

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 експериментальные данные об особенностях строения, развития и функционирования растительных и животных организмов, флору и фауну Украина, полученные на основе исследований, проводимых учеными УНЦ "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 РЕДАКЦІЙНА КОЛЕГІЯ	Л. І. Остапченко, д-р біол. наук, проф. 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); М. Шандор, д-р біол. наук, проф. (Західно-Угорський Університет, м. Сомбатхей, 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); 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. Макаручук, 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; www.biovestnik.com ; bulletin.vestnik@gmail.com
Затверджено	Вченою радою ННЦ "Інститут біології" 09.12.15 (протокол № 4)
Атестовано	Вищою атестаційною комісією України. Постанова Президії ВАК України № 1-05/3 від 14.04.10
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
Журнал входить до наукометричних баз / Abstracted and Indexed:	Index Copernicus (з 2012 р. ICV-2013 = 5,23), Cite Factor (з 2014 р.), Research Bible (з 2013 р.), Academic Keys (з 2013 р.), DOAJ (з 2013 р.), EBSCO.EJS (з 2012 р.), Free medical journals list of Geneva Foundation for Medical Education and Research (з 2014 р.); HINARI (з 2013 р.); Medical Journals Links (з 2013 р.); OAJI (з 2012 р.); The Knowledge Network (з 2014 р.); Ulrich's Periodicals Directory (з 2012 р.); WorldCat (з 2013 р.); E-Library.ru

Ніколаєва І., Галенова Т., Савчук О. Сучасні уявлення щодо ролі тромбоцитарних рецепторів у процесі формування тромбу	5
Харченко О., Савчук О., Остапченко Л. Аналіз змін білкового профілю при хронічній інтоксикації для діагностування розвитку даного патологічного стану організму	11
Лещенко І., Вірченко О., Гаділія О., Лазаренко Л., Фалалєєва Т. Параметри вуглеводного обміну при глутамат-індукованому ожирінні у щурів за умов корекції пробіотичними штамами лактобацил та біфідобактерій	20
Сінгаєвський Є. До вивчення фауни павуків (ARACHNIDA, ARANEI) вологих вільшаників заплави р. Стугна (Київська область)	23
Щербакова Ю., Джаган В. Перші відомості про гриби та грибоподібні організми природного заповідника "Древлянський"	27
Білушенко А. Використання рукокрилими сховищ в умовах центрального лісостепу України	29
Маркова А., Серебряков В. Поведінкові акти чорного та співочого дроздів на місцях водою	33
Плиська О., Добростан О., Лазоришинець В., Тивончук О., Таран Л. Взаємозв'язок патологічного ожиріння і хронічної запальної реакції тонкої кишки	38
Кондратюк Т., Калініченко А. Структурно-функціональна реорганізація диморфних чорних дріжджів <i>EXOPHIALA ALCALOPHILA</i> під впливом рослинних ефірних олій	42
Яценко О. Еритрометрія у вивченні адаптивних та реактивних станів спортсменів впродовж тренувального процесу	46
Лабунець Г. Субстратна специфічність катепсину <i>H</i> нетрансформованої тканини та тканини помірно диференційованої форми інфільтруючого дольового раку молочної залози	50
Дворченко К., Ашпін М., Воєйков А., Короткий О. Дія хондроїтину сульфату натрію на окисно-антиоксидантний баланс у сироватці крові щурів з каррагінан-індукованим запаленням задньої кінцівки	53
Утєвська О., Атраментова Л., Балановська О., Балановський О. Мінливість STR локусів Y-хромосоми в популяціях українців	55
Лавриненко В., Чайковський Ю., Дегтярьова Л. Біологічний вплив алмазних наночастинок та технічного вугілля на структурно-функціональний стан нирок курячих ембріонів	61
Вовчук І. Амінокислотний склад карбоксипептидази А незміненої та пухлинних тканин ендометрія та яєчників	64
Расцька Я. Рівень прозапальних та протизапальних цитокінів у сироватці крові щурів за умов моделювання лужного опіку стравоходу 1 та 2 ступеня	67
Майстренко А., Войтенко Н. Особливості кальцієвої сигналізації при ішемічному ураженні нервових тканин-нейронів гіпокампа	70
Світліна Г., Гарманчук Л., Шаблій В. Методи отримання мультипотентних стовбурових клітин плаценти у щурів	73
Тугай А., Тугай Т., Лукашов Д. Вплив хронічного опромінення на фізіолого-біохімічні властивості трьох опромінених "поколінь" <i>Aspergillus versicolor</i>	77
Воєйкова Д., Степанова Л., Кондро М., Савчук О., Остапченко Л. Склад білків гепатоцитів щурів за умов глутамат-індукованого ожиріння та його корекції	81

СОДЕРЖАНИЕ

Николаева И., Галенова Т., Савчук А. Современные представления о роли тромбоцитарных рецепторов в процессе формирования тромба.....	5
Харченко О., Савчук А., Остапченко Л. Анализ изменений белкового профиля хронической алкогольной интоксикации для диагностирования развития данного патологического состояния организма.....	11
Лещенко И., Вирченко А., Гадилия О., Лазаренко Л., Фалалеева Т. Параметры углеводного обмена при глутамат-индуцированном ожирении у крыс в условиях коррекции пробиотическими штаммами лактобацилл и бифидобактерий	20
Сингаевский Е. К изучению фауны пауков (ARACHNIDA, ARANEI) ольшаников поймы р. Стугна (Киевская область).....	23
Щербакова Ю., Джаган В. Первые данные о грибах и грибоподобных организмах природного заповедника "Древлянский".....	27
Билушенко А. Использование рукокрылыми убежищ в условиях центральной лисостепи Украины.....	29
Маркова А., Серебряков В. Поведенческие акты певчего и черного дроздов на местах водопоя.....	33
Плиски А., Добростан О., Лазоришинец В., Тивончук А., Таран Л. Взаимосвязь патологического ожирения и хронической воспалительной реакции тонкой кишки.....	38
Кондратюк Т., Калиниченко А. Структурно-функциональная реорганизация диморфных черных дрожжей <i>EXOPHIALA ALCALOPHILA</i> под влиянием растительных эфирных масел	42
Яценко Е. Эритрометрия в изучении адаптивных и реактивных состояниях спортсменов на протяжении тренировочного процесса	46
Лабунец Г. Субстратная специфичность катепсина <i>H</i> нетрансформированной ткани и ткани умеренно дифференцированной формы инфильтративного дольового рака молочной железы	50
Дворченко Е., Ашпин Н., Воейков А., Короткий А. Действие хондроитина сульфата натрия на окислительно-антиоксидантный баланс в сыворотке крови крыс с каррагинан-индуцированным воспалением задней конечности.....	53
Утевская О., Атраментова Л., Балановская Е., Балановский О. Изменчивость STR локусов Y-хромосомы в популяциях украинцев	55
Лавриненко В., Чайковский Ю., Дегтярева Л. Биологическое влияние алмазных наночастиц и технического угля на структурно-функциональное состояние почек куриных эмбрионов.....	61
Вовчук И. Аминокислотный состав карбоксипептидазы А неизменной и опухолевых тканей эндометрия и яичников	64
Раецкая Я. Уровень провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови крыс при моделировании щелочного ожога пищевода 1 и 2 степени.....	67
Майстренко А., Войтенко Н. Особенности кальциевой сигнализации при ишемическом поражении нервной ткани-нейронов гиппокампа	70
Свитина Г., Гарманчук Л., Шаблий В. Методы получения мультипотентных стволовых клеток плаценты у крыс	73
Тугай А., Тугай Т., Лукашов Д. Влияние хронического облучения на физиолого-биохимические свойства трех облученных "поколений" <i>Aspergillus versicolor</i>	77
Воейкова Д., Степанова Л., Кондро М., Савчук А., Остапченко Л. Анализ состава белков гепатоцитов крыс в условиях глутамат-индуцированного ожирения и его коррекции.....	81

