	дослід	46,10±0,07	104,32±7,23*	67,18±7,00*	131,87±25,52*	84,35±16,93	85,92±17,41
Альдолаза, У/л/г белка	контроль	93,55±6,59	74,25±4,53	87,60±17,88	62,08±4,85	78,47±6,05	60,28±4,21
	дослід	93,00±6,01	69,47±4,81	58,99±12,61	81,68±15,38	74,67±4,39	87,99±7,09*
ЛДГ, У/л/г білка	контроль	933,1±38,5	1006,2±31,9	942,3±33,3	1005,6±63,3	1260,7±90,3	1127,5±142,3
	дослід	909,7±30,1	918,2±28,2*	993,4±33,6	1101,8±64,9	1115,9±135,6	1474,2±120,9
АСТ, У/л/г білка	контроль	26,58±1,94	21,21±1,26	22,55±1,58	22,77±1,32	21,85±1,60	34,99±3,81
	дослід	26,59±2,00	21,59±1,16	21,90±1,60	26,09±1,48*	23,00±1,22	44,75±4,86
АЛТ, У/л/г білка	контроль	7,97±1,93	1,68±0,35	2,01±0,42	1,56±0,24	2,97±0,43	3,71±0,96
	дослід	7,98±2,01	1,91±0,36	1,35±0,31	2,43±0,50	0,67±0,09*	1,81±0,78

Примітка: у цій і наступних таблицях вірогідні різниці показників дослідних груп порівняно до контрольної: * – $P < 0,05$ для критерію знаків G.

Таблиця 2. Концентрація глюкози в середовищі культивування лімфоцитів за умов дії на них гліюксалю та метилгліюксалю, мМоль/л/г білка ($M \pm m$, $n=16$)

Група тварин	Тривалість досліджу					
	0 годин	3 години	6 годин	24 години	48 годин	72 години
контрольна	7,71±0,09	7,89±0,05	7,98±0,22	7,91±0,07	8,00±0,13	6,96±0,07
дослідна	7,70±0,08	7,64±0,10*	7,73±0,38	7,54±0,57	7,50±0,14*	7,80±0,26*

Проведений експеримент дозволив виявити значні зміни в концентрації глюкози в культуральному середовищі. Так, вірогідне зниження екстрацелюлярного вмісту даного субстрату гліколізу, спостерігалось вже через 3 години після початку впливу наднизьких доз ГЛ та МГЛ (табл. 2). Тоді як шестигодинне та 24-х годинне культивування лімфоцитів з даними АКС не призвели до вірогідних змін у концентрації глюкози. Однак, вже через 48 годин після початку надслабкого впливу на лімфоцити ГЛ та МГЛ, було виявлено вірогідне зниження в 1,1 рази екстрацелюлярного вмісту глюкози. На

кінцевому етапі експерименту (72 години) в культуральному середовищі спостерігалось вірогідне збільшення концентрації глюкози на 12% ($P < 0,05$) (табл. 2). Методами кореляційного аналізу була виявлена зворотна залежність ($r = -0,67$, при $P < 0,05$) між динамікою дослідного й контрольного екстрацелюлярного вмісту глюкози протягом всього експерименту. На нашу думку, така суттєва різниця в тенденції та швидкості утилізації глюкози, між дослідними та контрольними культурами лімфоцитів, може розцінюватись, як ефект надслабкого впливу ГЛ та МГЛ. В результаті проведених досліджень

було виявлено зростання інтрацелюлярної концентрації одного з ключових метаболітів енергообміну – піровиноградної кислоти більше ніж на 30% ($P < 0,05$) за умов трьох годинного впливу даних АКС (табл. 1). Такі зміни можуть бути результатом окислення в лімфоцитах субстратів, які містяться в культуральному середовищі (глюкоза, амінокислоти). Однак, шестигодинний вплив на лімфоцити обраних АКС привів до вірогідного зниження концентрації піровиноградної кислоти в дослідних пробах на 33% ($P < 0,05$). Ще більш значущі зміни вмісту піровиноградної кислоти були виявлені по закінченню 24 годин інкубації їх в присутності надмалих концентрацій ГЛ та МГЛ. Рівень пірувата при цьому в дослідних пробах був в 1,6 рази вище, ніж в контрольних. 48-ми та 72-х годинний надслабкий вплив даних АКС не супроводжувались вірогідними змінами показників піровиноградної кислоти лімфоцитів (табл. 1). Це може свідчити про однакову інтенсивність утворення та використання даного метаболіту у внутрішньоклітинному диханні.

В результаті проведених досліджень було встановлено, що активності ферментів, що досліджувались, найменше піддаються надслабкому впливу ГЛ та МГЛ. Це може бути обумовлено дією складної та багаторівневої системи регуляції їх функціонування [12]. Активність одного з ключових ферментів гліколізу – альдолази, зазнала змін лише на завершальному етапі експерименту, за умов 72-х годинного надслабкого впливу ГЛ та МГЛ на лімфоцити. При цьому в дослідних пробах вона була в 1,5 рази вища за контрольні (табл. 1). Рівень активності ЛДГ є інформативним показником, який характеризує інтрацелюлярне перетворення пірувату ↔ лактату. За даних умов проведення досліджень активність ЛДГ зберігалась на контрольному рівні майже протягом усього експерименту. Виключення складає трьохгодинний надслабкий вплив на лімфоцити ГЛ та МГЛ, що призвів до вірогідного зниження активності ЛДГ на 9% ($P < 0,05$) (табл. 1).

АСТ і АЛТ є ключовими ферментами азотистого обміну, які напряду пов'язані з процесом внутрішньоклітинного дихання. В той же час, АСТ і АЛТ є основними ланками, які забезпечують координацію та зв'язок між білковим та вуглеводним обмінами [13]. Нами була виявлена пряма кореляційна залежність між активністю АСТ і АЛТ в дослідних та контрольних культурах лімфоцитів (відповідно $r = 0,97$ і $r = 0,88$ при $P < 0,05$). Це може свідчити про відсутність значного впливу наднизьких концентрацій даних АКС на азотистий обмін лімфоцитів. В той же час, 48-ми годинний надслабкий вплив ГЛ та МГЛ на лімфоцити викликав вірогідне зниження активності АЛТ в 4,4 рази (табл. 1). Проте активність АСТ була статистично значимо вище контролю на 15% ($P < 0,05$) за умов 24-х годинного надслабкого впливу ГЛ та МГЛ (табл. 1). Слід зазначити, що на сьогодні не існує чітко сформульованої теорії, яка б описувала механізми дії наднизьких концентрацій біологічно активних речовин на організм, або на які-небудь його структури. Це, безумовно, ускладнює аналіз результатів будь-яких досліджень, де використовувались би надслабкі впливи факторів різної природи на біологічні об'єкти.

Дослідження, що були проведені, показали, що за умов 3-х годинного впливу на лімфоцити обраних чинників відбуваються найбільш значимі зміни в внутрішньоклітинному енергообміну за весь час проведення експерименту. Так, на цьому етапі спостерігалось вірогідне падіння екстрацелюлярної концентрації глюкози (табл. 2). Це стало результатом інтенсифікації гліколітичного шляху окислення даного субстрату, на користь чого свідчить зростання внутрішньоклітинної концентрації пірувата (табл. 1). Слід відзначити, що за даних

умов (3-х годинний вплив) інгібування ЛДГ (табл. 1), також могло внести свій внесок в підвищення вмісту піровиноградної кислоти в дослідних культурах лімфоцитів. Наведені зміни показників, які характеризують енергетичний обмін, супроводжувались відсутністю вірогідних змін в роботі трансаміназ лімфоцитів (АСТ і АЛТ). Це в свою чергу могло опосередковано сприяти збільшенню концентрації пірувата, шляхом залучення в енергетичний обмін амінокислот, що входять до складу культурального середовища [13]. Як відомо, високий вміст піровиноградної кислоти активує піроватдекарбоксілазний комплекс тим самим, створюючи умови для утворення ацетил-СоА – основного субстрату циклу лимонної кислоти [12]. Тому можливо припустити, що трьохгодинний надслабкий вплив на лімфоцити ГЛ та МГЛ активує не тільки анаеробний, але й аеробний енергетичний обмін.

Шести годинна дія обраних АКС не викликала суттєвих змін в процесі анаеробного дихання, а також азотистого обміну. Практично всі показники, що були досліджені знаходились у межах контрольних значень. Виключення складає рівень піровиноградної кислоти. Її концентрація в лімфоцитах була вірогідно нижче, а ніж в контрольних пробах (табл. 1), що може бути результатом інтенсифікації цілої низки процесів: окислювального декарбоксилування, циклу лимонної кислоти і окислювального фосфорилування – основного етапу аеробного дихання. Також не виключено використання пірувата в анаболічних процесах. Він може витрачатись на синтез амінокислот, зокрема, аланіну [13, 14]. Не зважаючи на знижену внутрішньоклітинну концентрацію піровиноградної кислоти, за умов шестигодинного надслабкого впливу на лімфоцити ГЛ та МГЛ, можна зробити висновок щодо стабільної інтенсивності азотистого та енергетичного обмінів.

На наступному етапі експерименту (24-х годинна дія обраних АКС) було виявлено різке зростання концентрації пірувата, а також активності АСТ (табл. 1). Такі зміни в біохімічному гомеостазі цілком закономірні. Підвищена активність АСТ забезпечила приток додаткової кількості оксалоацетату до мітохондрій, за рахунок утворення його з аспарагінової кислоти [13]. Все це, разом з нормально функціонуючим аеробним гліколізом, призвело до підвищення концентрації пірувата. Слід відзначити, що на даному етапі (24-х годинна дія обраних АКС) було виявлено найбільшу інтрацелюлярну концентрацію піровиноградної кислоти за весь час проведення експерименту, що вказує на значну інтенсифікацію енергетичного обміну лімфоцитів. Закономірно, що такі зміни не могли не вплинути на швидкість енергетичного та азотистого обмінів наступного етапу експерименту. Як результат, 48-ми годинний вплив на лімфоцити обраних АКС завершився падінням активності АЛТ на фоні зниження в культуральному середовищі концентрації глюкози (табл. 1 і 2). При цьому інші показники енергетичного і азотистого обмінів знаходились на контрольному рівні, що свідчить про нормальний перебіг даних процесів. На нашу думку, саме зниження концентрації глюкози стало причиною падіння активності АЛТ, функцією якої є підтримка на фізіологічному рівні пулу внутрішньоклітинного аланіну [12, 13]. В умовах же дефіциту глюкози й вкрай економного витрачання пірувата, закономірним є інгібування АЛТ [13].

72-х годинна дія на лімфоцити обраних АКС призвела до значного збільшення концентрації глюкози в культуральному середовищі (табл. 2). Не виключено, що за даних умов підвищення вмісту глюкози відіграє ефекторну функцію, яка направлена на гексокіназну реакцію гліколізу. В результаті це призвело до активі-

зації всього каскаду гліколітичних реакцій [14, 15], що було виражено в рості альдолазної активності (табл. 1).

Висновки. Таким чином, надслабкий вплив гліоксалу ($1,29 \cdot 10^{-12}$ М) та метилгліоксалу ($1,04 \cdot 10^{-12}$ М) викликає ефекти в окремих ланках енергетичного і азотистого обмінів лімфоцитів *in vitro*, про що свідчать вірогідні зміни активності альдолази, ЛДГ, АСТ, АЛТ й концентрації пірувата, а також вмісту глюкози в культуральному середовищі. Слід зазначити, що за даних умов проведення експерименту азотистий обмін зазнав менших змін, ніж енергообмін. В переважній більшості активності АСТ і АЛТ змінювались внаслідок зрушень, які відбувались в внутрішньоклітинному енергетичному обміні.

Отримані результати дозволили виявити активізацію енергообміну лімфоцитів за умов 3-х та 24-х годинного надслабкого впливу ГЛ та МГЛ, що було виражено в закономірних вірогідних змінах в концентраціях основних його метаболітів: пірувата й глюкози культурального середовища. При цьому спостерігалась значна різниця в метаболізмі глюкози між дослідними й контрольними культурами лімфоцитів ($r = -0,67$, при $P < 0,05$), що є результатом надслабкого впливу ГЛ та МГЛ.

Список використаних джерел

1. Ellis E. M. Reactive carbonyls and oxidative stress: potential for therapeutic intervention // Pharmacol. Ther. – 2007. – Vol. 15, № 1. – P. 13–24.
2. Загайко А.Л., Воронина Л.Н., Красильникова О.А. Состояние системы регенерации оксида азота в условиях карбонильного стресса у крыс // Украинський Біофармацевтичний Журнал. – №5 (10). – 2010. – С. 52–57.

3. Turk Z. Glycotoxines, carbonyl stress and relevance to diabetes and its complications // Physiol. Res. – 2010. – №2. – P. 147–156.

4. Лозінський Л.М., Семчишин Г.М. Біологічні аспекти неензиматичного глікозильовання // Укр. Біохім. Журнал. – 2012. – Т. 84, №5. – С. 16–37.

5. Amore A., Coppo R. Immunological basis of inflammation in dialysis // Nephrol. Dial. Transplant. – 2002. – Vol. 17. – № 8. – P. 16–24.

6. Akhand A. A., Hossain K., Kato M. et al. Glyoxal and methylglyoxal induce aggregation and inactivation of ERK in human endothelial cells. Free radicals biology and medicine. – №31; 2001. – P. – 1228–1235.

7. Winchester, R.J., and Ross, G. Methods for enumerating lymphocyte populations in Manual of Clinical Immunology/ Rose, N. R., and Friedman, H. (Eds.), American Society for Microbiology, Washington, D.C. – 1976. – P. 64–76.

8. Бурлакова Е. Б., Конрадов А. А., Мальцева Е. Л. Действие сверхмалых доз биологически активных веществ и низкоинтенсивных физических факторов // Хим. физика. 2003. – Т. 22, № 2. – С. 21–40.

9. Tietz N.W. et al. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd Edition WB Saunders Company, Philadelphia, PA. – 1995. – 374 p.

10. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник/Меньшиков В.В., Делекторская Л.Н., Золотницкая Р. П. и др.; Под ред. В. В. Меньшикова. – М.: Медицина. – 1987. – 368 с.

11. Лапач С. Н., Чубенко А. В., Бабиц П. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. – 2-е изд., перераб. и доп. – К.: МОРИОН. – 2001. – С. 143–144.

12. Ленинджер А. Основы биохимии. – М.: Мир, 1985. – Т. 1. – 367 с.

13. Рослый И. М., Водолажская М.Г. Правила чтения биохимических анализов: Руководство для врача. – М.: ООО "Издательство Медицинское информационное агентство". 2010. – 96 с.

14. Березов Т. Т., Коровкин Б. Ф. Биологическая химия: Учебник. – 3-е изд., перераб. и доп. – М.: Медицина. – 1998. – 704 с.

15. Казакова В. В., Елкина Н. М., Луцки Е. Г. и др. Характеристика интенсивности гликолиза и образования гликозилированной формы гемоглобина в эритроцитах при кардиомиопатии // Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины. – 2011. – Т. 1, №2 (2). – С. 23–25.