CONTENTS

Nikolaeva I., Halenova T., Savchuk O. Modern conceptions of the role of platelet receptors in the dynamics of thrombus formation	5
Kharchenko O., Savchuk O., Ostapchenko L. Analiz protein profile changes in chronic alcohol intoxication to diagnose the development of this pathological conditions.....	11
Leshchenko I., Virchenko O., Gadiliya O., Lazarenko L., Falalyeyeva T. Carbohydrate metabolism parameters under the glutamate-induced obesity in rats and concomitant correction with probiotics strains of lactobacilli and bifidobacteria	20
Singaevskiy E. To the study of spider fauna (ARACHNIDA, ARANEI) of the alder grove in the Stuhna river valley (KIEV REGION).....	23
Shcherbakova Yu., Dzhagan V. The first date about fungi and fungus – like organisms of Drevlanskiy nature reserve	27
Bilushenko A. Use of shelters by bats in the central forest-steppe of Ukraine	29
Markova A., Serebryakov V. Behavioral acts and blackbird thrush on watering place.....	33
Pluska A., Dobrostan O., Lazoryshynets V., Tivonchuk A., Taran L. The relationship of obesity and inflammatory intestinal reactions.....	38
Kondratiuk T., Kalinichenko A. Structural-functional reorganization dimorphous black yeast-like fungi <i>EXOPHIALA ALCALOPHILA</i> under influence of plant essential oils.....	42
Yatsenko O. Eritrometriya in the study adaptive and reactive status athletes during training process.....	46
Labunets G. Substrate specificity of cathepsin H in untransformed tissues of mammary gland and in tissues of moderately differentiated form of lobular infiltrating breast cancer	50
Dvorshchenko K., Ashpin M., Voeikov A., Korotkyi O. The effect chondroitin sodium sulfate on oxidation-antioxidant balance in the blood serum of carrageenan-induced inflammation in the rat hindpaw.....	53
Utevska O., Atramentova L., Balanovska E., Balanovsky O. Y-chromosome STR variation in Ukrainian populations	55
Lavrinenko V., Tchaikovskiy Yu., Degtiarova L. Biological effect of nanodiamonds and soot on structural and functional conditions of chicken embryo kidneys	61
Vovchuk I. Amino-acid content of a carboxypeptidase A from non- malignant and tumor tissues of endometrium and ovarium.....	64
Raetska Ya. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines level in rat's serum under modeling alkali burns of the esophagus of 1st and 2nd degrees	67
Maistrenko A., Voitenko N. Features of calcium signaling in ischemic injury nervous tissue – of neurons in the hippocampus	70
Svitina G., Garmanchuk L., Shabliy V. Methods of obtaining multipotent stem cells of the placenta in rats.....	73
Tugay A., Tugay T., Lukashov D. Influence of low chronic exposure on physiological and biochemical properties of three irradiated generations <i>Aspergillus versicolor</i>	77
Voieikova D., Stepanova L., Kondro M., Savchuk O., Ostapchenko L. Protein analysis of rat hepatocytes under conditions glutamate-induced obesity and its correction.....	81

СУЧАСНІ УЯВЛЕННЯ ЩОДО РОЛІ ТРОМБОЦИТАРНИХ РЕЦЕПТОРІВ У ПРОЦЕСІ ФОРМУВАННЯ ТРОМБУ

Дослідження молекулярно-біологічних аспектів функціонування тромбоцитів, із залученням біохімічних методів, новітніх технологій клітинної та молекулярної біології, стали основою для розуміння сигнальних каскадів, що регулюють активацію, адгезію і агрегацію цих клітин. У даному огляді узагальнена сучасна інформація щодо участі мембранних рецепторів тромбоцитів у процесах фізіологічного і патологічного формування тромбу, проаналізована можлива роль тромбоцитарних рецепторів як мішені дії антиагрегаційних агентів, визначено нові перспективні напрямки пошуку ефективних та специфічних антитромботичних препаратів.

Ключові слова: тромбоцити, мембранні рецептори, процес тромбоутворення, агрегація.

Згідно існуючих уявлень тромбоцити циркулюють в кров'яному руслі у відносно неактивному стані і не взаємодіють ні між собою, ні з інтактним ендотелієм, що вистилає кровеносні судини. Пошкодження судинної стінки запускає каскад процесів, що призводить до появи у кровотоці одразу декількох індукторів агрегації. Ці речовини опосередковують свій вплив через рецептори у складі тромбоцитарної мембрани, активуючи відповідні внутрішньоклітинні сигнальні каскади, наслідком яких є ініціація процесів активації і агрегації тромбоцитів. Власне процес тромбоутворення є надзвичайно складним і може бути розділений на три стадії.

Фаза ініціації – адгезія тромбоцитів до судинної стінки з утворенням моношару активованих клітин

На першій стадії формування тромбу відбувається адгезія поодиноких тромбоцитів до субендотеліального матриксу або активованого ендотелію. Даний процес ініціюється при пошкодженні судинної стінки та дисфункціях ендотелію, що можуть бути спричинені гострою гіпертензією, вільними радикалами, бактеріальними токсинами, вірусною інфекцією, цитокінами (TNF, IL-1 та ін.), імунними комплексами та ін. [1]. При цьому з ендотеліальних клітин у кров і екстрацелюлярний матрикс вивільняється вміст тілець Вейбеля-Паладе, серед якого – фактор фон Віллебранда (vWF) – ключовий індуктор ініціації процесів адгезії (взаємодія з судинною стінкою) та агрегації (взаємодія з іншими тромбоцитами) тромбоцитів [2].

vWF виконує дві основні функції: по-перше, взаємодіючи з тромбоцитарним рецептором GPIIb/IX/V, забезпечує взаємозв'язок субендотеліального колагенового матриксу з мембраною тромбоцитів, тим самим, сприяє прикріпленню клітин до ділянки пошкодженої судини; по-друге vWF є носієм фактора згортання крові VIII, стабілізує його структуру (захист від інактивації протеїном С і Ха-фактором) і доставляє до місця пошкодження [3].

Комплекс GPIIb/IX/V є основним тромбоцитарним рецептором для vWF, однак він може також зв'язувати інші білки адгезії (колаген, тромбоспондин-1), α -тромбін, фактори коагуляції (кініноген, XI, XII), а також мембранні білки Р-селектин, забезпечуючи взаємодію з активованими ендотеліальними клітинами, і Мас-1 (або інтегрин $\alpha_M\beta_2$), забезпечуючи взаємодію з лейкоцитами. Функціональний рецептор GPIIb/IX/V представляє собою комплекс із чотирьох трансмембранних лейцинозбагачених глікопротеїнів (GP): GPIIb (135 кДа), GPIIb (26 кДа), GPIIX (20 кДа), GPV (82 кДа), об'єднаних у стехіометричному співвідношенні 2:2:2:1 відповідно [4, 5]. Елементи комплексу GPIIb, GPIIb, GPIIX тісно взаємодіють між собою і відсутність хоча б одного з глікопротеїнів негативно відображається на зовнішньоклітинній експресії і функціонуванні рецептора в цілому. Тоді як, зв'язок з GPV є слабким, а відсутність даної субодиниці не впливає ні на експресію комплексу, ні на його взає-

модію з vWF. Однак, GPV є необхідним для взаємодії рецептора, а саме його GPIIb субодиниці, з тромбіном.

Точний механізм активації тромбоцитів внаслідок взаємодії vWF з GPIIb/IX/V остаточно не визначений. Відомо, що vWF взаємодіє з N-кінцевим доменом (1-282) GPIIb, де також розташовані частково перекриті, але не ідентичні сайти зв'язування з лейкоцитарним інтегрином $\alpha_M\beta_2$, α -тромбіном і Р-селектином. Цитоплазматичний домен GPIIb асоційований з білками філаміном, кальмодуліном і протеїном 14-3-3 ζ , які забезпечують зв'язок з наступними сигнальними молекулами, ключовою з яких є внутрішньоклітинна Src кіназа (Lyn), яка є першим елементом каскаду: Lyn $\rightarrow$ PI3K $\rightarrow$ Akt $\rightarrow$ eNOS ($\uparrow$ NO) $\rightarrow$ sGC ($\uparrow$ cGMP) $\rightarrow$ PKG $\rightarrow$ M APK. Роль NO і cGMP у процесі активації тромбоцитів двояка: низькі концентрації стимулюють цей процес, тоді як високі – навпаки інгібують. Ще одною мішенню дії фосфатидилінозитол-3-кінази (PI3K) є фосфоліпаза Cy2 (PL Cy2), яка викликає активацію протеїнкінази C (PKC). Наслідками активації сигналу ФВБ-GPIIb/IX/V є підвищення рівня цитоплазматичного Ca^{2+} , синтез тромбоксану A_2 (TxA_2), секреція тромбоцитарних гранул і незалежна активація тромбоцитарного інтегринового рецептора $\alpha_{IIb}\beta_3$ [6,7]. Нові дослідження також показали, що комплекс GPIIb/IX/V тісно взаємодіє з іншими внутрішньоклітинними білками, важливими для клітинної сигналізації тромбоцитів, такими як FcR γ та Fc γ RIIA [8], сигналізації від яких буде детально розглянута нижче.

Порушення функціонування рецептора GPIIb/IX/V у людей може призвести до розвитку синдрому Бернара-Сульє – вродженої дистрофії тромбоцитів, що характеризується нездатністю останніх до агрегації і супроводжується крововиливами у шкіру, слизові оболонки, легені та нирки [9].

Після встановлення ролі комплексу GPIIb/IX/V у процесах адгезії і активації тромбоцитів даний рецептор та його ліганд (vWF) були визначені як можливі мішені дії антитромботичних агентів. Використання моноклональних антитіл специфічних як проти vWF [10], так і проти самого рецептора [13], що здатні блокувати сайти зв'язування vWF з субодиницею GPIIb, а також антагоністів комплексу GPIIb/IX/V, ізольованих із зміїної отрути [11,12] сьогодні розглядається як перспективний альтернативний напрямок антитромботичної терапії.

Початкова стадія адгезії тромбоцитів на судину стінку також вимагає взаємодії даних клітин з колагеном, який у великій кількості присутній у місцях травмування судини. Серед різних форм колагену лише I та III залучені до процесу адгезії тромбоцитів до місця пошкодження. Дані форми колагену мають спорідненість до vWF і, тим самим, здатні утворювати з ним функціональну одиницю, необхідну для формування тромбу: де vWF виконує функцію початкового захоплення і прикріплення тромбоцитів до судини, а колаген дозволяє

створити стабільні зв'язки для міцної адгезії і запуску активації тромбоцитів [14]. Механізм за яким колаген впливає на адгезію і активацію тромбоцитів ще не достатньо вивчений. На сьогодні відомо про існування щонайменше двох тромбоцитарних рецепторів, які можуть безпосередньо взаємодіяти з колагеном: один з них належить до родини імунoglobulin-подібних рецепторів – GPVI, інший – до родини інтегринів – $\alpha_2\beta_1$ (або GPIIb/IIIa). Комплекс GPIIb/IIIa головним чином підтримує зв'язок тромбоциту з колагеном, у той час як рецептор GPVI передає сигнал через мембрану всередину клітини для подальшої активації тромбоцита.

Глікопротеїн GPVI (62 кДа) – це виключно тромбоцитарний колагеновий рецептор, що має низьку афінність до колагену, але високу ефективність у генеруванні початкового сигналу. Даний рецептор містить два зовнішньоклітинні імунoglobulin-подібні домени; муцинзбагачену ділянку, що має численні сайти для O-глікозилювання; трансмембранний домен, який містить залишок аргініну, необхідний для утворення іонного зв'язку з γ -ланцюгом Fc-рецепторів (FcR γ); і короткий цитозольний хвіст. GPVI конститутивно формує димерні комплекси з FcR γ . Останні належать до імунорецепторів, що містять цитозольний пролінзбагачений домен, який може утворювати зв'язки з SH3-доменом Src кінази і тирозиновий активаційний мотив (ITAM), фосфорилування двох консервативних залишків тирозину в якому є обов'язковою умовою подальшої передачі сигналу в середину клітини. За умов зв'язування колагену або іншого специфічного ліганду з GPVI (даний рецептор розпізнає амінокислотну послідовність гліцил-пролін-оксипролін, Gly-Pro-Hyp, GPO [15]), цитозольні Src кінази (Lyn/Fyn) фосфорилують залишки тирозину у складі мотиву ITAM FcR γ -ланцюга, тим самим, активуючи наступні ланки сигнальної трансдукції. Центральне місце у цьому процесі належить формуванню сигналосоми, що складається з ряду сигнальних та адапторних білків (LAT, SLP76, Gads), які у подальшому активують фосфоліпазу C γ_2 (PL C γ_2). Ці події призводять до повної активації тромбоциту [16]. У геномодифікованих мишей з відсутнім GPVI рецептором або FcR γ -ланцюгом спостерігалось блокування відповіді тромбоцитів на колаген і зниження здатності до тромбоутворення [17,18].

У досліджах *in vivo* показано, що моноклональні антитіла до GPVI можуть інгібувати тромбози у експериментальних тварин без ефекту подовження часу кровотечі [19]. Такі результати можуть бути покладені в основу майбутніх досліджень і сприяти відкриттю нових підходів для клінічного використання GPVI у якості терапевтичної мішені.

Інтегрин $\alpha_2\beta_1$, що також відомий як GPIIb/IIIa, VLA-2, CD49b/CD29, виконує важливу роль в адгезії колагену до тромбоцитів і у подальшій їх активації. У пацієнтів із спадковим зниженням експресії інтегринів спостерігалася схильність до кровотеч і зниження відповіді тромбоцитів на дію колагену [20]. У *in vivo* дослідженнях механізму розвитку артеріального тромбозу у мишей дефіцитних на α_2 або β_1 субодиниці даного інтегрину було отримано суперечливі результати, які показали, як незмінне утворення тромбу [21], так і формування нестабільних або зменшених тромбів [22,23]. Останні дослідження показали, що механізм активації $\alpha_2\beta_1$ такий самий як і у інших інтегринів і включає взаємодію цитоплазматичного домену α_1 з внутрішньоклітинними білками таліном і кіндином-3 [24].

Таким чином, достовірно відомо, що $\alpha_2\beta_1$ і GPVI діють синергічно для оптимальної адгезії тромбоцитів і активації їх у відповідь на дію колагену. Участь цих рецепторів у динаміці формування тромбу залежить від

характеру ураження судин, швидкості кровотоку й інших, ще досі не встановлених, факторів. Незважаючи на це, доведено, що відсутність білків $\alpha_2\beta_1$ і GPVI в організмі людини, не пов'язано з розвитком основних дефектів системи гемостазу [20,25]. Необхідно зазначити, що регуляція активності колагенових рецепторів у даний час розглядається як напрям для розробки нової антитромботичної стратегії [26].

Отже, кінцевим результатом взаємодії ФВБ і колагену з відповідними рецепторами є активація тромбоцитів та їх адгезія до ендотелію, що призводить до утворення моношару тромбоцитів у місці ушкодження судинної стінки.

Фаза прогресування – рекрутування та активація додаткових тромбоцитів із кровотоку з подальшим збільшенням розмірів тромбу

Наступним етапом, необхідним для утворення тромбу, є залучення додаткових тромбоцитів з кровотоку, які при активації набувають здатності взаємодіяти один з одним. Власне цей процес і називають агрегацією тромбоцитів. Його реалізація стає можливою завдяки накопиченню у плазмі біологічно активних речовин-активаторів, які секретуються активованими тромбоцитами.

У цитозолі тромбоцитів розміщені α - і δ -гранули. α -Гранули містять білки необхідні для підтримання гемостатичних функцій тромбоцитів: vWF, фібриноген, Р-селектин, тромбоцитарний фактор 4, тромбоспондин, тромбоцитарний фактор росту. δ -Гранули багаті на нуклеотиди (АДФ та АТФ), серотонін, гістамін, пірофосфат і Ca^{2+} . При активації вміст гранул поетапно вивільняється і у подальшому сприяє активації і агрегації тромбоцита [27]. Саме серед компонентів тромбоцитарних гранул знаходяться основні агоністи тромбоцитарних рецепторів – АДФ, TxA_2 , тромбін і адреналін, що виконують першочергову функцію у процесі збільшення та стабілізації тромбу.

Джерелом АДФ можуть бути не лише δ -гранула тромбоцитів а й еритроцити у місцях пошкодження кровоносних судин. АДФ може спричиняти ряд послідовних реакцій активації, включаючи вивільнення Ca^{2+} з внутрішньоклітинних депо, синтез TxA_2 , зміну форми тромбоцитів, секрецію гранул, активацію рецепторів $\alpha_{IIb}\beta_3$ і власне агрегацію. Всі ці реакції опосередковуються взаємодією АДФ з мембранозв'язаними G-білок-асоційованими пуриновими рецепторами: P_2Y_1 і P_2Y_{12} . Дослідження на нокаутних мишах допомогли визначити різну але взаємодоповнюючу роль цих двох рецепторів у процесі формування тромбу [28].