Надійшла до редакційної колегії 13.03.14

С. Гирин, канд. биол. наук, І. Савинова, мл. науч. сотр., Н. Науменко, мл. науч. сотр., І. Антоненко, мл. науч. сотр.
ООО "Каскад-Медикал Референс-Лаборатория UBI" пгт. Глеваха Киевської області

ДЕЙСТВИЕ СВЕРХНИЗКИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ ГЛИОКСАЛЯ И МЕТИЛГЛИОКСАЛЯ НА ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ И АЗОТИСТЫЙ ОБМЕН ЛИМФОЦИТОВ *in vitro*

Исследовали действие сверхнизких концентраций глиоксала ($1,29 \cdot 10^{-12}$ М) и метилглиоксала ($1,04 \cdot 10^{-12}$ М) на отдельные звенья энергетического и азотистого обменов лимфоцитов *in vitro* на протяжении 72 часов. Было показано, что данные активные карбонильные соединения вызывают достоверные изменения таких показателей, как альдолаза, лактатдегидрогеназа, аланинаминотрансфераза, аспаратаминотрансфераза, пируват и экстрацеллюлярная глюкоза. Установлена обратная зависимость в скорости утилизации глюкозы, между опытными и контрольными культурами лимфоцитов. Выявлена активизация энергетического обмена при 3-х и 24-х часовом воздействии сверхнизких концентраций глиоксала и метилглиоксала.

Ключевые слова: сверхнизкие концентрации, энергетический и азотистый обмены, лимфоциты, *in vitro*.

S. Girin PhD., I. Savinova, jun.research., N. Naumenko, jun.research., I. Antonenko, jun.research.
"Cascade-Medical Reference Laboratory UBI" v.Glevaha Kiev region

THE INFLUENCE OF GLYOXAL AND METYL GLYOXAL'S ULTRA-LOW-CONCENTRATIONS ON ENERGY AND NITROGEN METABOLISMS OF LYMPHOCYTES *in vitro*

The effect of ultra low glyoxal ($1,29 \cdot 10^{-12}$ M) and methylglyoxal ($1,04 \cdot 10^{-12}$ M) concentrations on separate elements of energy and nitrogen metabolisms in lymphocytes was researched *in vitro* during 72 hours. It was indicated that these active carbonyl compounds cause significant changes of such indices as aldolase, lactic dehydrogenase, alanine aminotransferase, aspartate amino transferase, pyruvate, and extracellular glucose. Inverse relationship was established between glucose utilization speeds in test and control lymphocyte cultures. Energy metabolism activation was discovered in 3 and 24 hour exposures to ultra low glyoxal and methylglyoxal concentrations.

Keywords: ultra low concentrations, energy and nitrogen metabolisms, lymphocytes, *in vitro*.

УДК 615.065 / 616-007-053.1

О. Галушка, ст. науч. співроб., Т. Зазуляк, канд. біол. наук,
О. Кузьмінов, науч. співроб., О. Грушка, науч. співроб.,
І. Паздерська, науч. співроб.

Центральна науково-дослідна лабораторія та лабораторія промислової токсикології
Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького, Львів

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ОЦІНКА ВПЛИВУ ЛОРАТАДИНУ НА ВАГІТНИХ САМИЦЬ-ЩУРІВ

Встановлено, що антигістамінний препарат лоратадин при пероральному введенні упродовж 20 днів вагітності в дозах 1 мг/кг і 4,8 мг/кг маси тіла у вагітних самиць не викликає ембріотоксичного ефекту.

Ключові слова: лоратадин, ембріотоксичний ефект.

Вступ. Лоратадин широко використовується у медичній практиці як один з найефективніших антигістамінних засобів при лікуванні різної алергічної патології [1,2]. Препарат є блокаторм тривалої дії H1 – гістамінових рецепторів, пригнічує вивільнення гістаміну та

лейкотрієну C4 з опасистих клітин, попереджає розвиток і полегшує перебіг алергічних реакцій, зменшує проникність капілярів, попереджує розвиток набряку тканин, знімає спазми гладкої мускулатури. Протиалергічний ефект розвивається через 30 хв., досягає макси-

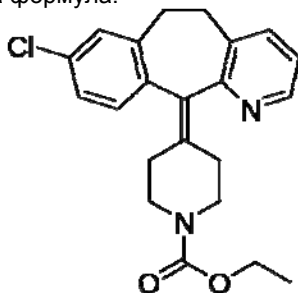
муму через 8-12 год. і триває 24 год. [3]. Лоратадин не впливає на центральну нервову систему і не викликає звикання (не проникає через гематоенцефалічний бар'єр). Лоратадин має вигідний фармакокінетичний профіль (кратність прийому – 1 раз на добу), не чинить кардіотоксичної та седативної дії. Крім того, він має велику кількість генеричних версій, що значно знижує вартість таких лікарських засобів і робить їх доступними для більшості пацієнтів [4].

Профіль безпеки лоратадину дозволив віднести препарат до списку безрецептурних лікарських засобів. Проте у зв'язку з низькою розчинністю лоратадину у воді його біологічна доступність при введенні *per os* недостатня. Як наслідок, виникає реальне фармакотерапевтичне переважання організму значними дозами препарату [5, с. 89]. А оскільки лоратадин має здатність проникнення через плацентарний бар'єр [6], це може обумовити несприятливу дію на розвиток ембріона і плоду.

Метою роботи було визначення впливу лоратадину на вагітних самиць-щурів.

Матеріали і методи. Лоратадин – етиловий ефір-4-(8-хлор-5,6-дигідро-11Н-бензо-[5,6]циклопента-[1,2-*b*]піридин-11-іліден)-1-піперидинкарбонової кислоти. Синоніми: Веро-Лоратадин, Кларитин, Ломелан, Лоратин, Кларотадін. Фармакологічна група: антигістамінні, протиалергічні, антиексудативні, противосвербіжні препарати. Хімічний клас – ефіри двоосновних органічних кислот, CAS №: 79794-75-5. Емпірична формула: $C_{22}H_{23}N_2ClO_2$

Структурна формула:



Молекулярна маса: 382,9. За зовнішнім виглядом – це порошок білого кольору, помірно розчинний у воді, дуже мало розчинний в гексані, практично нерозчинний в спирті і хлороформі. Температура плавлення: 131-

135°C. Виробник субстанції "FARMACHEM SA Chem Limited" Індія. Вміст основної речовини 98,5-101,0% в перерахунку на суху речовину.

Ембріотоксичний ефект лоратадину досліджували на вагітних самках білих щурів, які утримувались в умовах віварію Львівського національного медичного університету на стандартному харчовому раціоні, згідно з правилами "належної лабораторної практики" (GLP) і дотриманням загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених 1 Національним конгресом з біоетики (Київ, 2000). Для спаровування брали статевозрілих самиць масою 180-200 г в стадії проеструсу. Висаджування з самцями проводили у співвідношенні 1:2 і першим днем вагітності вважали день виявлення сперматозоїдів у вагінальних мазках. Затруєння препаратом проводили натще зондом внутрішньошлунково упродовж 20 днів вагітності в дозах 1 мг/кг і 4,92 мг/кг, що перевищувало максимальну добову терапевтичну дозу (10 мг, або виходячи з середньої ваги людини 60 кг – 0,17 мг/кг) відповідно в 5,9 рази і 28,9 рази. Динаміку маси тіла самиць визначали на 1, 3, 6, 12 і 20 добу вагітності. Евтаназію самок проводили декапітацією під наркозом на 20 добу вагітності. Розтин проводили за загальноприйнятою методикою. При розтині підраховували кількість живих плодів і тих, що загинули, кількість жовтих тіл вагітності і плацент. Визначали рівень предімплантаційної (1-13 доба) та постімплантаційної (з 14 по 20 добу) загибелі плодів. Вимірювали і зважували плоди та плаценти. Визначали середній краніо-каудальний розмір в мм, масу плодів, середню кількість плодів в посліді. Половину від числа узятих плодів фіксували в рідині Буена для подальшого вивчення внутрішніх органів за методикою Wilson [7], останні заливали 96% етиловим спиртом для подальшого вивчення їх скелета за методикою Dawson [8].

Статистичну обробку отриманих даних проводили з використанням *t*-критерію Стюдента [9]. В усіх випадках різницю вважали вірогідною при $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення. При щоденному спостереженні за вагітними самками не відмічено їх загибелі впродовж експерименту. Введення лоратадину не позначалось на тривалості вагітності самок, не було зафіксовано абортів та передчасних пологів. У вагітних самок була відсутня клінічна картина отруєння. Маса тіла тварин зростала впродовж експерименту (рис.).

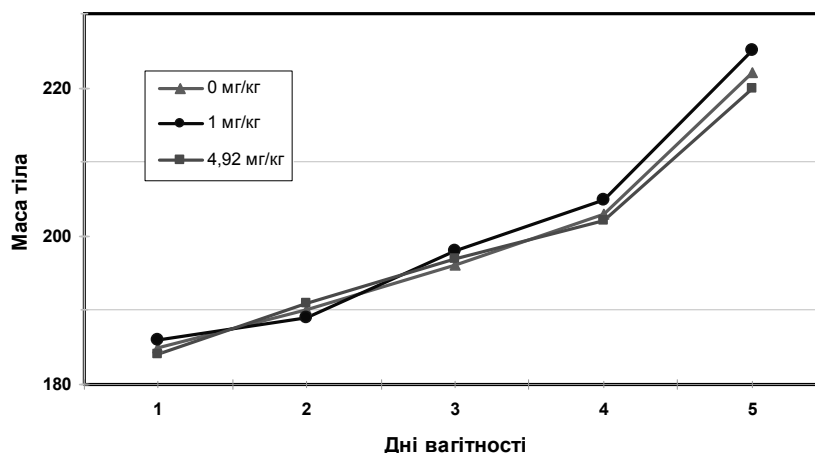


Рис. 1. Динаміка маси тіла вагітних самиць при введенні лоратадину з 1 по 20 добу вагітності

У ході проведення макроскопічного огляду плодів самок, які отримували лоратадин під час усієї вагітності, виявлено, що в усіх ембріонів контрольної та дослідних груп були відсутні вади лицевого і мозкового черепа. Сам

череп мав овально-довгасту форму. Вушна раковина та повіки очей були закриті. Передня черевна стінка зарощена, без ознак пупкової грижі. Хвіст був звичайної довжини. Кінцівки мали добре розвинуте плече, передпліч-

чя, кість, стегно, гомілку та стопу. Положення, форма кінцівок, кількість пальців та їх розміри у ембріонів дослідних і контрольних перебували в межах норми. На шкірі були відсутні ознаки порушення пігментації.

Дослідженням ембріогенезу встановлено, що показники вагітних самок дослідних груп відповідали аналогічним показникам контрольних щуриць (табл. 1).

Таблиця 1. Вплив лоратадину на показники ембріогенезу (n=10)

Показники	Дослідні групи M±m				Контрольна група M±m
	1 мг	t	4,92 мг	t	
Кількість жовтих тіл	7,90±0,43	0,32	7,70±0,45	1,43	8,40±0,19
Кількість місць імплантації	7,90±0,43	0,32	7,70±0,45	1,43	8,40±0,19
Кількість живих плодів	7,40±0,50	0,51	7,00±0,60	1,13	7,90±0,53
Кількість резорбції	0,50±0,17	0,46	0,70±0,40	1,00	0,30±0,15
Загальна ембріональна смертність, %	6,78±2,32	0,44	9,21±5,00	0,75	5,11±2,12
Доімплантаційна смертність, %	0	0	0	0	0
Післяімплантаційна смертність, %	6,78±2,32	0,44	9,21±5,00	0,44	0,40±0,16

Показники доімплантаційної, післяімплантаційної та загальної ембріональної летальності в дослідних групах не мали вірогідних відмінностей від показників у контролі. Такі показники ембріогенезу, як кількість жовтих тіл, кількість місць імплантації та передімплантаційна

загибель (%) суттєво не відрізнялися в контрольній та експериментальних групах.

У дослідних тварин маса плодів та їх краніо-каудальний розмір, маса плацент та їх діаметр не мали достовірних відмінностей від показників контрольних тварин (табл. 2).

Таблиця 2. Результати морфометричного дослідження плодів після введення лоратадину

Показники	Дослідні групи M±m				Контрольна група M±m
	1 мг	t	4,92 мг	t	
Маса плода, г	2,38±0,17	1,10	2,28±0,215	1,26	2,90±0,44
Краніо-каудальний розмір, мм	30,00±2,60	0,98	29,24±2,39	1,22	33,83±2,92
Маса плаценти, г	0,46±0,026	0,50	0,49±0,033	2,00	0,44±0,03
Діаметр плаценти, мм	12,93±0,16	1,32	12,00±1,85	0,70	13,30±0,23

Висновки. Отримані результати дозволяють стверджувати, що лоратадин в дозах 1 мг/кг та 4,92 мг/кг маси тіла у вагітних самиць не викликає ембріотоксичного ефекту.

Список використаних джерел

- Абатуров А.Е. Лоратадин – антигистаминное средство II поколения // Здоровье ребенка. – 2008. – №3(12). – С. 51-55.
- Смоленов И.В., Елкина Т.Н., Иванова Н.А., Просекова Е.В., Серебрянская А.А., Фассахов Р.С., Федотова Н.В., Чепурная М.М. Ломилан в лечении аллергического ринита у детей: сравнительная эффективность // Атмосфера. Пульмонология и аллергология. – 2003. – №1. – С. 25-28.
- Дидковский Н.А., Малашенкова И.К. Лоратадин (Кларидол) в терапии аллергических и псевдоаллергических заболеваний // Русский медицинский журнал. – 2011. – №18. – С. 1156-1160.

- Зайченко Г.В., Яковлева Л.В., Брюханова Т.О., Колос О.М. Сучасні протипалігмічні препарати: клініко-фармакологічні та фармакоеконімічні особливості // Український медичний часопис. – 2012. – №6(92). – С.134-136.

- Новиков О.О., Жиликова Е.Т., Сабельникова Н.Н., Васильев Г.В., Попухина Т.С., Новикова М.Ю. Разработка методов контроля качества лоратадина // Научные ведомости Серия Медицина. Фармация. – 2010. – № 22 (93). – Выпуск 12/2. – С. 89-92.

- Шипулина Е.А. Кларидол – применение в терапии atopического дерматита у детей // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2004. – №2. – Том 1. – С. 267-269.

- Wilson J.G. Teratology principles and Techniques. – 1965. – P. 251-277.

- Експериментальне вивчення ембріотоксичної дії лікарських засобів (методичні рекомендації). – К. 2000. – 40 с.

- Сернов Л.Н., Гацура В.В. Статистические методы оценки достоверности результатов фармакологических исследований. Элементы экспериментальной фармакологии. – М., 2000. – С. 308-315.

Надійшла до редколегії 15.02.14

А. Галушка, ст. наук. сотр., Т. Зазуляк, канд. биол. наук,

А. Кузьминов, наук. сотр., О. Грушка, наук. сотр.,

И. Паздерська, наук. сотр.

Центральная научно-исследовательская лаборатория и лаборатория промышленной токсикологии
Львовского национального медицинского университета имени Данила Галицкого, Львов

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ЛОРТАДИНА НА БЕРЕМЕННЫХ САМОК-КРЫС

Установлено, что антигистаминный препарат лоратадин при пероральном введении в течение 20 дней беременности в дозах 1 мг/кг и 4,8 мг/кг массы тела у беременных самок не вызывает эмбриотоксического эффекта.

Ключевые слова: лоратадин, эмбриотоксический эффект.

A. Galushka, jun.research., T. Zozulyak, PhD., A.Kuzminov, jun.research.,

O.Grishka, jun.research., I.Pazderska, jun.research

Central Research Laboratory of Industrial Toxicology and laboratoriya National Lviv Medical University Danila Galickogo, Lviv

EXPERIMENTAL ASSESSMENT OF LORATADINE PREGNANT FEMALE RATS

It was found that loratadine doesn't cause an embryotoxic effect for pregnant female rats, when it administered orally in doses 1 mg/kg and 4,8 mg/kg within 20 days of pregnancy.

Key words: loratadine, embryotoxic effect.

УДК 577.152.34:612.62:616

І. Вовчук, д-р біол. наук
Одеський медичний університет ім. І. І. Мечникова, Одеса**ВПЛИВ КАТІОНІВ ДВОВАЛЕНТНИХ МЕТАЛІВ НА АКТИВНІСТЬ КАРБОКСИПЕПТИДАЗИ А НЕМАЛІГНІЗОВАНОГО ТА ПУХЛИННОГО ЯЄЧНИКА**

Досліджено вплив катіонів двовалентних металів на активність карбоксипептидази А, яка була отримана із немалігнізованого та пухлинних тканин яєчника жінок. Встановлено, що всі досліджені катіони двовалентних металів проявляли негативний вплив на активність карбоксипептидази А як неуразеного, так і пухлинного яєчника, однак потужність впливу була неоднаковою. Ензим, який був виділений із злоякісної пухлини яєчника найбільш чутливий до впливу катіонів двовалентних металів.

Ключові слова: карбоксипептидаза А, пухлина, яєчник.

Вступ. Лізосомальна карбоксипептидаза А (КФ 3.4.2.1), що гідролізує амінокислоти з С-кінця (за винятком аргініну, лізину та проліну) отримана з деяких тканин людини: підшлункової залози [12, 14], легенів [11], шкіри [11] і нирок [13].

Згідно з дослідженнями деяких авторів на активацію та каталітичну активність протеолітичних ензимів негативно впливають такі катіони важких металів, як Cu^{2+} , Hg^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , а негативний вплив Mg^{2+} , Ca^{2+} є незначним [5, 15, 16, 19].

За літературними даними більшість карбоксипептидаз є або класичними металоензимами, або метало залежними пептидазами, для прояву активності яких необхідні певні катіони одно- або, найчастіше – двовалентних металів [4, 8, 17].

Для більшості відомих карбоксипептидаз іони Mn^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} є активаторами, а іони Ca^{2+} , в більшості випадків, стабілізаторами активності ензиму [1, 4, 8, 17]. Проте, відомості про структуру і фізико-хімічні властивості виділених ферментів в більшості випадків є неповними.

У зв'язку з цим мета наших досліджень полягала у вивченні впливу катіонів двовалентних металів на активність карбоксипептидази А, виділеної з тканини немалігнізованого яєчника, доброякісної і злоякісної пухлин яєчника жінок.

Матеріали та методи. Матеріал для дослідження був наданий патоморфологічною лабораторією Одеського обласного онкологічного диспансеру. Патоморфологічну і гістологічну верифікацію діагнозів по вимогах ВОЗ [6] проводили гістологи сертифікованої і ліцензованої патоморфологічної лабораторії Одеського обласного онкологічного диспансеру. Отримання анатомічних матеріалів для досліджень, дотримання етичних і правових норм згідне: Гельсінської Декларації (1964 р.), Конвенції про захист прав і достоїнств людини у зв'язку з викорис-

танням досягнень біології і медицини (Конвенція про права людини і біомедицину 1996 р.), закону України "Про трансплантацію органів і інших анатомічних матеріалів людині" (1999 р.) забезпечувалося медичною установою, що надавала матеріал для дослідження, згідно з угодою про спільні дослідження. Пацієнтки були поінформовані та дали письмову згоду на використання біологічного матеріалу для біохімічних досліджень.

Для дослідження впливу катіонів на активність карбоксипептидази А, виділеної з немалігнізованого і пухлинного яєчника, 0,1 мл розчину ензиму і 0,1 мл розчину катіону в концентрації 5×10^{-4} М інкубували протягом 60 хв при температурі 37°C . Про ефективність дії катіонів судили за величиною гідролізу 2,0 мМ карбобензоксиглутамілфенілаланіну за 30 хв інкубації при 37°C при рН 5,2 [3, 9]. Використовували водні розчини солей двовалентних металів: хлоридів Hg^{2+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} , Ba^{2+} , Mg^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} і ацетатів – Pb^{2+} , Zn^{2+} . Інгібування або активування ензиму виражали у відсотках по відношенню до його активності в пробі без катіону двовалентного металу.

Статистичну обробку отриманих результатів проводили за загальноприйнятими методами варіаційної статистики за допомогою U-критерію Мануа-Уїтні [2].

Результати та їх обговорення. Було встановлено, що за оптимального значення рН активність карбоксипептидази А як немалігнізованого так і пухлинного яєчника не збільшувалася у присутності катіонів, що є найбільш поширеними активаторами або стабілізаторами металоензимів (рис. 1). Всі досліджені катіони двовалентних металів пригнічували активність карбоксипептидази А немалігнізованого яєчника та ензима доброякісної і злоякісної пухлини яєчника, проте величина цієї дії, була неоднаковою.

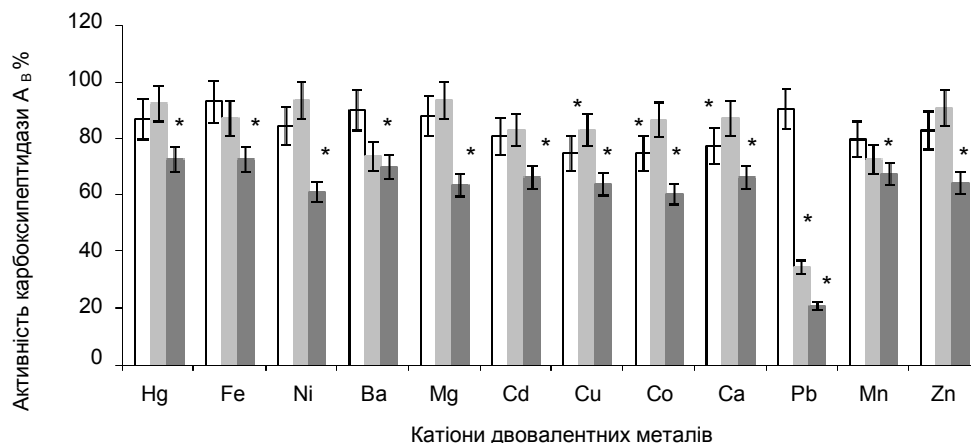


Рис. 1. Вплив катіонів двовалентних металів на активність карбоксипептидази А немалігнізованого та пухлинного яєчника (n = 6)

Примітка: активність ензиму представлена в % по відношенню до показників контролю (0,1 мл розчину ензиму без катіонів, який був прогрітий 60 хв при 37°C), що були прийняті за 100%; $P < 0,05$ по відношенню до контролю.

□ – немалігнізований яєчник; ■ – доброякісна пухлина яєчника; ■ – злоякісна пухлина яєчника.

Найбільш чутливою до дії як іонів важких металів так і до дії металів-активаторів і стабілізаторів був ензим злорякисної пухлини яєчника, активність якого у присутності цих модифікаторів знижувалася в середньому на 31,2 %. Активність карбоксипептидази А немалігнізованого яєчника на 21,7 % знижувалася у присутності іонів Cd^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} а інші іони, включаючи й іони важких металів Hg^{2+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} проявляли менш виражену негативну дію.

Активність карбоксипептидази А доброякісної пухлини яєчника в досить високій мірі знижувалася лише у присутності іонів Ba^{2+} і Mn^{2+} (в середньому на 26,7 %), а негативний ефект інших іонів не перевищував 17,5 %.

Карбоксипептидаза А немалігнізованого яєчника була малочутливою до дії важкого металу Pb^{2+} (рис. 2), а чутливість збільшувалася за посилення малігнізації та збільшення концентрації іонів Pb^{2+} в інкубаційному середовищі (зниження активності на 34,7 і 79,1 %, відповідно).

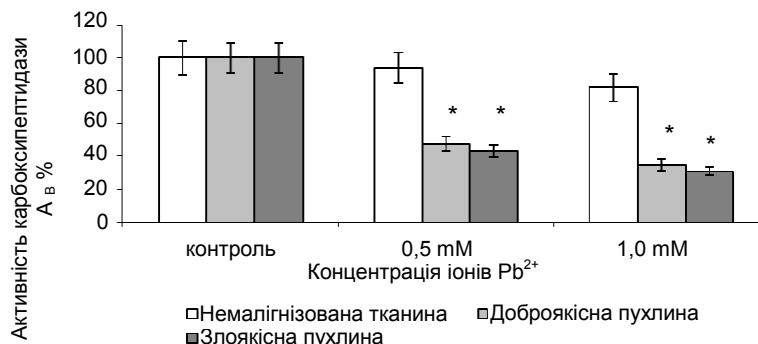


Рис. 2. Вплив катіонів Pb^{2+} на активність карбоксипептидази А немалігнізованого та пухлинного яєчника (n = 6)

Примітка: активність ензима вказана по відношенню до показників контролю (без іонів Pb^{2+}), прийнятому за 100 %; * - вірогідне ($P < 0,05$) зменшення активності ензима по відношенню до показників немалігнізованого яєчника

Низька чутливість ферменту немалігнізованого яєчника до іонів Pb^{2+} , що діють на SH – групи ензима може бути пояснена з одного боку високим вмістом SH – груп в молекулі ензима, а з іншого боку, можливо, особливістю просторової структури ензима немалігнізованого яєчника, що приводить до просторової "захищенності" цієї функціональної групи.

Понижений вміст SH-груп в молекулі ензима, пухлини яєчника, що було встановлено нами в попередніх дослідженнях, вірогідно сприяє зміні просторової конфігурації даного ензима. Такі зміни, у свою чергу, приводять до підвищення чутливості до іонів Pb^{2+} ензима патологічно зміненого яєчника, чутливість якого прямо пропорційна посиленню малігнізації.

Таким чином, з одного боку, дія катіонів проявляється у вигляді неспецифічного інгибування активності карбоксипептидази А як немалігнізованого так і пухлинного яєчника, а з іншого боку чутливість виділеного ензима до дії катіонів безпосередньо залежить від особливостей структури ферменту. Одним з можливих механізмів дії катіонів металів може бути вплив останніх на конформаційні зміни в активному центрі. Так, на прикладі серінових протеаз було показано інгибування активності протеаз катіонами важких металів за рахунок взаємодії з тристином каталітичної триади [5].

Чутливість карбоксипептидази А яєчника до дії катіонів двовалентних металів знижується в наступному ряду:

а) ензим немалігнізованого яєчника:

Cu^{2+} і $\text{Co}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Hg}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Ba}^{2+} > \text{Fe}^{2+}$

б) ензим доброякісної пухлини яєчника:

$\text{Pb}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Ba}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Fe}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Hg}^{2+} > \text{Ni}^{2+}$ і Mg^{2+}

в) ензим злорякисної пухлини яєчника:

$\text{Pb}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Ba}^{2+} > \text{Fe}^{2+} > \text{Hg}^{2+}$

Отримані нами результати частково збігаються з результатами досліджень інших авторів [10, 7, 18], які встановили посилену сорбцію іонів нікелю гепатоцитами щурів [18] і показали, що активність карбоксипептидази А кишківника щурів знижується у присутності іонів кадмію [10].

Висновок. Отримані нами результати дозволяють заключити, що катіони досліджених двовалентних металів негативно впливають на активність карбоксипептидази А немалігнізованого та пухлинного яєчника. Більш чутливою до дії як важких металів так і модифікаторів є карбоксипептидаза А злорякисної пухлини яєчника.

Список використаних джерел

1. Колодзейская М.В., Пилявская А.С. Пептидазы / Под ред. М. В. Колодзейской – Киев: Наук. Думка, 1982.
2. Лапач С.Н. Чубенко А.В., Бабич П.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / Под ред. С. Н. Лапач – К.: Морион, 2000.
3. Олешко Г.И., Ярыгина Т.И., Зорина Е.В. Разработка унифицированной методики количественного определения суммы свободных аминокислот в лекарственном растительном сырье и экстракционных препаратах // Фармация. – 2011. – № 3. – Р. 14–17.
4. Пилявская А.С. Выделение и свойства карбоксипептидазы *Streptomyces Griseus*: дисс. канд. биол. наук : 03.00.04 / – К., 1977.
5. Соколовская Л.И., Сломинский А.Ю., Волков Г.Л. Индукция каталитической активности плазминогена моноклональным антителом IV-1c в присутствии двухвалентных катионов металлов и α_2 плазминогена // Биохимия. – 2006. – Т. 71, № 6. – С. 778–785.
6. Хмельницкий О. К. Патоморфологическая диагностика гинекологических заболеваний / Под ред. О. К. Хмельницкого – Санкт-Петербург: Сотис, 1994.
7. Alonso-del-Rivero M, Trejo SA, Rodríguez de la Vega M, González Y, Bronsoms S, Canals F, et al. A novel metallopeptidase-like enzyme from the marine annelid *Sabellastarte magnifica*—a step into the invertebrate world of proteases. *FEBS J.* 2009 Sep;276(17):4875–90.
8. Austin BP1, Tözsér J, Bagossi P, Tropea JE, Waugh DS. The substrate specificity of *Metarhizium anisopliae* and *Bos taurus* carboxypeptidases A: insights into their use as tools for the removal of affinity tags. *Protein Expr Purif.* 2011 May;77(1):53–61.
9. Bradshaw RA, Walsh KA, Neurath H. The amino acid sequence of bovine carboxypeptidase A. *Biochemistry.* 1971 Mar 16;10(6):961–72.
10. Eriyamremu GE1, Asagba SO, Onyeneke EC, Adaikpoh MA. Changes in carboxypeptidase A, dipeptidase and Na^+/K^+ ATPase activities in the intestine of rats orally exposed to different doses of cadmium. *Biometals.* 2005 Feb;18(1):1–6.
11. Goldstein SM, Kaempfer CE, Kealey JT, Wintroub BU. Human mast cell carboxypeptidase. Purification and characterization. *J Clin Invest.* 1989 May;83(5):1630–6.
12. Marinkovic DV, Marinkovic JN. Studies of human carboxypeptidase A purification and properties from human pancreas. *Biochem Med.* 1975 Sep;14(1):125–34.
13. Michel A, Nortier J, Humblet A, Paradis C, De Prez E, Deschodt-Lanckman M. Cleavage of atrial natriuretic peptide by a kidney membrane-bound carboxypeptidase A. *Peptides.* 1998;19(5):907–12.