Активация рецептора P_2Y_1 , через залучення зв'язаного з ним гетеротримерного гуанін-нуклеотидзв'язуючого білка Gq, призводить до стимуляції PL C β з послідовним підвищенням рівня цитозольного Ca^{2+} і активацією PK C, що, у свою чергу, викликає зміну форми тромбоцитів і їх тимчасову агрегацію. Наслідком активації рецептора P_2Y_{12} , який зв'язаний з білком Gi, є інгібування аденілатциклази, що призводить до зниження синтезу cAMP і подальшого обмеження активності протеїнкінази А (PKA), дефосфорилування вазодилатор стимульованого фосфопротеїну (VASP) і малих ГТФаз (Rap1B) – білків важливих для активації рецепторів $\alpha_{IIb}\beta_3$ [9]. Серед важливих сигнальних подій, опосередкованих P_2Y_{12} -рецепторами – активація PI3K, яка, модулює відкриття Ca^{2+} -каналів ендоплазматичного ретикулюму і вихід Ca^{2+} в цитозоль тромбоцитів.

Спираючись на результати різних досліджень, саме рецептори P_2Y_{12} були визнані основними у реалізації АДФ-залежної активації та агрегації тромбоцитів. Даний рецептор є ключовою мішенню дії тієнопіридинових медикаментозних засобів (клопідогрель, прасугрель,

тиклопіридин), які широко використовуються для запобігання і профілактики серцево-судинних захворювань [29]. Клінічні дослідження довели важливе фізіологічне значення цих рецепторів, що спонукало розглядати їх як ключову мішень впливу нових антитромботичних препаратів [29,30].

Окрім P_2Y_1 та P_2Y_{12} , на мембрані тромбоцитів експресується третій вид пуринових рецепторів – P_2X_1 , які також відіграють важливу роль у їх функціонуванні. P_2X_1 – це АТФ-залежний кальцієвий канал, який залучений до процесу агрегації тромбоцитів, а в умовах високого кров'яного тиску здатен виступати у ролі позитивного регулятора відповіді тромбоцитів на колаген і, тим самим, брати участь в утворенні тромбів. Результати досліджень показують, що препарати, націлені на P_2X_1 рецептори можуть бути ефективними антитромботичними засобами, в умовах високої швидкості кровотоку [30].

Іншим важливим медіатором агрегації і деагрегації тромбоцитів є TxA_2 – представник родини ейкозаноїдів, який синтезується активованими тромбоцитами під дією ферментів циклооксигенази (COX) і тромбоксансинтази. TxA_2 є вазоконстриктором і потужним агоністом агрегації тромбоцитів, може викликати зміну їх форми, активацію PL C, мобілізацію Ca^{2+} , секрецію гранул, активацію внутрішньоклітинних сигнальних та адапторних молекул, залучених до процесів клітинної активації та агрегації [31]. Після того, як TxA_2 синтезувався, він може дифундувати крізь мембрану тромбоцитів і активувати інші клітини, тим самим сприяти зростанню тромба. Підвищений синтез TxA_2 може бути фактором патогенезу тромботичних захворювань, у тому числі: інфаркту міокарда, стенокардії, тромбоемболії легеневої артерії та атеросклерозу [32]. На сьогоднішній день доведено, що інгібування синтезу TxA_2 є ефективним підходом у антитромботичній терапії. Одним із антиагрегаційних препаратів, ефективність якого перевірена та підтверджена результатами численних великомасштабних плацебо-контрольованих досліджень, є ацетилсаліцилова кислота (аспірин) [33, 34]. Даний нестероїдний протизапальний засіб необоротно зв'язується з активними центрами, локалізованими на стінці гідрофобного каналу молекули COX. Ацетилювання в активному центрі COX блокує транспорт арахідонової кислоти – субстрату для синтезу простагландинів і тромбоксанів, як наслідок, зменшується синтез циклічних ендоперексидів (PGH_2 і PGD_2), що є попередниками TxA_2 , а також знижується утворення простаглініна – речовини з вазодилатуючою і дезагрегаційною дією [35, 36]. Показано, що при застосуванні малих доз аспірину інгібується синтез лише TxA_2 (без блокади простаглініна), тоді як при дозі аспірину вище 160 мг порушується синтез і простаглініна. Тому в останні роки приймання аспірину рекомендовано у дозі, не більш 75 мг, у якій він інгібує агрегацію тромбоцитів без порушення синтезу простаглініна.

Рецептори до TxA_2 існують у двох сплайсингових варіантах ($TP\alpha$ і $TP\beta$), які відрізняються С-кінцевим цитоплазматичним доменом. Місця зв'язування ліганду – ідентичні для обох варіантів сплайсингу, але деякі дослідження свідчать про різні механізми взаємодії $TP\alpha$ і $TP\beta$ з внутрішньоклітинними G-білками [37,38]. У тромбоцитах людини, $TP\alpha$ – єдина ізоформа, хоча мРНК $TP\beta$ також присутня [38]. Встановлено, що тромбоцитарні TP асоційовані з білками G_q і $G_{12/13\alpha}$: стимуляція сигналу через G_q передбачає активацію сигнальних подій, подібних до тих що мають місце при активації P_2Y_1 (підвищення внутрішньоклітинного рівня IP_3 і Ca^{2+}), тоді як стимуляція сигналу через $G_{12/13\alpha}$ призводить до активації Rho ГТФаз, реорганізації актинового цитоскелету, що, у свою чергу, викликає зміни архітекtonіки кіль-

ця мікротрубочок, формування філоподії і ламеллоподії і, як наслідок, зміну форми тромбоциту [39].

Серед усіх індукторів тромбогенеза найбільш ефективним вважається тромбін, який, навіть, за дуже низьких концентрацій (0,1 нмоль/л) може за лічені секунди викликати підвищення цитозольного рівня Ca^{2+} у десятки разів, запускаючи низхідні сигнальні каскади, які призводять до зміни форми, секреції тромбоцитарних гранул та агрегації [9,40,41].

Утворення тромбіну вимагає протікання ряду реакцій на поверхні тромбоцитів, що асоційовані з теназним комплексом (фактор IXa у комплексі з фактором VIIa активують фактор X) і протромбіназним комплексом (фактор Xa у комплексі з Va активують фактор II) [42].

До тромбіну на поверхні тромбоцитів людини існує два види рецепторів: PAR-1 і PAR-4 [43]. Окрім того, субодиниця $GP_{Ib\alpha}$ комплексу $GP_{Ib}/IX/V$ містить сайти зв'язування α -тромбіну [44]. Дослідження показують, що приєднання тромбіну до $GP_{Ib\alpha}$ викликає адгезію та агрегацію тромбоцитів, але остаточна роль такої взаємодії залишається нез'ясованою [44,45].

Рецептори PAR активуються шляхом незворотного протеолітичного розщеплення в межах першої зовнішньоклітинної петлі, а новоутворений позаклітинний N-кінець бере участь у взаємодії з лігандом [43]. Короткі синтетичні пептидоміметики N-термінальних послідовностей (SFLLR і GYPGQV для PAR-1 і PAR-4, відповідно) можуть безпосередньо активувати ці рецептори, відтворюючи більшість ефектів тромбіну на тромбоцити.

Встановлено існування відмінностей у динаміці активації PAR-1 і PAR-4. Так, була запропонована модель подвійної рецепторної сигналізації, згідно якої: PAR-1 є основним медіатором активації (активується за низької концентрації тромбіну), а PAR-4 відіграє роль резервного рецептора (активується за високої концентрації тромбіну). Після зв'язування з рецептором тромбін "отримує доступ" до активації основної мережі сигнальних шляхів тромбоцитів, тим самим, викликаючи повну мобілізацію тромбоцитів [43].

Різноманіття ефектів при активації PAR-1 пов'язане з участю кількох різновидів G-білків, асоційованих з різними внутрішньоклітинними кінзазами. На сьогодні достовірно не встановлені фактори, що спонукають перебіг сигнальної трансдукції тим чи іншим шляхом. Ключовою подією в реалізації проагрегантного ефекту PAR є мобілізація Ca^{2+} . Встановлено, що мобілізація Ca^{2+} , опосередкована рецептором PAR-4, повільніша і довго триваліша, ніж у відповідь на стимуляцію PAR-1 [46]. Окрім класичних ефектів стимуляції G-асоційованих рецепторів: зміни форми тромбоцитів, секреції тромбоцитарних гранул, взаємозв'язок тромбіну і PAR-1 веде до транслокації P-селектину і ліганду CD40 на плазматичну мембрану, що підсилює зв'язок між тромбоцитами і ендотелієм [47]. Описано також посилення утворення інших факторів, зокрема ендотеліального фактора росту судин (VEGF), який запускає ініціацію ангіогенезу.