14. Moulard M, Michon T, Kerfelec B, Chapus C. Further studies on the human pancreatic binary complexes involving procarboxypeptidase A. FEBS Lett. 1990 Feb 12;261(1):179-83.

15. McGrath ME, Haymore BL, Summers NL, Craik CS, Fletterick RJ. Structure of an engineered, metal-actuated switch in trypsin. Biochemistry. 1993 Mar 2;32(8):1914-9.

16. Nowak P, Zgirski A. Effects of metal ions on activity of plasmin. Biol Trace Elem Res. 2003 Summer;93(1-3):87-94.

17. Reznik SE, Fricker LD. Carboxypeptidases from A to Z: implications in embryonic development and Wnt binding. Cell Mol Life Sci. 2001 Nov;58(12-13):1790-804.

18. Shimada H, Funakoshi T, Inoue T, Kojima S. The effects of sulfhydryl blockers and metal ions on nickel accumulation by rat primary hepatocyte cultures. Toxicol Lett. 2000 Dec 20;118(1-2):87-92.

19. Stack S, Gonzalez-Gronow M, Pizzo SV. The effect of divalent cations on the conformation and function of human plasminogen. Arch Biochem Biophys. 1991 Jan;284(1):58-62.

Надійшла до редколегії 21.03.14

И. Вовчук, д-р биол. наук

Одесский медицинский университет имени И.И. Мечникова, Одесса

ВЛИЯНИЕ КАТИОНОВ ДВОУВАЛЕНТНЫХ МЕТАЛЛОВ

НА АКТИВНОСТЬ КАРБОКСИПЕПТИДАЗЫ А НЕМАЛИГНИЗИРОВАННОГО И ОПУХОЛЕВОГО ЯИЧНИКА

Исследовано влияние катионов двухвалентных металлов на активность карбоксипептидазы А, выделенной из немалигнизированной и опухолевых тканей яичника женщин. Установлено, что все исследованные катионы двухвалентных металлов проявляли негативное действие на активность карбоксипептидазы А как непораженного, так и опухолевого яичника, однако величина воздействия была неодинаковой. Энзим, выделенный из злокачественной опухоли яичника наиболее чувствителен к воздействию катионов двухвалентных металлов.

Ключевые слова: карбоксипептидаза А, опухоль, яичник.

I. Vovchuk, DSc.

Odessa I.I.Mechnikov national university, Odessa

INFLUENCE OF CATIONS OF BIVALENT METALS

ON ACTIVITY OF CARBOXYPEPTIDASE A NON MALIGNANT AND TUMOR OVARIUM

Influence of cations of bivalent metals on activity of carboxypeptidase A purified from non malignant and tumour tissues of ovarium of women was investigated. Investigational cations of bivalent metals inhibited activity of carboxypeptidase A as the non malignant, so tumour ovarium, however much a size of influence was different. Enzyme which purified from the tumour of ovarium most sensible to influence of cations of bivalent metals.

Keywords: carboxypeptidase A, tumor, ovarium.

УДК: 616.33-008.821.14+577.151.042

С. Пилипенко, докторант, О. Короткий, канд. біол. наук,

Т. Берегова, проф., Л. Остапченко, проф.

КНУ імені Тараса Шевченка, Київ

ВПЛИВ МУЛЬТИПРОБІОТИКА "АПІБАКТ®" НА ВМІСТ ТБК-АКТИВНИХ ПРОДУКТІВ І ФУНКЦІОНУВАННЯ ГЛУТАТІОНОВОЇ ЛАНКИ АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ В СИРОВАТЦІ КРОВІ ЩУРІВ З ТРИВАЛОЮ ШЛУНКОВОЮ ГІПОАЦИДНІСТЮ

Тривале зниження шлункової секреції гідрохлоридної кислоти викликало збільшення вмісту ТБК-активних продуктів, активності глутатіонпероксидази і глутатіонтрансферази, зменшення рівня відновленого глутатіону і активності глутатіонредуктази в сироватці крові щурів. Введення мультипробіотика "Апібакт®" щурам з тривалою шлунковою гіпоацидністю знижувало активність процесів перекисного окислення ліпідів і справляло модулюючий вплив на функціонування глутатіонзалежної системи антиоксидантного захисту в сироватці крові.

Ключові слова: шлункова гіпоацидність, мультипробіотик "Апібакт®", перекисне окиснення ліпідів, антиоксидантна система.

Вступ. До основних факторів ризику розвитку раку в шлунку належать гіпергастринемія [12, 17] та дисбактеріоз [18, 21], які розвиваються внаслідок тривалого зниження секреції гідрохлоридної кислоти в шлунку, яке реєструється у хворих на атрофічний гастрит. В останні роки з'явилися дані про негативні наслідки тривалого застосування антисекреторних препаратів, які проявляються у виді дисбактеріозу та гастриту [22]. В зв'язку з відсутністю методів профілактики негативних наслідків гіпергастринемії та встановленої здатності пробіотиків частково усувати та зменшувати негативні наслідки тривалої гіпоацидності шлункового соку [10], дослідження ряду авторів спрямовані на вивчення впливу пробіотиків на механізми канцерогенезу в шлунку. Пробіотичні мікроорганізми не лише нормалізують мікрофлору травного тракту, але й здатні впливати на імунні реакції, продукувати вітаміни, гормони, антимікробні субстанції та коротколанцюгові жирні кислоти, виявляють антиканцерогенні й антимутагенні властивості, тощо [20, 29]. Серед широкого арсеналу пробіотичних продуктів нашу увагу привернув "Апібакт®" (АП), який належить до мультипробіотиків групи "Симбітер®". На відміну від інших пробіотиків,

мультипробіотики групи "Симбітер®" містять біомасу живих клітин багатокомпонентного симбіозу пробіотичних мікроорганізмів (біфідобактерії, лактобацил, лактококів, пропіонових бактерій, оцтових бактерій та їх біологічно активних метаболітів (вітаміни, ферменти, полісахариди та ін.). Ефективність бактерій мультипробіотика АП збільшується при введенні екстракту прополісу з масовою часткою 2,5%.

На сьогодні накопичена достатня кількість даних про прополіс як природний антисептик з антибактеріальним, антивірусним і антигрибковим ефектом та імуностимулюючими та антиоксидантними властивостями [14, 26, 27].

Відомі дані про роль антиоксидантів на ранніх етапах онтогенезу, значення імунітету в захисті організму від розвитку запальних процесів, в тому числі і раку, та вище зазначені властивості пробіотиків і прополісу обумовили мету даної роботи.

Мета дослідження. Визначити вміст ТБК-активних продуктів, відновленого глутатіону та активність глутатіонзалежних ферментів у сироватці крові щурів з три-

валою шлунковою гіпоацидністю та за умов введення мультипробіотика "Апібакт®".

Об'єкт і методи досліджень. Дослідження проведені на білих нелінійних щурах з початковою вагою 160-180 г, які рандомізовано були розділені на чотири групи по 10 тварин в кожній. Маніпуляції з тваринами та їх утримання в віварії здійснювались згідно міжнародних рекомендацій та національного законодавства про проведення медико-біологічних досліджень [8].

Контрольним щурам (I група) упродовж 28 днів вводили 0,2 мл внутрішньочеревинно (в/о) та 0,5 мл перорально воду для ін'єкцій. Другій групі тварин перорально вводили мультипробіотик "Апібакт®" (виробництва ТОВ "О.Д.Пролісок", Україна) в дозі 0,14 мл/кг, розчинений у 0,5 мл води для ін'єкцій. Гіпоацидний стан у щурів (III група) моделювали щоденним введенням протягом 28 днів омепразолу (ОМ) (виробництва "Sigma-Aldrich", США), який є блокатором H^+-K^+-ATP ази – ключового ферменту синтезу соляної кислоти парієтальними клітинами шлунку. ОМ вводили в/о один раз на добу в дозі 14 мг/кг, який був розчинений у 0,2 мл води для ін'єкцій. Щурам IV групи одночасно з введенням ОМ вводили мультипробіотик АП в дозі 0,14 мл/кг, розчинений у 0,5 мл води для ін'єкцій. За добу до проведення експерименту тварини мали доступ лише до води.

Щурів умертвляли методом дислокації шийних хребців через добу після останнього введення препаратів, відбирали для дослідження кров з серця. В отриманій сироватці крові визначали вміст ТБК-активних продуктів спектрофотометрично [2, 6], відновленого глутатіону флуорометричним методом [19] та активність глутатіонпероксидази, глутатіонтрансферази, глутатіонредуктази спектрофотометрично [1].

Статистичну обробку результатів досліджень з використанням критерію Стюдента для оцінки достовір-

ності проводили за допомогою програми Statistica 7.0. Відмінності вважали достовірними при $p \leq 0,05$.

Результати досліджень та їх обговорення. Процеси перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) належать до основних метаболічних реакцій, що відбуваються в клітині. Не викликає сумніву, що присутність вільних радикалів у організмі має певне фізіологічне значення. Швидкість вільнорадикального окислення в органах і тканинах підтримується на певному рівні. При пошкоджуючих впливах порушення ПОЛ є ранньою, універсальною неспецифічною ланкою патогенезу багатьох захворювань. Варто особливо підкреслити, що зміна вільнорадикального окислення звичайно передуює появі клінічних симптомів ушкодження [3]. Тому нами було досліджено вміст ТБК-активних субстанцій, як вторинних продуктів ПОЛ, в сироватці крові щурів з тривалою гіпоацидністю шлункового соку та за умов одночасного введення ОМ для пригнічення кислотності шлункового соку та мультипробіотика АП.

В результаті проведених досліджень встановлено, що пригнічення шлункової секреції соляної кислоти у щурів упродовж 28 днів за допомогою ОМ призводило до збільшення вмісту ТБК-активних продуктів в сироватці крові на 88% ($p \leq 0,05$) порівняно з контролем (табл.). Одержані дані свідчать про активацію процесів ПОЛ, яке може бути пов'язане з порушеннями прооксидантно-антиоксидантної рівноваги за умов розвитку дизбіотичних процесів у травному тракті. Отриманий ефект корелює з даними, які свідчать про активацію інтенсивності процесів ПОЛ з одночасним підвищенням рівня ТБК-активних продуктів у хворих на хронічний гастрит із секреторною недостатністю [7]. Треба зазначити про існування результатів інших досліджень, які свідчать про антиоксидантні властивості ОМ [11], що може бути пояснено тим, що в даному випадку вивчалась короткотривала дія ОМ, під час якої не відбувався розвиток негативних наслідків тривалої гіпоацидності в шлунку.

Таблиця. Вміст ТБК-активних продуктів, відновленого глутатіону та активність глутатіонзалежних ферментів у сироватці крові щурів з тривалою шлунковою гіпоацидністю за умов введення мультипробіотика "Апібакт®" ($M \pm m$, $n=10$)

ПОКАЗНИКИ	Контроль	Апібакт	Омепразол	Омепразол + Апібакт
Вміст ТБК-активних продуктів, нмоль/мг білка ¹	15,31 $\pm$ 1,51	7,58 $\pm$ 0,72*	28,72 $\pm$ 2,59*	8,97 $\pm$ 0,82*/#
Вміст відновленого глутатіону, нмоль/мг білка	0,259 $\pm$ 0,017	0,233 $\pm$ 0,021	0,218 $\pm$ 0,018*	0,228 $\pm$ 0,02
Активність глутатіонпероксидази, нмоль GSSG/хв $\times$ мл	41,11 $\pm$ 4,06	62,07 $\pm$ 5,91*	57,56 $\pm$ 5,68*	56,23 $\pm$ 5,01*
Активність глутатіонтрансферази, нмоль GSR/хв $\times$ мл	138,03 $\pm$ 10,67	77,42 $\pm$ 7,01*	181,71 $\pm$ 15,78*	134,66 $\pm$ 11,21#/^
Активність глутатіонредуктази, нмоль NADPH/хв $\times$ мл	0,91 $\pm$ 0,07	1,11 $\pm$ 0,09*	0,78 $\pm$ 0,046*	0,85 $\pm$ 0,082^

* – $p \leq 0,05$ порівняно з контролем; # – $p \leq 0,05$ порівняно з групою тварин, яким вводили омепразол; ^ – $p \leq 0,05$ порівняно з групою тварин, яким вводили "Апібакт®".

У результаті дослідження вмісту ТБК-активних продуктів у сироватці крові щурів нами було встановлено зниження їх рівня на 50,5 % ($p \leq 0,05$) за умов введення мультипробіотика АП (табл. 1), що може свідчити про здатність пробіотичних мікроорганізмів або наявних у складі прополіса біофлавоноїдів, що входять до вмісту АП, пригнічувати процеси ПОЛ. Встановлений нами ефект корелює з дослідженнями [15, 23], в яких була показана здатність різних штамів молочно-кислих бактерій пригнічувати процеси ПОЛ, захоплювати вільні радикали, посилювати експресію генів антиоксидантної системи в різних тканинах.

Введення мультипробіотика АП за умов 28-добової шлункової гіпоацидності зменшувало вміст ТБК-активних продуктів на 41,4 і 68,7 % відповідно порівня-

но з контролем та групою тварин, яким вводили лише ОМ. Виявлений ефект може бути пов'язаний як з властивістю мікроорганізмів і поліфенольних сполук прополіса, що входять до складу АП, знижувати інтенсивність процесів ПОЛ, так і зі здатністю даного мультипробіотика активувати систему антиоксидантного захисту (АОЗ). Тому подальшим етапом наших досліджень було визначення вмісту відновленого глутатіону та глутатіонзалежних ферментів в сироватці крові щурів з тривалою шлунковою гіпоацидністю та за умов введення АП, адже відомо, що для сироватки крові характерна висока антиоксидантна активність через наявність у ній значної кількості низько- та високомолекулярних сполук як ферментативної, так і неферментативної природи [4].

Важливу роль у реалізації антирадикального та антипероксидного захисту клітин відіграє глутатіонова система, до складу якої входять відновлений глутатіон (ВГ) і комплекс ферментів – глутатіонпероксидази (ГП), глутатіонтрансферази (ГТ) та глутатіонредуктази (ГР). Компоненти глутатіонової ланки АОЗ інгібують більшість вільнорадикальних реакцій, забезпечують безрадикальне відновлення ліпогідропероксидів, інактивують різні токсичні речовини та сприяють підтриманню антиоксидантного гомеостазу [16].

Дослідження вмісту ВГ в сироватці крові (табл.) не виявило достовірних змін цього показника в усіх дослідних групах тварин порівняно з контролем, крім щурів з 28-добовим пригніченням шлункової секреції соляної кислоти, в яких спостерігалось зниження його вмісту на 16 % ($p \leq 0,05$). Встановлений ефект може бути зумовлений, як підвищенням використання глутатіону глутатіонзалежними ферментами (ГП, ГТ) та глутаредоксином, так і прямим окисненням чи відновленням глутатіоном SH-груп білків [5]. Крім того, однією з імовірних причин такого зменшення може бути також зниження активності ГР, яка відновлює окислений глутатіон (ОГ) до ВГ. Цей фермент використовує НАДФН, який значно знижується за умов оксидативного стресу [13].

Глутатіон служить кофактором для ГП, яка здатна відновлювати як пероксид водню, так і органічні гідроперекиси, окислюючи глутатіон до ОГ. ГП елімінує перекиси стеринів, нуклеїнових кислот, білків, захищає лізосомальні мембрани від окислення. Крім того, відомо, що ГП здатна функціонувати як пероксинітротредуктаза, попереджуючи оксидативну та нітрозативну модифікації біомолекул [24].

Введення мультипробіотика АП інтактним тваринам спричиняло зростання на 51 % ($p \leq 0,05$) активності ГП (табл.). Такий ефект може бути пов'язаний зі здатністю пробіотичних мікроорганізмів АП, як і інших пробіотиків [9], стимулювати систему АОЗ. На фоні відсутності запального процесу, зменшення інтенсивності процесів ПОЛ і нормального вмісту ВГ і функціонування ГТ і ГР дане підвищення не є пошкоджуючим фактором для організму щурів та може бути пов'язане з наявністю біофлавоноїдів у складі прополіса, який містить АП.

28-добове пригнічення шлункової секреції соляної кислоти, зумовлене введенням ОМ, призводило до підвищення активності ГП на 40% ($p \leq 0,05$) порівняно з контролем, що на фоні збільшення вмісту ТБК-активних продуктів і активності ГТ, а також зменшення вмісту ВГ, відновний потенціал якого ГП використовує для відновлення H_2O_2 , може свідчити про мобілізацію антиоксидантної системи захисту у відповідь на зростання рівня АФК, зокрема й пероксиду водню.

Одночасне введення АП і ОМ супроводжувалось зростанням ГП на 37 % порівняно з контролем. Зафіксоване підвищення активності ГП в сироватці крові за умов тривалої шлункової гіпоацидності на фоні зменшення вмісту ТБК-активних продуктів, нормалізації вмісту ВГ, активності ГТ і ГР може свідчити про активацію цього ензиму не лише внаслідок введення ОМ, а й – АП, який підвищує активність ГП також при окремому введенні інтактним тваринам. Значну роль в активації даного ферменту, ймовірно, відіграють поліфенольні сполуки прополіса та метаболіти життєдіяльності пробіотичних мікроорганізмів.

ГТ – універсальні ферменти, які запобігають пошкодженню ДНК, мітохондрій та інших життєво важливих центрів клітини від реактивних метаболітів і в результаті значно збільшують стійкість клітини і організму в цілому. ГТ беруть активну участь в детоксикації канцерогенних та мутагенних речовин, продуктів окислюваль-

ного стресу, відновлюють окиснені ацили фосфоліпідів до оксикислот [25].

Введення мультипробіотика АП протягом 28 діб спричиняє зменшення активності ГТ на 44 % ($p \leq 0,05$), порівняно з контролем (табл.), що на фоні зменшення ТБК-активних продуктів і нормального вмісту ВГ може свідчити про виключення даного ферменту.

На відміну від групи тварин, яким вводили АП, в щурів з 28-добовим пригніченням шлункової секреції соляної кислоти активність ГТ зростала на 32% ($p \leq 0,05$), порівняно з контролем, що за умов зростання вмісту ТБК-активних продуктів може відображати залучення цього ферменту до руйнування перекисів. Крім того відомо, що ГТ бере участь у детоксикації ліків [25], тому зростання активності ГТ за умов 28-добового введення ОМ може бути також пов'язано з особливостями метаболізму цього препарату за участю глутатіону [28].

Введення мультипробіотика АП за умов тривалого гіпоацидного стану супроводжувалось нормалізацією активності ГТ, що за умов зменшення процесів ПОЛ і відсутності змін порівняно з контролем вмісту ВГ та активності ГР може свідчити про модулюючий вплив АП на функціонування глутатіонової ланки АОЗ.

Рівень ВГ в клітині підтримується двома шляхами: синтезом *de novo* з амінокислот-попередників глутамату, цистеїну та гліцину та шляхом відновлення окисненого глутатіону специфічним ферментом – ГР. Глутатіонредуктаза регенерує ВГ шляхом відновлення за допомогою НАДФН, як донора водню, дисульфідного зв'язку окисненого глутатіону до сульфгідрильної форми, котра здатна знову вступати в антиоксидантні реакції [16].

Як видно з таблиці, введення мультипробіотика АП інтактним щурам збільшувало активність ГР на 22 %, що на фоні відсутності змін вмісту ВГ може бути пов'язано з активним використанням ВГ за даних умов ГП.

Натомість за умов тривалого введення ОМ спостерігалось зменшення глутатіонредуктазної активності на 14% ($p \leq 0,05$) порівняно з контролем. Отримані результати співвідносяться із зниженням вмісту ВГ в даній групі тварин, тому можна припустити, що однією з причин встановленого ефекту є порушення функціонування ГР. Зниження активності ГР, як вже зазначалось, може бути пов'язане з тим, що в умовах оксидативного стресу знижується вміст НАДФН, від наявності якого залежить процес відновлення ОГ [13].

Одночасне ж 28-добове введення АП і ОМ нормалізувало активність ГР, внаслідок чого відбувалось відновлення вмісту ВГ в сироватці крові щурів, що на фоні зниження вмісту ТБК-активних продуктів може свідчити про збільшення антиоксидантних властивостей сироватки крові.

Таким чином, за умов тривалого зниження шлункового кислотоутворення в сироватці крові щурів відбуваються порушення процесів ПОЛ та функціонування глутатіонзалежної ланки АОЗ. Мультипробіотик АП здатен впливати на розвиток процесів ПОЛ і функціонування глутатіонової системи АОЗ в сироватці крові, в тому числі й за умов тривалої шлункової гіпоацидності.

Висновки.

1. За умов тривалого пригнічення шлункової секреції соляної кислоти в сироватці крові щурів спостерігається зростання вмісту ТБК-активних продуктів та дисбаланс у функціонуванні глутатіонової ланки антиоксидантної системи.

2. Мультипробіотик АП знижує вміст ТБК-активних продуктів та здійснює модулюючий вплив на функціонування глутатіонзалежної ланки антиоксидантної системи в сироватці крові щурів з тривалою шлунковою гіпоацидністю.

Перспективи подальших досліджень в данному напрямку. З'ясування механізмів модулюючої дії мультипробиотика "Апібакт®" сприятиме його впровадженню в клінічну практику лікування кислотоасоційованих захворювань з метою подолання негативних наслідків тривалої шлункової гіпоацидності.

Список використаних джерел

- Власова С.Н. Активность глутатионзависимых ферментов эритроцитов при хронических заболеваниях печени у детей / С.Н. Власова, Е.И. Шабунина, И.А. Персегина // Лаб. дело. – 1990. – №8. – С. 19–22.
- Гаврилов В.П. Методика определения малонового диальдегида в сыворотке крови / В.П. Гаврилов, А.Р. Гаврилова, И.Г. Майорова // Вопр. мед. химии. – 1987. – №1 – С. 118–122.
- Дубинина Е.Е. Роль активных форм кислорода в качестве сигнальных молекул в метаболизме тканей при состоянии окислительного стресса / Е.Е. Дубинина // Вопр. мед. химии. – 2001. – Т. 47, №6. – С. 561–581.
- Мурашук К. Вплив L-аргініну на вікові зміни процесів перекисного окислення ліпідів та активність системи антиоксидантного захисту у тканинах щурів / К. Мурашук, О. Ікерт, М. Гальків, С. Гордій // Укр. біохім. журн. – 2007. – т. 79, № 3. – С. 38–43.
- Октябрьский О.Н. Редокс-регуляция клеточных функций / О.Н. Октябрьский, Г.В. Смирнова // Биохимия. – 2007. – Т. 72, №2. – С. 158–174.
- Орехович В.Н. Современные методы в биохимии / В.Н. Орехович // М: Медицина, 1977. – С. 62–68.
- Сарапук О.В. Корекція перекисного окислення ліпідів та антиоксидантний захист у хворих на хронічний гастрит із секреторною недостатністю / О.В. Сарапук, А.О. Клименко, В.В. Дзвонковська // Сучасна гастроентерологія. – 2002. – №2. – С. 59–61.
- Сторожков Г.И. Оценка методик проведения исследований / Г.И. Сторожков, Е.А. Малышева // Качественная клиническая практика. – 2001. – №1. – С. 21–30.
- Ускова М.А. Антиоксидантные эффекты молочнокислых бактерий – пробиотиков и йогуртных заквасок / М.А. Ускова, Л.В. Кравченко // Вопр. питания – 2009. – №2. – С. 18–23.
- Beregova T.V. Probiotic is preventive agent against structural and functional changes in stomach evoked by long-term reduction of gastric acid secretion / T.V. Beregova, L.I. Ostapchenko, O.I. Tsyryuk, O.K. Voronina, O.G. Korotkiy // Gut / – 2009. – Vol. 58, Supplement II (GASTRO 2009 UEGW/WCOG, London, United Kingdom, 21–25 November, 2009). – P. 124–A125.
- Burdan F. Level of malondialdehyde after short-time omeprazole administration / F. Burdan, B. Burak, A. Sek // Med Sci Monit. – 2001. – Vol. 7. – P. 89–92.
- Burkitt M.D. Importance of gastrin in the pathogenesis and treatment of gastric tumors / M.D. Burkitt, A. Varro, D.M. Pritchard // World Journal of Gastroenterology. – 2009. – Vol. 15. – P. 1–16.
- De Minicis S. Oxidative stress in alcoholic liver disease: role of NADPH oxidase complex / S. De Minicis, D.A. Brenner // J Gastroenterol Hepatol. – 2008. – Vol. 23. – P. 98–103.

14. Duailibe S.A. Effect of propolis extract on Streptococcus mutants counts in vivo / S.A. Duailibe, A.G. Goncalves, F.J. Ahid // J Appl Oral Sci. – 2007. – V. 15, N 5. – P. 420–423.

15. Elisabeth F. The effect of daily consumption of probiotic and conventional yoghurt on oxidant and anti oxidant parameters in plasma of young healthy women / F. Elisabeth, E. Ibrahim // International journal for vitamin and nutrition research. – 2007. – Vol. 77, №2. – P. 79–88.

16. Forman H.J. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis / H.J. Forman, H. Zhang, A. Rinna // Molecular Aspects of Medicine. – 2009. – Vol. 30, Issues 1–2. – P. 1–12.

17. Fox J.G. Inflammation, atrophy, and gastric cancer / J.G. Fox, T.C. Wang // J. Clin. Invest. – 2007. – Vol. 117. – P. 60–69.

18. Friis-Hansen L. Achlorhydria is associated with gastric microbial overgrowth and development of cancer: Lessons learned from the gastrin knockout mouse / L. Friis-Hansen // Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation. – 2006. – Vol. 66, Issue 7. – P. 607–622.

19. Hissin P.J. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues / P.J. Hissin, R. Hilf // Analytical Biochemistry – 1976. – Vol. 74 – P. 214–226.

20. Isolauri E. Probiotics: effects on immunity / E. Isolauri, Y. Sütas, P. Kankaanpää, H. Arvilommi, S. Salminen // American Journal of Clinical Nutrition. – 2001. – Vol. 73, №2. – P. 444S–450S.

21. Korotkiy O. Proinflammatory cytokines concentration in blood serum of rats with the long-term gastric secretion suppression of hydrochloric acid / O. Korotkiy, T. Karpovets, S. Pilipenko, T. Beregova, L. Ostapchenko // European Journal of Clinical Investigation. – 2010. – Vol. 40, Supplement I (44th Annual Scientific Meeting of the European Society for Clinical Investigation, Bari, Italy, 24 – 27 February, 2010). – P. 14.

22. Kroupa R. Risk of long-term antisecretory treatment / R. Kroupa, J. Dolina // Vnitř Lek. – 2010. – Vol. 56, Issue 2. – P. 115–119.

23. Lin M. Inhibition of Lipid Peroxidation by Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium longum / M. Lin, C. Yen // J. Agric. Food Chem. – 1999. – Vol. 47, №9. – P. 3661–3664.

24. Mates M. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiological processes / M. Mates, F. Sanchez-Jimenez // Front. Biosci. – 1999. – Vol. 4. – P. 339–345.

25. Pickett C.B. Glutathione S-transferases: gene structure, regulation, and biological function / C.B. Pickett // Annu. Rev. Biochem. – 1989. – V. 58. – P. 743–764.

26. Russo A. A. Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin / A. Russo, R. Longo, A. Vanella // Fitoterapia. – 2002. – Vol. 73, Suppl. 1. – S21–29.

27. Sforzin J.M. Propolis and the immune system: a review / J.M. Sforzin // J Ethnopharmacol. – 2007. – Vol. 113, N 1. – P. 1–14.

28. Weidolf L. A metabolic route of omeprazole involving conjugation with glutathione identified in the rat / L. Weidolf, K.E. Karlsson, I. Nilsson // Drug Metab Dispos. – 1992. – Vol. 20, №2. – P. 262–267.

29. Wu H. The role of gut microbiota in immune homeostasis and autoimmunity / H. Wu, E. Wu // Gut microbes. – 2012. – Vol. 3, Issue 1. – P. 4–14.

Надійшла до редколегії 11.04.14

С. Пилипенко, докторант, А. Короткий, канд. биол. наук, Т. Береговая, проф., Л. Остапченко, проф.
КНУ імені Тараса Шевченка, Київ

ВЛИЯНИЕ МУЛЬТИПРОБИОТИКА "АПИБАКТ®" НА СОДЕРЖАНИЕ ТБК-АКТИВНЫХ ПРОДУКТОВ И ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ГЛУТАТИОНОВОГО ЗВЕНА АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ КРЫС С ДЛИТЕЛЬНОЙ ЖЕЛУДОЧНОЙ ГИПОАЦИДНОСТЬЮ

Длительное снижение желудочной секреции гидрохлоридной кислотой вызвало увеличение содержания ТБК-активных продуктов, активности глутатионпероксидазы и глутатионтрансферазы, уменьшение уровня восстановленного глутатиона и активности глутатионредуктазы в сыворотке крови крыс. Введение мультипробиотика "Апибакт®" крысам с длительной желудочной гипацидностью снижало активность процессов перекисного окисления липидов и оказывало модулирующее влияние на функционирование глутатионзависимой системы антиоксидантной защиты в сыворотке крови.

Ключевые слова: желудочная гипацидность, мультипробиотик "Апибакт®", перекисное окисление липидов, антиоксидантная система.