Зважаючи на важливу роль у підтриманні гемостазу та процесів тромбоутворення, рецептори PAR є потенційною мішенню для створення нових антитромботичних препаратів [48].

Не можна не згадати про внесок катехоламінів у регуляції системи гемостазу та процесу тромбоутворення, який реалізується як через їх констрикторну дію на судинну стінку, так і через безпосередній вплив на тромбоцити. Так, адреналін, що циркулює або локально секретується у судині, сприяє активації тромбоцитів у зростаючому тромбі. Адреналін вважається слабким агоністом, який може активувати PL C і викликати зміну форми

тромбоцитів. Тим не менш, він діє синергічно з багатьма іншими агоністами і при низьких концентраціях посилює їх ефект. Дія адреналіну на тромбоцити пов'язана з його здатністю пригнічувати утворення cAMP, що можливо за рахунок активації сигналу через α_2 A-адренергічні рецептори, що асоційовані з цитозольним білком родини Gi – Gz [49]. Нещодавні дослідження показали, що зміна рівня експресії α_2 A-адренергічних рецепторів під дією таких факторів як вік, фізичні навантаження або наявність патологічних порушень, може бути пов'язана зі змінною чутливості до адреналіну [50].

Отже, ключовим результатом процесу агрегації тромбоцитів є збільшення тромбу який на наступних етапах потребує стабілізації.

Фаза стабілізації – молекулярний каскад, що запобігає спонтанній дезагрегації

Останній етап у формуванні тромбу, який перешкоджає втраті крові у місці пошкодження судини, називається фазою стабілізації. Агреговані тромбоцити, в межах сформованої тромбоцитарної пробки, утворюють щільні контакти. Події останньої фази зміцнюють утворений тромб і перешкоджають його передчасній дезагрегації.

Найбільш поширена контакт-залежна сигналізація під час фази стабілізації – це внутрішньоклітинна сигналізація через інтегринові рецептори, ключовим з яких є рецептор $\alpha_{IIb}\beta_3$. Активація $\alpha_{IIb}\beta_3$ -інтегринів потребує ініціації усіх вище перерахованих сигнальних подій, включаючи активацію однієї або декількох ізоформ PL C, підвищення рівня внутрішньоклітинного Ca^{2+} , стимуляцію PK C і PI3K, що викликають реорганізацію цитоскелету тромбоцитів і активацію його білків, включаючи талін [51, 52]. Активовані талін може зв'язуватися із цитоплазматичним доменом $\alpha 3$ -субодиниці інтегринів, викликаючи дисоціацію цитоплазматичного хвоста і трансмембранного домену α_{IIb} і β_3 , що сприяє олігомеризації інтегринів і зв'язування фібриногену. Модуляція афінності $\alpha_{IIb}\beta_3$ можлива через Rap-1-RIAM-талінсигнальний комплекс [39]. Тригером активації β -інтегринів та її зв'язку з таліном є білок кіндлін-3. Дефект експресії інтегринів лежить в основі розвитку синдрому ледачих лейкоцитів і кровотеч за типом Гланцмана. Ці захворювання можуть бути пов'язані з дефектом активності або експресії Rap-1 або кіндлін-3. В активації $\alpha_{IIb}\beta_3$ -інтегрина рецепторів також бере участь протеїнкіназа Akt-1. Даний трансдуктор також забезпечує реалізацію сигналу, що запускається тромбіном і колагеном [53].

Після зв'язування фібриногену з $\alpha_{IIb}\beta_3$ рецептором ініціюється ряд послідовних подій, необхідних для росту та стабілізації тромбу. Вони включають реорганізацію цитоскелету, формування та стабілізацію великих агрегатів тромбоцитів і розвиток прокоагулянтної поверхні. Це допомагає зменшити проміжки між тромбоцитами і збільшити концентрацію агоністів [16,40]. Сьогодні рецептор $\alpha_{IIb}\beta_3$ використовують як терапевтичну мішень впливу під час антитромботичної терапії та у лікуванні стенокардії. Дослідження функціонування цього рецептора та механізму його дії продовжується, що пояснюється необхідністю вдосконалення існуючих на даний час лікарських засобів [40].

Інтегрини не єдині молекули, що беруть участь у стабілізації тромбу. Експресія молекул адгезії (JAM-A і JAM-C) посилює і стабілізує взаємодію між сусідніми тромбоцитами та тромбоцитами і лейкоцитами [54]. Схожу функцію виконує молекула адгезії SLAM (CD150).

Ліганд CD40 (CD40L, CD154), білок сімейства TNF, що присутній на поверхні активованих тромбоцитів, також є важливим у процесі зміцнення тромбу. Цей білок утворює розчинну форму – sCD40L, яка може

зв'язуватися з рецептором CD40 та $\alpha_{IIb}\beta_3$, забезпечуючи внутрішньоклітинну сигналізацію через інтегрини [55].

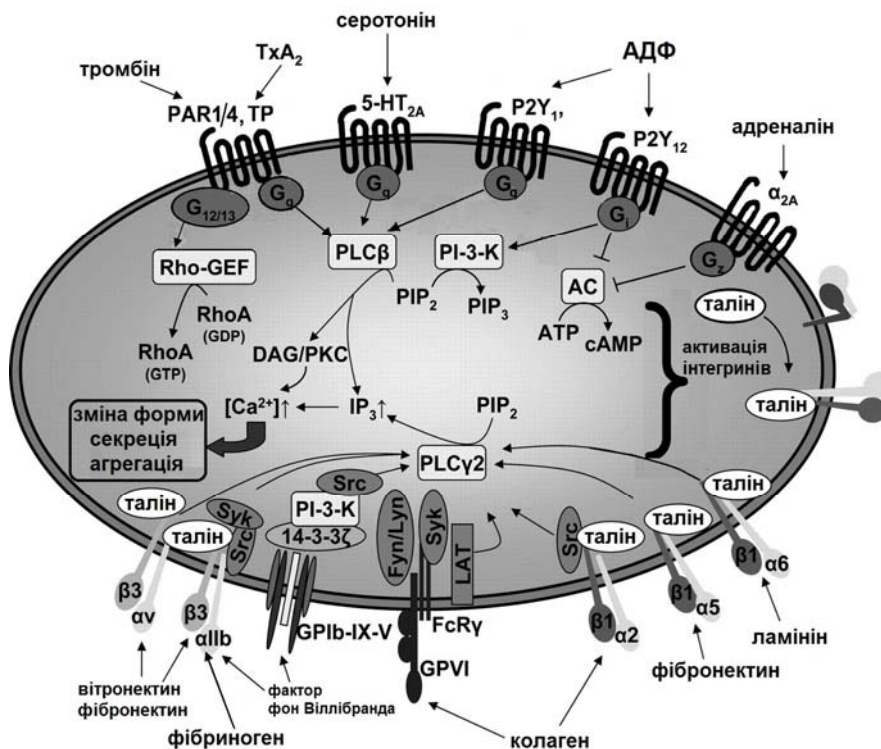
Рецепторні тирозинкінази Eph та їх ліганди, відомі як ефрини, забезпечують інший механізм сигналізації, який сприяє утворенню прямих контактів між тромбоцитами [54,56]. Тромбоцити людини експресують EphA4, EphB1 і ефрин В, які асоційовані з $\alpha_{IIb}\beta_3$ як у неактивних, так і у активованих тромбоцитах. Кластеризація обох і EphA4 і EphB1 викликає адгезію тромбоцитів до іммобілізованого фібриногену. На відміну від цього, блокада взаємодії Eph-ефрин перешкоджає утворенню згустку через ускладнення фосфорилування β_3 у комплексі $\alpha_{IIb}\beta_3$. Це перешкоджає агрегації тромбоцитів при низьких концентраціях агоністів.

Додаткові взаємодії, що сприяють регуляції утворення тромбу, зумовлені приєднанням лігандів семафорин 4D (Sema4D, CD100) і Gas-6 до відповідних тромбоцитарних рецепторів [56,57]. Біохімічні дослідження показали, що Gas-6 посилює передачу сигналів через $\alpha_{IIb}\beta_3$ шляхом активації PI3K і протеїнкінази Akt, а також сприяє фосфорилуванню β_3 , тим самим сприяючи ущільненню згустку. Тому, інгібування сигналізації у відповідь на дію Gas-6 було запропоновано як перспективний напрямок для пошуку та створення нових антитромботичних засобів [26].