Pilipenko S. PhD, Korotkiy O. PhD, Beregova T. Prof., Ostapchenko L. Prof.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv

THE INFLUENCE OF MULTIPROBIOTIC "APIBACT®" ON THE TBA-ACTIVE PRODUCTS LEVEL AND FUNCTIONING OF GLUTATHIONE LINK OF ANTIOXIDANT DEFENSE IN BLOOD SERUM OF RATS WITH LONG-TIME GASTRIC HYPOACIDITY

Long-term decrease of gastric acid secretion by omeprazole leads to increase of TBA-active products level, activity of glutathione peroxidase, activity of glutathione transferase and to reduction of the level of reduced glutathione and glutathione reductase activity in blood serum of rats. Simultaneous introduction to the rats of omeprazole and multiprobiotic "Apibact®" reduce the activity of lipid peroxidation and has a modulatory effect on functioning of glutathione dependent system of antioxidant defense in rat blood serum as compared to administration of omeprazole alone.

Key words: gastric hypacidity, multiprobiotic "Apibact®", lipid peroxidation, antioxidant system.

УДК 57.018.34:619:615:612.176

Д. Голишкін, асп., В. Рибальченко, д-р біол. наук,
А. Бичко, канд. біол. наук, Т. Берегова, д-р біол. наук, Т. Фалалєєва, д-р біол. наук
КНУ імені Тараса Шевченка, Київ

ВПЛИВ МЕЛАНІНУ НА ЕЛЕКТРИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ МОДЕЛЬНИХ БІЛІПІДНИХ МЕМБРАН (IN VITRO)

Дослідити дозозалежний вплив меланіну на провідність та електричну ємність модельних біліпідних мембран (in vitro). Дозозалежний ефект визначали за методом аналізу нестандартних циклічних вольт-амперних характеристик бімолекулярних ліпідних мембран (БЛМ). Електричні параметри БЛМ, а саме провідність та електричну ємність визначали за зміною потенціалу на мембрані. Вперше встановлено безпосередній вплив меланіну на електричні характеристики ліпідного матриксу клітинних мембран. Показано дозозалежний мембранотропний вплив меланіну, що реалізується шляхом підвищення електричної провідності та зменшення ємності ліпідного бішару. Це свідчить про зменшення товщини ізоляційної зони мембрани за умов дії меланіну. Меланін проявляє мембранотропну активність, що реалізується шляхом підвищення провідності та зменшення електричної ємності ліпідного бішару. Найбільш виражений вплив меланіну на електричні характеристики біліпідних мембран здійснюється при концентрації 10^{-6} М.

Ключові слова: меланін, бімолекулярна ліпідна мембрана, електропровідність, електрична ємність.

Вступ. Пігментація живих організмів є яскравим прикладом адаптивної еволюції живого на землі. Це підтверджується наявністю біологічних пігментів меланінів у представників майже всіх найбільших таксонів [1]. За хімічною структурою меланіни є полімерами хіноїдних сполук, мономерами яких виступають індольні та фенольні угруповання. Унікальні властивості меланінів пов'язані з наявністю в їх структурі неспарених електронів у вигляді стабільних радикальних форм хінона [2]. Наявність неспарених електронів у структурі дозволяє реалізовувати меланінам широкий спектр протекторно-регуляторних функцій таких як антиоксидантну [3], фотопротекторну та антирадикальну, блокуючи цитотоксичні короткоживучі вільні радикали [4], нейропротекторну, підвищуючи регенеративну здатність нервових волокон при ураженні центральної нервової системи за рахунок відновлення кровопостачання уражених тканин [5]. Завдяки властивостям напівпровідника меланін бере участь у біоелектричних процесах в головному мозку [6] та виконує важливу фізіологічну функцію протектора проти дії пероксинітриду, який вважають медіатором нейротоксичних процесів [7]. Так, наприклад, представлені численні літературні дані щодо антиоксидантної активності меланіну до таких окислювачів як перекис водню, гіпохлорид, перманганат калію, а також токсичних кисневих радикалів [8, 9]. У роботах Джекобсон і співавт. [9] наводяться дані про захисний вплив меланіну з *Wanginella dermatidis* і *Alternaria alternata* від дії перманганату калію і гіпохлориду. Однак стійкість до перекису водню володіють тільки меланін з *Alternaria alternata*. Подібні результати були отримані і при вивченні грибів *Cryptococcus neoformans* [10]. Показано, що меланін цього гриба має антиоксидантну активність, відносно супероксиданіонів, яку можна порівняти з активністю супероксиддисмутази. Слід зазначити, що фермент ефективно функціонує при температурах нижче 37°C, тоді як меланін активний при вищих температурах. Аналогічні дані отримані і при вивченні дії кисневих радикалів на меланізований патогенний гриб *Pyricularia oryzae*: непігментовані мутанти не володіли патогенними властивостями і виявилися набагато чутливішими до дії оксидантів [11]. Меланінізовані штами мікроорганізмів виявилися стійкіші до більш високих концентрацій ультрафіолетового опромінення. Так, наприклад, виживання штамів меланінізованих грибів було зафіксовано за жорстких кліматичних умов Антарктики та радіаційно забрудненого ядерного реактору [12, 13]. Оскільки окисний стрес розвивається не лише за умов дії радіації, але й при стресах іншого генезу, меланін, як пастка для радикалів, одночасно виступає як антистресовий середник.

Так, було досліджено адаптогенний вплив фітомеланіну при дії іонізуючого опромінення та стресу. Авторами було показано, що під впливом комбінованої дії опромінення та стресу спостерігалось підвищення вмісту адреналіну в крові щурів та одночасно знижувався рівень тироксину. У тварин, що вживали фітомеланін, вміст гормонів у крові залишався на рівні контролю [14].

Таким чином, меланін є ефективним кумулятором "шкідливих" неспарених електронів здатний впливати на хід метаболічних реакцій на різних рівнях організації живого організму, у тому числі мембранному. Однак, питання про безпосередній вплив меланіну на структуру ліпідного матриксу клітинних мембран, як базисного елемента у ланцюзі трансдукції хімічного сигналу залишається досі не розкритим, що ускладнює інтерпретацію молекулярних механізмів реалізації його біологічної активності. Тому метою даного дослідження є дослідити дозозалежний вплив меланіну на провідність та електричну ємність модельних ліпідних мембран (in vitro).

Матеріали і методи. Визначення впливу меланіну на електричні характеристики біліпідних мембран виконувалося за аналізом нестандартних циклічних вольт-амперних характеристик (ЦВАХ) бімолекулярних ліпідних мембран (БЛМ). Мембрани формували за стандартною методикою Мюллера з використанням азолектину (23 мг/мл) в п-декані ("Біофарм", Україна) в оточенні водного розчину електроліту (100 мМ KCl, х.д.ч.) [15]. Електричні параметри БЛМ (електрична провідність G , нСм/см², електрична ємність C , мкФ/см²) визначали за зміною потенціалу на мембрані (± 100 мВ, частота розгортки 0,01 Гц). Реєстрація ЦВАХ БЛМ проводилась через 10 хвилин після внесення меланіну у навколо мембранний розчин. Досліджуваний діапазон ефеквної концентрації меланіну становив 10^{-9} - 10^{-6} М.

Результати та обговорення. Формування модельної системи БЛМ дозволило встановити вплив меланіну на структуру ліпідного матриксу за змінами основних електричних характеристик, таких як електрична провідність (G , нСм/см²) та електрична ємність (C , мкФ/см²) мембран.

Зареєстровані ЦВАХ не модифікованих меланіном БЛМ складали G_0 $127,81 \pm 29,88$ нСм/см² та C_0 $0,58 \pm 0,11$ мкФ/см² відповідно. Послідовне збільшення концентрації меланіну в розчині електроліту з цис-боку ліпідної мембрани в діапазоні концентрацій меланіну 10^{-9} - 10^{-6} М відзначалося експоненційним ростом питомої провідності ліпідної мембрани (максимально на $21,2 \pm 6,8\%$ при концентрації 10^{-6} М). При концентрації меланіну 10^{-5} М процес збільшення провідності припинявся і навіть відзначалося незначне зменшення її величини (Рис. 1).

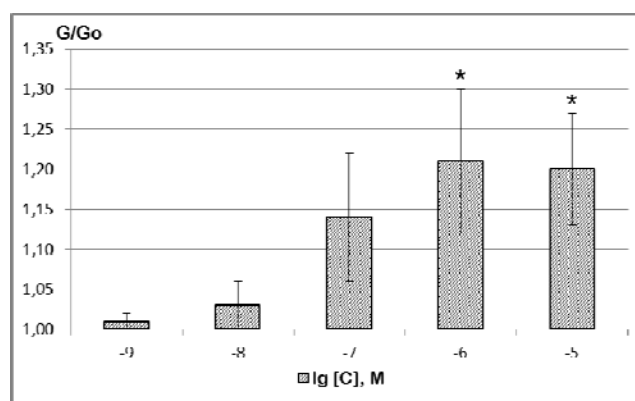


Рис. 1. Електрична провідність БЛМ за умов дії меланіну (G, нСм/см²)

*- $p < 0,05$ у порівнянні з концентрацією меланіну 10^{-9} М.

Електрична ємність мембрани в діапазоні концентрацій меланіну 10^{-9} - 10^{-6} М зменшувалася (максимально на $8,4 \pm 1,7\%$ при концентрації 10^{-6} М). При подальшому

збільшенні концентрації меланіну (10^{-5} М) величина електричної ємності стабілізувалася і навіть мала тенденцію до зростання (Рис.2).

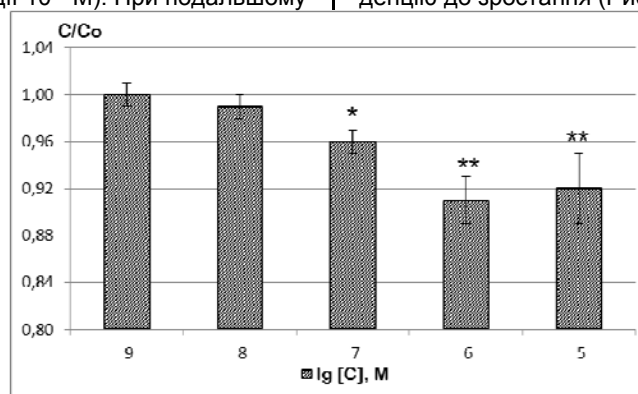


Рис. 2. Електрична ємність БЛМ за умов дії меланіну (C, мкФ/см²)

*, **- $p < 0,05$, $p < 0,01$ у порівнянні з концентрацією меланіну 10^{-9} М.

Отримані результати дозволяють припустити, що молекули меланіну при контакті з ліпідної мембраною проникають через центральну гідрофобну зону залишків жирних кислот фосфоліпідів, що призводять до збільшення питомої провідності ліпідного бішару та зменшенню товщини його ізоляційної зони, про що свідчить зменшення ємності мембрани. Процес прямо залежить від концентрації мембранотропного агента (меланіну). Однак, при концентраціях меланіну 10^{-5} М його дезорганізуючий вплив на ліпідний бішар поступово нівелюється, що можна пов'язати з можливістю самопригнічення (накопиченням на поверхні або в об'ємі мембрани достатньої кількості меланіну для формування додаткового структурного або електростатичного бар'єру). Отримані дані співпадають з дослідженнями проведеними на меланіні грибів-патогенів рослин, що виступає у якості структурної одиниці клітинної стінки *Colletotrichum kahawae*, патогенів кавового насіння [16]. В даному випадку меланін забезпечує тургорний тиск апресорій гриба, що відповідають за утворення перфорацій у клітинах насіння.

Отже, в результаті проведеної роботи можна зробити припущення про те, що меланін виступає базисним елементом трансдукції хімічного сигналу та чинить безпосередній вплив на структуру ліпідного матриксу клітинних мембран. Результатом даної взаємодії є збільшення питомої провідності ліпідного бішару та зменшення товщини його ізоляційної зони, що може пояснювати транспорт молекул меланіну через центральну

гідрофобну зону мембранных фосфоліпідів та реалізацію захисних властивостей пігменту.

Висновки. 1. Меланін проявляє мембранотропну активність, що реалізується шляхом підвищення провідності та зменшення електричної ємності ліпідного бішару. 2. Найбільш виражений вплив меланіну на електричні характеристики біліпідних мембран здійснюється при концентрації 10^{-6} М.

Список використаних джерел

1. Plonka P.M. Melanin synthesis in microorganisms – biotechnological and medical aspects / Przemyslaw M. Plonka, Maja Grabacka // *Acta Biochimica Polonica* – 2006. – №3. – P. 429-443.
2. Eisenman H.C. Synthesis and assembly of fungal melanin / Helene C. Eisenman, Arturo Casadevall // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2012. – P. 931-940.
3. Melanin in *Fonsecaea pedrosoi*: a trap for oxidative radicals / M.M.L. Cunha [et al.] // *BMC Microbiology*. – 2010. – №10 – P. 1-9.
4. Dadachova E. Ionizing radiation: how fungi cope, adapt, and exploit with the help of melanin / Ekaterina Dadachova, Arturo Casadevall // *Current Opinion in Microbiology* – 2008. – №11. – P. 525-531.
5. Neuroprotective action of bacterial melanin in rats after corticospinal tract lesions / T.R. Petrosyan [et al.] // *Pathophysiology*. – 2012. – P. 71-80.
6. Lacy M.E. Neuromelanin: a hypothetical component of bioelectronic mechanisms in brain function / M.E. Lacy // *Physiol.Chem.Phys.* – 1981. – № 4. – P. 319-324.
7. Stepien K. Dopamine-melanin protects against tyrosine nitration, tryptophan oxidation and Ca^{2+} -ATPase inactivation induced by peroxynitrite / K. Stepien, A. Zajdel, A. Wilczok // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2000. – № 2-3. – P. 189-195.
8. Golyshkin D. Influence of melanin on the lesion in the gastric mucosa of rats caused by neuro-muscular tension according to Selye / D. Golyshkin, Ya. Savitsky, T. Falalyeyeva // *Annales universitatis Mariae Curie – Skłodowska*. – 2010. – №2. – P. 251-255.

9. Jacobson E.S. Relationship between superoxide dismutase and melanin in pathogenic fungus / E.S. Jacobson, N.D. Jenkins, J.M. Tood // Infect. Immun. – 1994. – P. 4085-4086.

10. Williamson P.R. Laccase and melanin in the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans* / P.R. Williamson // Front Biosci. – 1997. – №10. P. 99-107.

11. Аверьянов А.А. Влияние меланина на цитотоксичность кислородных радикалов / А.А. Аверьянов, В.П. Лапикова, Г.Г. Петелина // Биохимия. – 2009. – №4. – С.1539-1546.

12. Rosa L.H. Endophytic fungi community associated with the dicotyledonous plant *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. (Caryophyllaceae) in Antarctica / L.H. Rosa // FEMS Microbiol. Ecol. – 2010. – P.178-189.

13. Zhdanova N.N. Fungi from Chernobyl: mycobiota of the inner regions of the containment structures of the damaged nuclear reactor / N.N. Zhdanova [et al.] // Mycology Research. – 2000. – P.1421-1426.

14. Горчакова Л. А. Адаптогенный вплив фітомеланіну при дії іонізуючого опромінення та стресу / Л.А.Горчакова, Л.П. Дерев'яно, М.Ю. Скачек // Вісник наукових досліджень. – 1999. – № 2. – С. 23-27.

15. Mueller P. Methods for the formation of single bimolecular lipid membranes in aqueous solution / P. Mueller [et al.] // Nature. – 1962. – P. 976-983.

16. Chen Z. Appressorium turgor pressure of *Colletotrichum kahawae* might have a role in coffee cuticle penetration / Z. Chen // Mycologia. – 2004. P.1199-1208.

Надійшла до редколегії 20.02.14

Д. Голышкин, асп, В. Рыбальченко, д-р биол. наук, А. Бычко, канд. биол. наук, Т. Береговая, д-р биол. наук, Т. Фалалеева, д-р биол. наук КНУ имени Тараса Шевченко, Киев

ВЛИЯНИЕ МЕЛАНИНА НА ЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ МОДЕЛЬНЫХ БИЛИПИДНЫХ МЕМБРАН (IN VITRO)

Изучить дозозависимое влияние меланина на проводимость и электрическую емкость модельных билипидных мембран (*in vitro*). Дозозависимый эффект определяли методом анализа нестандартных циклических вольт-амперных характеристик бимолекулярных липидных мембран (БЛМ). Электрические параметры БЛМ, а именно электрическую проводимость и электрическую емкость определяли по изменению потенциала на мембране. Впервые установлено непосредственное влияние меланина на структуру липидного матрикса клеточных мембран. Показано дозозависимое мембранотропное влияние меланина, которое реализуется путем повышения проводимости и уменьшения электрической емкости липидного бислоя. Это свидетельствует о уменьшении толщины изоляционной зоны мембраны в условиях воздействия меланина. Меланин проявляет мембранотропную активность, которая реализуется путем повышения проводимости и уменьшения электрической емкости липидного бислоя. Наиболее выраженное влияние меланина на электрические характеристики билипидных мембран реализуется при концентрации 10^{-6} М.

Ключевые слова: меланин, бимолекулярная липидная мембрана, электропроводимость, электрическая емкость.
D. Golyshkin, Phd stud, V. Rybalchenko, DSc, A. Bychko, PhD., T. Beregova, DSc, T. Falalyeyeva, DSc
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv

INFLUENCE OF MELANIN ON ELECTRICAL CHARACTERISTICS OF MODEL BILIPID MEMBRANES (IN VITRO)

To examine dose-dependent effects of melanin on conductance and electrical capacity of model bilipid membranes (*in vitro*). Dose-dependent effects were studied on bilayer lipid membranes (BLM) by volt-ampere characteristic method. Both BLM electrical parameters of conductance and electrical capacity were measured by the change in the membrane potential. For the first time direct influence of melanin on cell membrane's bilayer lipid matrix was estimated. It was established dose-dependent membranotropic influence of the melanin that was realized by conductance increasing of BLM and by decreasing of membrane capacity. It testifies decreasing of membrane's insulating zone under melanin's influence. Melanin shows membranotropic activity which is realized by increasing conductivity and decreasing electrical capacitance of the lipid bilayer. The most pronounced melanin's effect on the bilipid membranes electrical characteristics is realized at 10^{-6} M.

Key words: melanin, bimolecular lipid membranes, conductivity, capacity.

УДК 616.4: 577.152

Л. Гарманчук, д-р біол. наук
КНУ імені Тараса Шевченка, Київ

ВИЗНАЧЕННЯ ПОГЛИНАННЯ ГЛЮКОЗИ ПУХЛИННИМИ КЛІТИНАМИ ЗА СТАНДАРТНИХ УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ ТА ПІД ВПЛИВОМ ПРОТИПУХЛИННИХ ПРЕПАРАТІВ

Адаптовано глюкозооксидантний метод визначення глюкози в сироватці крові для оцінки концентрації поглинутої глюкози культивованими пухлинними клітинами. Для цього підраховували живі клітини на різних етапах їх культивування та за різницею концентрації глюкози в середовищі культивування без клітин визначали рівень поглинутої глюкози в розрахунок на одиницю клітин. Метод є економічно доцільним, швидко відтворюваним та високочутливим і може використовуватись в скринінгових тестах *in vitro* щодо впливу різних лікарських препаратів на залучення глюкози в метаболічні шляхи. Показано, що алкілюючий препарат цисплатин та герцептин (гуманізовані моноклональні антитіла проти рецептора епідермального фактора росту II типу) мають протилежний вплив на рівень поглинання глюкози в залежності від терміну інкубації з клітинами та типом клітин.

Ключові слова: сироватка крові, тест-системи, протипухлинні препарати.

Вступ. Альтернативні методи скринінгу на різних типах культивованих клітин передбачають визначення широкого спектру параметрів, які можуть вказувати на механізми дії досліджуваних агентів. На сьогодні розроблено правила стандартизації якості культури клітин і тканин для дослідження ефективності лікарських препаратів та впроваджені Європейським центром валідації альтернативних методів принципи Належної лабораторної практики (GLP) [1-2]. Впровадження даних методів дослідження спонукає до пошуку простих, доступних та економічно-доцільних методів визначення параметрів функціонування клітин за дії різних сполук, включаючи тестування протипухлинної активності потенційних лікарських засобів, у доклінічних дослідженнях яких суттєву нішу займають панелі культивованих

трансформованих клітин [1-4]. Параметри, за якими оцінюється функціональний стан трансформованих клітин стосуються не лише проліферативних/ антипроліферативних показників, експресії/репресії певних генів, а й таких функціонально значимих характеристик – як метаболічні [5-7]. Відомо, що пухлинні клітини отримують енергію шляхом гліколізу і перехід на безкисневу енергетику призводить до автономного та неконтрольного їх росту. Важлива роль метаболітів гліколітичного шляху поповнення енергії за канцерогенезу визначається тим, що до участі регуляції обміну глюкози, залучені шляхи передачі онкогенних та антиапоптичних сигналів, активація ангиогенезу та міграційна здатність пухлинних клітин [5]. Варбургом, ще в 1924 р. було встановлено, що у зрізах пухлинних тканин продукція лакта-

ту більша, в порівнянні з нормальними тканинами [8-9]. Цей факт спостерігався як в анаеробних, так і в аеробних умовах, тоді як дихання в пухлинах кількісно не зменшувалося і ефект Пастера (пригнічення гліколізу диханням) не знімався. В численних дослідженнях показано, що пухлинні тканини здатні утилізувати і перетворювати до лактату значно більше глюкози, аніж нормальні [8-13]. Це є однією з найбільш характерних властивостей пухлин, що стала відправною точкою для розвитку численних досліджень як фундаментального, так і прикладного характеру. Загальним підсумком є доказ того, що існує пряма кореляція між швидкістю росту експериментальних пухлин, ступенем їх розвитку та величиною анаеробного гліколізу. Слід зазначити, що досить інтенсивний гліколіз, зокрема аеробний, має місце в нормальних тканинах і клітинах – лімфатичних вузлах, ембріональній тканині, слизовій оболонці кишечника, сітківці ока, сперматозоїдах, гранулоцитах тощо [8, 9]. Але пухлинні клітини утилізують глюкозу зі значно більшою швидкістю, навіть в аеробних умовах, при цьому поглинання кисню гліколізом пригнічується [12]. Посилений аеробний гліколіз являє собою унікальне явище для пухлин. Він індукований майже у всіх злоякісних новоутвореннях, а його активність зростає із збільшенням ступеня злоякісності пухлини. Аеробний гліколіз в пухлинних клітинах розглядається як механізм, що надає їм захист від активних форм кисню, що утворюються при інтенсивній проліферації та в екстремально лужному позаклітинному мікрооточенні, а також надає можливість пухлинним клітинам проникати в навколишні нормальні тканини [14]. Вищесказане відносить аеробний гліколіз до важливих маркерів пухлини незалежно від природи тканини, з якої вона утворилася, та її генетичних особливостей [8-12]. В клітину глюкоза потрапляє завдяки транспортерам глюкози (GLUT1, GLUT4, GLUT5, GLUT8, GLUT12) та Na^+ -котранспортеру [15,16], з яким може бути пов'язана зміна щільності заряду пухлинних клітин. Показано, що в деяких пухлинних клітинах починають експресуватись та функціонувати потенціал залежні Na^+ -канали, роль яких особливо важлива за міграції клітин. Таким чином, зміна щільності заряду клітини може бути пов'язана як із активністю потенціал залежних Na^+ -каналів, так і зі зміною в активності Na^+ /глюкозного котранспортеру. Можливо, що зміна у транспорті глюкози впливає через Na^+ /глюкозний котранспортер на заряд клітин, а можливо, що саме заряд клітин впливає на транспорт глюкози, і через зміну заряду знижується споживання глюкози. Тому, визначення поглинання глюкози пухлинними клітинами є важливим показником в дослідженнях впливу на пухлинні клітини. Існуючі на сьогодні методи визначення метаболізму глюкози в клітинах є достатньо дорогими та довготривалими, а біосенсорні розробки знаходяться на стадії впровадження [17].

Мета роботи полягала у адаптації ефективного та малозатратного клінічного методу оцінки рівня глюкози до виміру даного показника в системі *in vitro* для визначення рівня глюкози в клітинах, культивованих в стандартних умовах інкубації, безсировоткових та за впливу протипухлинних препаратів цисплатину та герцептину.

Матеріали та методи дослідження. В дослідженнях було використано наступні клітинні лінії: MCF-7 (аденокарцинома молочної залози), Hela (рак шийки

матки), які культивували за стандартних умов при 37°C , 100% вологості, 5% CO_2 в середовищах DMEM та RPMI, з додаванням 10-15% ембріональної телячої сироватки (FBS) та в безсировоткових умовах. В якості антипроліферативних засобів використовували моноклональні антитіла до рецептора епідермального фактора росту II типу (комерційна назва Герцептин), та класичний цитотоксичний протипухлинний препарат цисплатин з алкільючим механізмом дії. Клітини культивували протягом 2-3 діб, в кожному із досліджуваних термінів визначали концентрацію клітин, а в середовищі інкубації клітин визначали рівень глюкози. Концентрацію та виживаність клітин визначали за рутинним підрахунком в камері Горяєва після зафарбовування клітин вітальним барвником трипановим синім. Концентрацію глюкози в середовищі інкубації клітин визначали з використанням глюкооксидазного методу [18, 19], що застосовується в клінічній лабораторній діагностиці для оцінки рівня глюкози в сироватці крові (Філісит-Діагностика, Україна). Метод ґрунтується на тому, що глюкоза в присутності глюкооксидази окислюється киснем повітря до глюконової кислоти і перекису водню, який в присутності пероксидази реагує з фенолом та 4-амінофеназоном з утворенням хіноніміна червоно-фіолетового забарвлення, який визначається фотометрично при довжині хвилі 550 нм. Вимірюють оптичну щільність калібрувального розчину ($E_{\text{кал}}$) та дослідної проби ($E_{\text{досл}}$), проти холостої проби. Забарвлення залишається стабільним протягом 60 хв. Розрахунки концентрації глюкози проводяться за формулою:

$$C = 10,0 \times K \times E_{\text{досл}} / E_{\text{кал}} \text{ (ммоль/л)}, \text{ де}$$

C – концентрація глюкози в дослідній пробі, ммоль/л; 10,0 – концентрація глюкози в калібрувальному розчині, ммоль/л; $E_{\text{досл}}$ – оптична щільність дослідної проби, $E_{\text{кал}}$ – оптична щільність калібрувальної проби; K – коефіцієнт розведення.

Поглинання глюкози клітинами розраховували через різницю у концентрації глюкози в середовищі культивування та концентрації глюкози в середовищі після інкубації клітин, отримані дані розраховували на кількість живих клітин. Статистичний аналіз проводили з використанням критерію Стьюдента.

Результати та їх обговорення. Для оцінки адекватності методу визначення глюкози, який широко застосовується в лабораторній клінічній діагностиці щодо можливості його використання для виміру рівня поглинання глюкози пухлинними клітинами в системі *in vitro*, було відпрацьовано мікрометод на середовищах культивування клітин таких як MEM, DMEM, RPMI, F-12 (Sigma, США) з додаванням FBS або без сироватки. Згідно сертифікатів фірми виробника ці середовища містять різну концентрацію глюкози, $5,6 \times 10^{-3}$, $2,5 \times 10^{-2}$, $1,1 \times 10^{-2}$, $1,0 \times 10^{-2}$ М, відповідно. Також наявність в складі середовищ деяких амінокислот (наприклад, L-глутаміну) може вносити додаткові показники при визначенні глюкози запропонованим методом. Для побудови калібрувальної кривої нами було проведено розведення середовищ культивування фізіологічним розчином. Як свідчать наведені дані (табл.1), при розведенні середовищ інкубації концентрація глюкози, визначена за мікрометодом пропорційно знижувалась.

Таблиця 1. Визначення глюкози в середовищі культивування клітин глюкозооксидантним методом

Середовище культивування	Тип середовища та концентрація глюкози, М			
	MEM	DMEM	RPMI	F-12
Не розведене	3.1×10^{-2}	7.8×10^{-2}	5.5×10^{-2}	4.8×10^{-2}
Розведення 1:2	1.7×10^{-2}	4.3×10^{-2}	3.3×10^{-2}	2.2×10^{-2}
Розведення 1:4	9.5×10^{-3}	1.9×10^{-2}	2.3×10^{-2}	1.5×10^{-2}
Розведення 1:8	4.1×10^{-3}	1.1×10^{-2}	9.5×10^{-3}	8.4×10^{-3}
Розведення 1:16	2.7×10^{-3}	4.2×10^{-3}	6.3×10^{-3}	5.0×10^{-3}

Дані наведені в таблиці свідчать, що глюкозооксидантний метод з використанням набору реактивів фірми Філісіт-Діагностика (Україна) є чутливим в діапазоні показників глюкози 2.7×10^{-3} – 7.8×10^{-2} моль/л, що знаходиться в діапазоні концентрацій рекомендованих інструкцією виробника для оцінки глюкози в біологічних рідинах. Більше того, при 8-ми та 16-ти-кратному розведенні середовищ інкубації нам вдалось зафіксувати концентрацію глюкози в нижньому діапазоні, ніж рекомендовано фірмою виробником.