До останніх подій, які сприяють стабілізації тромбу, відносять формування фібринової мережі. Нещодавні дослідження показали, що її утворення, залежить від мікрочастинок, які захоплюються тромбом шляхом взаємодії з Р-селектином, який експресується на поверхні активованих тромбоцитів, і PSGL-1, присутнього на цих мікрочастинках [58].

Однак, механізм стабілізації тромбу залишається не вивченим до кінця, а список молекул, які беруть участь у цьому процесі постійно зростає [59].

Отже, як зрозуміло з вищезазначеного, протягом останніх декількох років спостерігається значний прогрес у розумінні механізмів функціонування системи гемостазу. На даний час, існує достатньо доказів того, що тромбоцитам належить першочергова роль на всіх етапах динамічного процесу тромбоутворення. Тромбоцитарні рецептори та внутрішньоклітинні білки та небілкові сигнальні молекули діють злагоджено з речовинами судинного ендотелію і факторами згортання крові, зумовлюючи прикріплення тромбоцитів до пошкодженої судинної стінки та сприяючи зростанню тромбоцитарної пробки, шляхом залучення та об'єднання нових тромбоцитів. Але межа між фізіологічною підтримкою гемостазу і патологічним тромбозом дуже вузька. Усвідомлення того, що тромбоцити відповідальні за розвиток атеротромботичних захворювань, стрімке зростання смертності від яких займає передове місце у сучасному світі, спонукає дослідників до розгляду їх, як основної мішені впливу антитромботичних агентів. Однак, чисельні клінічні дослідження показали, що застосування сучасних лікарських засобів, для боротьби з цими недугами, часто супроводжується побічними ефектами, такими як резистентність до їх дії, підвищений ризик неконтрольованої кровотечі, а також розвиток серйозних системних ускладнень, що поряд з високою вартістю таких медикаментів нашою є необхідність проведення подальших досліджень щодо пошуку нових більш ефективних та безпечних антитромбоцитарних препаратів. Тому, проведення подальших досліджень, направлених на вивчення функціонування тромбоцитів є дуже важливим на сьогоднішній день. Застосування отриманих результатів наразі є перспективним для розробки нових лікарських препаратів та терапевтичних підходів для перешкоджання небажаного накопичення тромбоцитів і попередження патологічних тромбозів.



Основні тромбоцитарні рецептори та їх сигнальні шляхи, залучені до процесів адгезії, активації та агрегації тромбоцитів

Скорочення: G_q , $G_{12/13}$, $G_{12/13}$ – GTP-зв'язуючі білки, AC – аденілатциклаза, DAG – диацилгліцерол, IP_3 – інозитол-1,4,5-трифосфат, PI-3-K – фосфоінозитол-3-кіназа, PIP_2 – фосфатидилінозитол-4,5-біфосфат, PIP_3 – фосфатидилінозитол-3,4,5-трифосфат, PKC – протеїнкіназа C, PLC β / γ 2 – фосфоліпаза C β / γ 2, Rho – специфічний гуанінуклеотид-обмінний фактор, PAR-1, PAR-4 – рецептори для тромбіну, P_2Y_1 і P_2Y_{12} – рецептори для АДФ, TP – рецептор для тромбосану A_2 , $5-HT_{2A}$ – рецептор для серотоніну, α_2A – адренергічний рецептор для адреналіну, cAMP – циклічний аденозинмонофосфат, ATP – аденозинтрифосфат, LAT – трансмембранний адапторний протеїн, лінкер для активації T-клітин, Lyn, Syk, Src, Fyn – внутрішньоклітинні тирозинпротеїнкінази, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$, $\alpha IIb\beta_3$, $\alpha V\beta_3$ – інтегринові рецептори, GPIb/IX/V – рецептор для фактора фон Віллібранда, GPVI – колагеновий рецептор, Fc γ R – γ -ланцюг Fc-рецептора.

Список використаних джерел

1. Струкова С.М. Современные представления о механизмах свертывания крови // Тромбы, кровоточивость и болезни сосудов. – 2002. – № 1. – С. 44.
2. Lenting P.J., Casari C., Christophe O.D., Denis C.V. // The Journal of Thrombosis and Haemostasis. – 2012. – Vol. 10, № 12. – P. 2428-2437. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jth.12008/pdf>
3. Meyer D. Von Willebrand factor: structure and function / Meyer D., Girma J.P. // The Journal of Thrombosis and Haemostasis. – 1993. – Vol. 70, № 1. – P. 99-104. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0025619612623945>
4. Rivera J. Platelet GP Ib/IX/V complex: physiological role / Rivera J., Lozano M.L., Corral J., et al. // Journal of Physiology and Biochemistry. – 2000. – Vol. 56. – P. 355-365. Available at: <http://link.springer.com/article/10.1007/BF03179804#page-1>
5. Luo S.Z. Glycoprotein Ibalph forms disulfide bonds with 2 glycoproteins Ibbeta subunits in the resting platelets / Luo S.Z., Mo X., Afshar Kharaghan V., et al. // Blood. – 2001. – Vol. 109, № 603. – P. 3-9. Available at: <http://www.bloodjournal.org/content/bloodjournal/109/2/603.full.pdf>
6. Ozaki Y. Platelet GPIb/IX/V dependent signaling / Ozaki Y., Asazuma N., Berndt M.C., et al. // Thromb Haemost. – 2005. – Vol. 3, № 1745. – P. 45-51. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1538-7836.2005.01379.x/full>
7. Du X. Signaling and regulation of the glycoprotein Ib/IX/V complex // Current Opinion in Hematology. – 2007. – Vol. 14. – P. 262-269. Available at: http://journals.lww.com/co-hematology/Abstract/2007/05000/Signaling_and_regulation_of_the_platelet.14.aspx
8. López J.A. Receptors, rafts, and microvesicles in thrombosis and inflammation / López J.A., del Conde I., Shrimpton C.N. // The Journal of Thrombosis and Haemostasis. – 2005. – Vol. 3, № 1737. – P. 44-55. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1538-7836.2005.01463.x/full>
9. Jackson S.P. Signaling event underlying thrombus formation / Jackson S.P., Nesbitt W.S., Kulkarni S. // The Journal of Thrombosis and Haemostasis. – 2003. – Vol. 1. – P. 1602-1612. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1538-7836.2003.00267.x/full>
10. Yamamoto H. Antagonism of vWF inhibits both injury induced arterial and venous thrombosis in the hamster / Yamamoto H., Vreys I., Stassen J.M., et al. // The Journal of Thrombosis and Haemostasis. – 1998 –

Vol. 79, № 202. – P. 210 – 227. Available at: <http://th.schattauer.de/en/contents/archive/issue/909/manuscript/4388.html>

11. Chang M.C. Antithrombotic effect of crotalin, a platelet membrane glycoprotein Ib antagonist from venom of *Crotalus atrox* / Chang M.C., Lin H.K., Peng H.C., Huang T.F. // Blood. – 1998. – Vol. 91, № 1582 – P. 1589-1595. Available at: <http://www.bloodjournal.org/content/91/5/1582.long?ssoc-checked=true>

12. Yeh C.H. Pharmacological characterization and antithrombotic effect of agkistin, a platelet glycoprotein Ib antagonist / Yeh C.H., Chang M.C., Peng H.C., Huang T.F. // British Journal of Pharmacology. – 2001 – Vol. 132, № 843. – P. 843-850. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1572615/>

13. Antithrombotic effect of platelet glycoprotein Ib-blocking monoclonal antibody Fab fragments in nonhuman primates / Cauwenberghs N., Meiring M., Vauterin S., et al. // Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. – 2000. – Vol. 20, № 1347. – P. 1353-1365. Available at: <http://atvb.ahajournals.org/content/20/5/1347.long>

14. Savage B. Influence of fibrillar collagen structure on the mechanisms of platelet thrombus formation under flow / Savage B., Ginsberg M.H., Ruggeri Z.M. // Blood. – 1999. – Vol. 94, № 2704. – P. 2-15. Available at: <http://www.bloodjournal.org/content/94/8/2704.long>

15. Knight C.G. Collagenplatelet interaction: Gly-Pro-Hyp is uniquely specific for platelet GpVI and mediates platelet activation by collagen / Knight C.G., Morton L.F., Onley D.J. et al. // Cardiovascular Research. – 1999. – Vol. 41. – P. 450-457. Available at: <http://cardiovascres.oxfordjournals.org/content/41/2/450>

16. Watson S.P. GPVI and integrin IIb3 signaling in platelets / Watson S.P., Auger J.M., McCarty O.J., et al. // The Journal of Thrombosis and Haemostasis. – 2005. – Vol. 3, № 1752. – P. 62-73. Available at: <http://atvb.ahajournals.org/content/27/2/422.full.pdf>

17. The contribution of glycoprotein VI to stable platelet adhesion and thrombus formation illustrated by targeted gene deletion / Kato K., Kanaji T., Russell S., et al. // Blood. – 2003. – Vol. 102, № 1701. – P. 1-7. Available at: <http://www.bloodjournal.org/content/bloodjournal/102/5/1701.full.pdf?ssoc-checked=true>

18. Poole A. The Fc receptor gammachain and the tyrosine kinase Syk are essential for activation of mouse platelets by collagen / Poole A., Gibbins J.M., Turner M., et al. // The EMBO Journal. – 1997. – Vol. 16, № 2333.

- P. 41-49. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1169834/>
19. The Fab fragment of a novel antiGPVI monoclonal antibody, OM4, reduces in vivo thrombosis without bleeding risk in rats / Li H., Lockyer S., Concepcion A., et al. // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*– 2007. – Vol. 27, № 1199. – P. 205-214. Available at: <http://atvb.ahajournals.org/content/27/5/1199.full.pdf>
20. Nieuwenhuis H.K. Human blood platelets showing no response to collagen fail to express surface glycoprotein Ia / Nieuwenhuis H.K., Akkerman J.W., Houdijk W.P., Sixma J.J. // *Nature*. – 1985. – Vol. 318, № 470. – P. 2-8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2933589>
21. Grüner S. Multiple integrinligand interactions synergize in shear-resistant platelet adhesion at sites of arterial injury in vivo / Grüner S., Prostedra M., Schulte V., et al. // *Blood* – 2003. – Vol. 102, № 4021. – P. 1-7. Available at: <http://www.bloodjournal.org/content/102/12/4021>
22. He L. The contributions of the alpha2 beta1 integrin to vascular thrombosis in vivo / He L., Pappan L.K., Grenache D.G., et al. // *Blood*. – 2003. – Vol. 102. – P. 3652-3657. Available at: <http://www.bloodjournal.org/content/102/10/3652>
23. Kuijpers M.J., Pozgajova M., Cosemans J.M., et al. Role of murine integrin alpha2beta1 in thrombus stabilization and embolization: contribution of thromboxane // *The Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2007. – Vol. 98, № 1072. – P. 80. Available at: http://www.researchgate.net/profile/Judith_Cosemans/publication/5845620_Role_of_murine_integrin_alpha2beta1_in_thrombus_stabilization_and_embolization_contribution_of_thromboxane_A2/links/02e7e5228df3a2cd19000000.pdf
24. Cosemans J.M. Multiple ways to switch platelet integrins on and off / Cosemans J.M., Iserbyt B.F., Deckmyn H., Heemskerk J.W. // *The Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2008. – Vol. 6, № 1253. – P. 9-16. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1111/j.1538-7836.2008.03041.x/asset/j.1538-7836.2008.03041.x.pdf?v=1&t=iaief61ce&s=bae7ddb11592513c86bb26f678d68459f7135d08>
25. Arthur J.F. Platelet glycoprotein VI related clinical defects / Arthur J.F., Dunkley S., Andrews R.K. // *The Journal of Haematology*. – 2007. – Vol. 139. – P. 363-372. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1111/j.1365-2141.2007.06799.x/asset/j.1365-2141.2007.06799.x.pdf?v=1&t=iaief61ce&s=b752ed100b8d0249e819c7c81f72f76dc87ed47b>
26. Future innovations in antiplatelet therapies / Barret N.E., Jones L., Kaiser W.J., et al. // *British Journal of Haematology*. – 2008. – Vol. 154, № 918. – P. 39-47. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2451055/>
27. George J.N. Platelets // *Lancet*. – 2000. – Vol. 355. – P. 1531-1539. Available at: [http://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(00\)02175-9/abstract](http://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(00)02175-9/abstract)
28. Jirouskova A. A guide to murine platelet structure, function, assays, and genetic alterations / Jirouskova M., Sheet A.S., Johnson G.J. // *The Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2007. – Vol. 5. – P. 661-669. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1111/j.1538-7836.2007.02407.x/asset/j.1538-7836.2007.02407.x.pdf?v=1&t=iaief61ce&s=dff460e5324f0d4c31253047936daf4633ac52e>
29. Future innovations in antiplatelet therapies / Barret N.E., Jones L., Kaiser W.J., et al. // *British Journal of Pharmacology*. – 2008. – Vol. 154. – P. 918-939. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2451055/>
30. Gachet C. P2 receptors, platelet function and pharmacological implications // *The Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2008. – Vol. 9 – P. 466-472. Available at: <http://th.schattauer.de/en/contents/archive/issue/special/manuscript/9466/download.html>
31. Nakahata N. Thromboxane A2: physiology/pathophysiology, cellular signal transduction and pharmacology // *Pharmacology & Therapeutics*. – 2008. – Vol. 118 – P. 18-35. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0163725808000120?via%3Dihub>
32. Niccoli G. Plasma levels of thromboxane A2 on admission are associated with no-reflow after primary percutaneous coronary intervention / Niccoli G., Giubilato S., Russo E., et al. // *European Heart Journal*. – 2008. – Vol. 29. – P. 1843-1859. Available at: <http://circ.ahajournals.org/content/120/1/e4.full.pdf>
33. Dai Y. Clinical use of aspirin in treatment and prevention of cardiovascular disease / Dai Y., Ge J. // *Thrombosis*. – 2012. – Vol. 24, № 3. – P. 245-267. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3236445/>
34. Hennekens C.H. Update on aspirin in the treatment and prevention of cardiovascular disease // *The American Journal of Managed Care*. – 2002. – Vol. 8, № 22. – P. 691-700. Available at: <http://www.ajmc.com/journals/supplement/2002/2002-12-vol8-n22Suppl/Dec02-90pS691/>
35. Schrör K. Aspirin and platelets: the antiplatelet action of aspirin and its role in thrombosis treatment and prophylaxis // *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. – 1997. – Vol. 23, № 4. – P. 349-356. Available at: <https://www.thieme-connect.com/DOI/DOI?10.1055/s-2007-996108>
36. Weir M.R. Selective COX-2 inhibition and cardiovascular effects: a review of the rofecoxib development program / Weir M.R., Sperling R.S., Reicin A., Gertz B.J. // *American Heart Journal*. – 2003. Vol. 146, № 4. – P. 591-604. Available at: [http://www.ahajonline.com/article/S0002-8703\(03\)00398-3/pdf](http://www.ahajonline.com/article/S0002-8703(03)00398-3/pdf)
37. Meadows T.A. Clinical aspects of platelet inhibitors and thrombus formation / Meadows T.A., Bhatt D.L. // *Circulation Research*. – 2007. – Vol. 100. – P. 1261-1320. Available at: <http://circres.ahajournals.org/content/100/9/1261.full.pdf>
38. Huang J.S. Cell signaling through thromboxane A2 receptors / Huang J.S., Ramamurthy S.K., Lin X., Le Breton G.C. // *Cellular Signalling*. – 2004. – Vol. 16. – P. 521-533. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0898656803002201?via%3Dihub>
39. Brass L. Understanding and evaluating platelet function // *American Society of Hematology. The Education Program of the American Society of Hematology* 2010. – 2010. – P. 387-396. Available at: <http://asheducationbook.hematologylibrary.org/content/2010/1/387.long>
40. Woulfe D., Yang J., Prevost N., et al. Signaling receptors on platelets and megakaryocytes // *Methods in Molecular Biology*. – 2004. – Vol. 273, № 3. – P. 2-31. Available at: <http://link.springer.com/protocol/10.1385/1-59259-783-1:003#page-1>
41. Lane D.A. The central role of thrombin in hemostasis // *The Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2007. – Vol. 5. – P. 95-101. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1538-7836.2007.02500.x/pdf>
42. Bonello L. Consensus and future directions on the definition of high on-treatment platelet reactivity to adenosine diphosphate / Bonello L., Tantry U.S., Marcucci R. // *Journal of the American College of Cardiology*. – 2010. – Vol. 56. – P. 919-933. Available at: http://ac.els-cdn.com/S0735109710024733/1-s2.0-S0735109710024733-main.pdf?_tid=8ef68c3e-0abe-11e5-9a11-00000a0f02&acdnat=1433425105_69f1539b7a01bfff04965fa9e5a611
43. Coughlin S.R. Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology // *The Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2005. – Vol. 3 – P. 1800-1814. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1538-7836.2005.01377.x/pdf>
44. Mazzucato M. Characterization of the initial alphathrombin interaction with glycoprotein Ib alpha in relation to platelet activation / Mazzucato M., Marco L.D., Masotti A., et al. // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1998. – Vol. 273 – P. 1880-1887. Available at: <http://www.jbc.org/content/273/4/1880.long>
45. Adam F. Glycoprotein Ib mediated platelet activation. A signaling pathway triggered by thrombin / Adam F., Guillin M.C., Jandrot-Perrus M. // *Biochemistry*. – 2003. – Vol. 270 – P. 2959-2970. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1432-1033.2003.03670.x/pdf>
46. Covic L. Biphasic kinetics of activation and signaling for PAR1 and PAR4 thrombin receptors in platelets / Covic L., Gresser A.L., Kuliopulos A. // *Biochemistry*. – 2000. – Vol. 39. – P. 5458-5467. Available at: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi9927078>
47. Leslie M. Cell biology. Beyond clotting: the powers of platelets // *Science*. – 2010. – Vol. 328. – P. 562-564. Available at: <http://www.sciencemag.org/content/328/5978/562.full>
48. Discovery of a novel orally active himbacin-based thrombin receptor antagonist (SCH 530348) with potent antiplatelet activity / Chackalamani S., Wang Y., Greenlee W.J., et al. // *Journal of Medical Chemistry*. – 2008. – Vol. 51. – P. 3061-3064. Available at: <http://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/jm800180e>
49. Loss of signaling through the G protein, Gz, results in abnormal platelet activation and altered responses to psychoactive drugs / Yang J., Wu J., Kowalska M.A., et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. – 2000. – Vol. 97. – P. 9984-9989. Available at: <http://www.pnas.org/content/97/18/9984.full>
50. Kaywin P. Platelet function in essential thrombocythemia. Decreased epinephrine responsiveness associated with a deficiency of platelet adrenergic receptors / Kaywin P., McDonough M., Insel P.A., Shattil S.J. // *Medicine*. – 1978. – Vol. 299. – P. 505-509. Available at: <http://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJM197809072991002>
51. Cosemans J. Continuous signaling via PI3K isoforms β and γ is required for platelet ADP receptor function in dynamic thrombus stabilization / Cosemans J., Munnix I., Wetzker R. // *The Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2006. – Vol. 108. – P. 3045-3052. Available at: <http://www.bloodjournal.org/content/108/9/3045.full.pdf>
52. Varga-Szabo D. Calcium signaling in platelets / Varga-Szabo D., Braun Nieswandt A. // *The Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2009. – Vol. 7. – P. 1057-1066. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1538-7836.2009.03455.x/full>
53. Comparison of platelet function tests in predicting clinical outcome in patients undergoing coronary stent implantation van / Breet N.J., Werkum J.W., Bouman H.J. et al. // *Journal of the American Medical Association*. – 2010. – Vol. 303. – P. 754-762. Available at: <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?articleid=185434>
54. Brass L.F. Novel therapeutic targets at the platelet vascular interface / Brass L.F., Zhu L., Stalker T.J. // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. – 2008. – Vol. 28. – P. 43-50. Available at: <http://atvb.ahajournals.org/content/28/3/s43.full.pdf+html>
55. Platelet CD40 ligand (CD40L) subcellular localization, regulation of expression, and inhibition by clopidogrel / Hermann A., Rauch B.H., Braun M., Schrör K., Weber A.A. // *Platelets*. – 2001. – Vol. 12. – P. 74-82. Available at: <http://informahealthcare.com/doi/pdf/10.1080/09537100020031207>
56. Prevost N. Eph kinases and ephrins support thrombus growth and stability by regulating integrin outside-in signaling in platelets / Prevost N., Woulfe D.S., Jiang H., et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. – 2005. – Vol. 102. – P. 9820-9825. Available at: <http://www.pnas.org/content/102/28/9820.full>
57. Regulated surface expression and shedding support a dual role for semaphorin 4D in platelet responses to vascular injury / Zhu L., Bergmeier W., Wu J., et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. – 2007. – Vol. 104. – P. 1621-1626. Available at: <http://www.pnas.org/content/104/5/1621.full>