Після попередніх досліджень щодо можливості оцінки рівня глюкози запропонованим методом в різних типах середовищ, які використовуються для інкубації клітин, було проведено визначення даного показника в кондиційованому середовищі клітин. З цією метою використовували дві лінії пухлинних клітин Hela та MCF-7. Для культивування клітин Hela згідно сертифіката міжнародного банку клітинних культур (ATCC) використовували середовище RPMI з додаванням 10% FBS, для клітин MCF-7 – DMEM з 15% FBS, а також індукували

дефіцит ріст-стимулюючих факторів культивування клітин в безсировоткових середовищах. Після 2-х добового культивування було виявлено, що за безсировоткових умов поглинання глюкози клітинами Hela суттєво збільшується в порівнянні з стандартними умовами з використанням сироватки та зростає через 48 годин інкубації (рис.1). Дані представлені у вигляді різниці між концентрацією глюкози в середовищі інкубації з клітинами та середовищем у якості контролю. Одиниці виміру, представлені в роботі – нМ/1000 клітин. Збільшення поглинання глюкози пухлинними клітинами за безсировоткових умов також було характерним при культивуванні клітин MCF-7, як порівняно з стандартними умовами, так і в залежності від терміну інкубації (рис.2). Як видно, із представлених даних, за стандартних умов культивування різниця в рівні поглинутої глюкози із розрахунку на концентрацію живих клітин не значна, хоча проліферативний індекс цих клітин пропорційно наростає з подовженням терміну інкубації (дані не наведено).

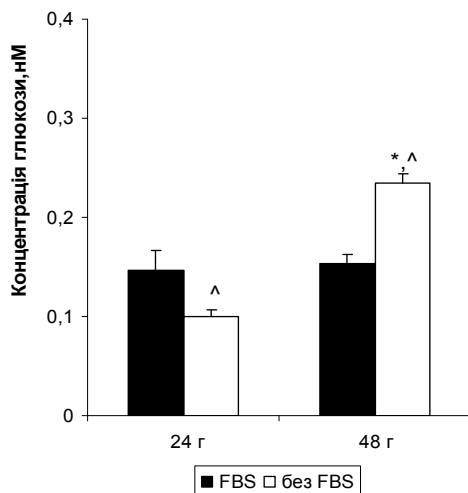


Рис. 1. Рівень поглинутої глюкози клітинами Hela за різних термінів культивування в стандартних (RPMI, з додаванням 10% FBS) та безсировоткових умовах культивування. Концентрація поглинутої глюкози у зразках розрахована на 1000 живих клітин

Підвищення поглинання глюкози для обох досліджуваних типів клітин за безсировоткових умов культивування обумовлено їх здатністю до посиленої проліферації та формуванням резистентності до несприятливих умов мікрооточення. Синтез АТФ при гліколізі проходить значно швидше і залежить, майже виключно, від надходження у клітину глюкози, тоді як в реакціях окисного фосфорилування утворення АТФ обмежено повільним транспортом НАДН з цитозолу до електроно-транспортного ланцюга мітохондрій.

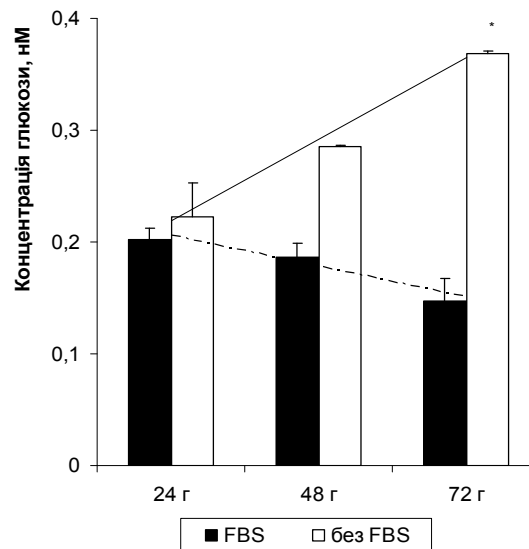
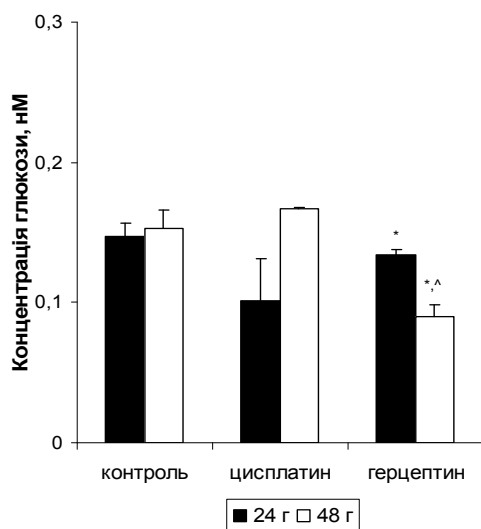


Рис. 2. Рівень поглинання глюкози клітинами MCF-7 за різних термінів культивування в стандартних (DMEM, з додаванням 15% FBS) та безсировоткових умовах культивування. Концентрація поглинутої глюкози у зразках розрахована на 1000 живих клітин

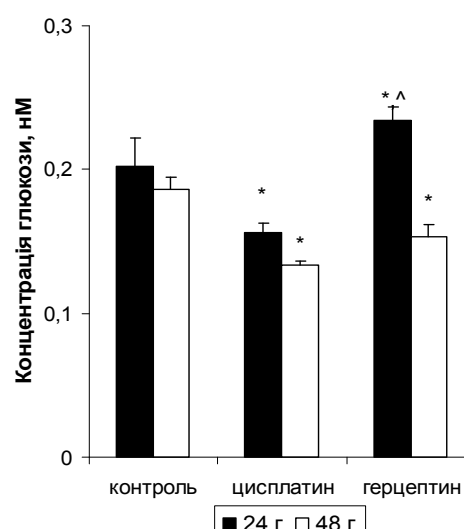
Наступним етапом було визначення впливу протипухлинних препаратів на показник поглинутої глюкози культивованими клітинами. Для цього додавали до клітин цисплатин та герцептин, культивували протягом двох діб та визначали рівень поглинання глюкози за впливу цих препаратів (Рис.3) Як видно із представлених гістограм, додавання протипухлинних препаратів проявлялось зміною показника поглинутої глюкози, який в основному залежав від терміну культивування препаратів з клітинами. Так, цисплатин не впливав на рівень поглинання глюкози клітинами Hela за стандарт-

них умов культивування на 24 та 48 години дії препарату, тоді як по відношенню до клітин MCF-7 цисплатин знижував рівень поглинання глюкози в 1,3 та 1,4 рази ($p < 0,05$) на 24 та 48 годину, відповідно. Стосовно, герцептину, то по відношенню до клітин Hela на 24 годину виявлено незначне пригнічення рівня поглинання глюкози (в 1,1 рази), а на 48 годину дії препарату в 1,7 рази ($p < 0,05$) порівняно з контролем; також виявлено 1,8-кратне ($p < 0,05$) зниження поглинання глюкози за дії герцептину, порівняно з цисплатиною. По відношенню до клітин MCF-7 герцептин знижував рівень поглинання глюкози на 48 годину інкубації та підвищував даний показник на 24 годину інкубації, порівняно з контролем. Такі не односпрямовані впливи досліджуваних лікарських препаратів на рівень поглинання глюкози пухлинними клітинами можливо залежать від різних чинників: механізму протипухлинної дії – для алкілюючого препарату цисплатину механізм дії пов'язаний зі здатністю незворотно інгібувати синтез ДНК в клітинах та індуку-

вати апоптоз; для герцептину – препарату таргетної терапії – механізм дії пов'язаний з пригніченням проліферації клітин з гіперекспресією рецепторів родини епідермального фактора росту, що опосередковано антитіло-комплімент залежною цитотоксичністю та безпосереднім блокуванням проліферації та індукцією апоптозу в HER2/neu позитивних клітинах; наявність молекулярних мішеней впливу цих препаратів на певних типах клітин – MCF-7 мають вищу експресію рецептора HER2/neu, порівняно з клітинами Hela, а також експресію в даних типах клітин відповідних транспортерів глюкози. Оскільки, для глюкози властиві всі переваги "авральної" регуляції – швидке проникнення через клітинну мембрану за градієнтом концентрації, утилізація зі швидким утворенням енергії за відсутності кисню, то для пухлинних культивованих клітин за дії різних впливів визначення рівня поглинутої глюкози є маркерним показником їх метаболізму.



Клітини лінії Hela (RPMI, 10% FBS)



Клітини лінії MCF-7 (DMEM, 15% FBS)

Рис.3. Рівень поглинання глюкози клітинами за впливу цисплатину та герцептину за стандартних умов культивування

Висновок. Таким чином, визначення глюкози, яка залучається в метаболізм культивованих клітин за впливу різних умов культивування та за дії протипухлинних препаратів з використанням діагностичного клінічного набору Філісіт-Діагностика, (Україна) дозволило адаптувати даний метод як мікрометод для тестування глюкози – основного енергетичного субстрату в скринінгових системах з використанням культивованих клітин *in vitro*.

Список використаних джерел

1. Coecke S, Balls M, Bowe G, Davis J, Gstraunthaler G, Hartung T, Hay R, Merten OW, Price A, Schechtman L, Stacey G, Stokes W Guidance on good cell culture practice. // Altern Lab Anim. – 2005. – 33. – P.261–287.
2. Alley M.C., Scudiero D.A., Monks P.A. Hursey M.L., Czerwinsky M.J., Fine D.L., Abbott B.J., Mayo J.G., Shoemaker R.H., Boyd M.R. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay // Cancer Research. – 1988. – 48. – P.589-601.
3. Boyd M Status of NCI. Preclinical antitumor drug discovery screen. // Principles and practice of oncology. – 1989. – v.3, N10. – P.1-12.
4. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических средств// Под ред. Фисенко В.П., Арзамасцева Е.Б., Бабаян Э.А., Булаева В.М., и др./ ЗАО "ИИА Ремедиум", Москва. – 2000. – С.450.
5. Jiang X., Kenerson H.L., Yeung R.S. Cell Biosci. Glucose deprivation in tuberous sclerosis complex-related tumors//2011. – Vol. 21. – P.34.
6. Pelicano H, Carney D, Huang P. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications// Drug Resist Updat. – 2004. – Vol. 7. – P. 97–110.

7. Annibaldi, A., Widmann, C. Glucose metabolism in cancer cells// Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care. – 2010. – Vol.13. – P.466–470.
8. Pavlides S,Whitaker-Menezes D, Castello-Cros R. The reverse Warburg effect: aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma// Cell Cycle. – 2009. – Vol. 8(23). – P.398-400.
9. A. Vazquez, J. Liu, Y. Zhou. Catabolic efficiency of aerobic glycolysis: The Warburg effect revisited//BMC Systems Biology. – 2010. – Vol. 8(5). – P.1065-73.
10. Vazquez A, Oltvai Z N. Molecular crowding defines a common origin for the Warburg effect in proliferating cells and the lactate threshold in muscle physiology// PLoS One. – 2011. – Vol. 29; 6. – P. 38-40.
11. Smallbone K, Gatenby RA, Gillies RJ, Maini PK, Gavaghan DJ: Metabolic changes during carcinogenesis: potential impact on invasiveness// J Theor Biol. – 2007. – Vol. 244(4). – P.703-713.
12. Gatenby R.A., Smallbone K. Cellular adaptations to hypoxia and acidosis during somatic evolution of breast cancer//J Cancer. – 2007. – Vol. 3; 97 (5). – P.646-53.
13. E. I. Chen, J.Hewel, Joseph S. Krueger, et al. Adaptation of Energy Metabolism in Breast Cancer Brain Metastases; // Cancer Res. – 2007. –67 – P.1472-1486.
14. Carlsson J., Acker H. Relations between pH, oxygen partial pressure and growth in cultured cell spheroids // Int. J.Cancer. – 1988. – Vol. 42. – P. 715-720.
15. Wood I.S., Tryhurn P. Glucose transporters (GLUT and SGLT): Expanded families of sugar transport proteins. // Br J Nutr. – 2003. – V.89. – P.3–9. [PubMed: 12568659]
16. Lee W.S., Kanai Y., Wells R., Hediger M. The high affinity Na⁺/glucose cotransporter. // J Biol Chem. – 1994. – V.269. – P.12032–12039.
17. J. D. Newman and A. P. F. Turner (2005) Home blood glucose biosensors: a commercial perspective.// Biosensors and Bioelectronics. – 2005. – V20. – P.2435-2453.

18. Barham D., Trinder P. An improved colour reagent for the determination of blood glucose by the oxidase system // Analyst. – 1972. – V.97. – N151. – P.142-5.

19. Blaedel W.J., Uhl J.M.. Nature of materials in serum that interfere in the glucose-oxidase-peroxidase-O-dianisidine method for glucose, and their mode of action.// Clin Chim. – 1975. – V.21. – P.119–24.

Надійшла до редколегії 16.04.14

Л. Гарманчук, д-р биол. наук
КНУ імені Тараса Шевченка, Київ

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОГЛОЩЕНИЯ ГЛЮКОЗЫ ОПУХОЛЕВЫМИ КЛЕТКАМИ В СТАНДАРТНЫХ УСЛОВИЯХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ И ПОД ВЛИЯНИЕМ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ

Адаптировано глюкозооксидантный метод определения глюкозы в сыворотке крови для оценки концентрации поглощенной глюкозы культивируемыми опухолевыми клетками. Для этого подсчитывали живые клетки на разных этапах их культивирования и по разнице концентрации глюкозы в среде культивирования без клеток определяли уровень поглощенной глюкозы в расчете на единицу клеток. Метод является экономически целесообразным, быстро воспроизводимым и высокочувствительным и может использоваться в скрининговых тестах in vitro относительно влияния различных лекарственных препаратов на привлечение глюкозы в метаболические пути. Показано, что алкилирующие препараты цисплатин и герцептин (гуманизированные моноклональные антитела против рецептора эпидермального фактора роста II типа) оказывают противоположное влияние на уровень поглощения глюкозы в зависимости от срока инкубации с клетками и типом клеток.

Ключевые слова: сыворотка крови, противоопухолевые препараты, тест-системы.

L. Garmanchuk, DSc
Taras Shevchenko National University of Kiev, Kiev

DEFINITION OF GLUCOSE UPTAKE BY TUMOR CELLS UNDER STANDARD CULTIVATION CONDITIONS AND UNDER THE ANTICANCER DRUGS

Glucose Oxidase method for determining glucose in serum blood was adapted to determine the concentration of the absorbed glucose cultured cells. In this purpose viable cells were counted at different stages of cultivation and difference of glucose concentration in the culture medium without cells was characterized level of glucose absorbed per cell. The method is cost-effective, fast and highly reproducible and can be used in screening tests on the effect of different drugs on the involvement of glucose metabolic pathways. It is shown that alkylating drug cisplatin and Herceptin (humanized monoclonal antibody against epidermal growth factor receptor type II) have opposite effects on the level of glucose uptake, depending on the length of incubation with the cells and cell type.

Key words: serum, anticancer drugs, the test system.

Наукове видання



ВІСНИК
КИЇВСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОГО УНІВЕРСИТЕТУ ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА
БІОЛОГІЯ
Випуск 1(66)

Друкується за авторською редакцією

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

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



Формат 60x84^{1/8}. Ум. друк. арк. 11,3. Наклад 300. Зам. № 214-7006.
Гарнітура Arial. Папір офсетний. Друк офсетний. Вид. № Б 1.
Підписано до друку 24.04.14

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