58. Falati S. Accumulation of tissue factor into developing thrombi in vivo is dependent upon microparticle P-selectin glycoprotein ligand 1 and platelet P-selectin / Falati S., Liu Q., Gross P., et al. // The Journal of Experimental Medicine. – 2003. – Vol. 197. – P. 1585-1598. Available at: <http://jem.rupress.org/content/197/11/1585.full.pdf+html>

59. Herrera-Galeano J.E. A novel variant in the platelet endothelial aggregation receptor-1 gene is associated with increased platelet aggregability / Herrera-Galeano J.E., Becker D.M., Wilson A.F., et al. // Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. – 2008. – Vol. 28. – P. 1484-1490. Available at: <http://atvb.ahajournals.org/content/28/8/1484.full.pdf+html>

Надійшла до редколегії 03.12.15

И. Николаева, студ., Т. Галенова, канд. биол. наук, А.Савчук, д-р биол. наук
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О РОЛИ ТРОМБОЦИТАРНЫХ РЕЦЕПТОРОВ В ПРОЦЕССЕ ФОРМИРОВАНИЯ ТРОМБА

Исследование молекулярно-биологических аспектов функционирования тромбоцитов, с использованием биохимических методов, новейших технологий клеточной и молекулярной биологии, стали основой для понимания сигнальных каскадов регулирующих активацию, адгезию и агрегацию этих клеток. В данном обзоре обобщены современные представления о роли мембранных рецепторов тромбоцитов в процессах физиологического и патологического формирования тромба, проанализирована возможная роль тромбоцитарных рецепторов в качестве мишени действия антиагрегационных агентов, определены новые перспективные направления поиска эффективных и специфических антитромботических препаратов.

Ключевые слова: тромбоциты, мембранные рецепторы, процесс тромбообразования, агрегация.

I. Nikolaeva, stud., T. Halenova, PhD, O. Savchuk, DSc.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

MODERN CONCEPTIONS OF THE ROLE OF PLATELET RECEPTORS IN THE DYNAMICS OF THROMBUS FORMATION

The study of molecular and biological aspects of the platelets functioning with the use of biochemical methods, new technologies of cell and molecular biology became the basis for understanding signaling cascades regulating the activation, adhesion and aggregation of these cells. In this review, the general modern information of the role of platelet membrane receptors in physiological and pathological processes of thrombus formation was performed. The possible role of platelet receptors as target of antiaggregatory agents was analyzed. Also, new promising areas of searching for effective and specific antithrombotic agents were identified.

Key words: platelets, membrane receptors, the process of thrombosis, aggregation.

УДК 577.122.8

О. Харченко, канд. биол. наук, О. Савчук, д-р биол. наук, Л. Остапченко, д-р биол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

АНАЛІЗ ЗМІН БІЛКОВОГО ПРОФІЛЮ ПРИ ХРОНІЧНІЙ АЛКОГОЛЬНОЇ ІНТОКСИКАЦІЇ ДЛЯ ДІАГНОСТУВАННЯ РОЗВИТКУ ДАНОГО ПАТОЛОГІЧНОГО СТАНУ ОРГАНІЗМУ

В огляді проаналізовано існуючі на сьогодні біомаркери, які дозволяють виявити хронічне зловживання алкоголем, а саме: вуглевод-дефіцитний трансферин, активності ГГТ, АлАТ, АсАТ, β-ГКА; індекс сіалова кислота – Апо J, рівень циркулюючих цитокінів (TNF-α, IL-1 і IL-6), α-1- та α-2-глобулінів, сироваткового амілоїду A4, фібронектину та ін. На сьогодні результати дослідження протеому в організмі осіб, що зловживають алкоголем, містять значну кількість артефактів у зв'язку з подвійним зловживанням іншими речовинами (наприклад, кокаїном, тютюном), специфічним дефіцитом харчування, наявністю дисфункції органів. Підсумовуючи проведений аналіз наукової літератури можна засвідчити недостатню кількість досліджень, які стосуються змін протеому на різних етапах розвитку алкогольної інтоксикації. Важливим завданням є виявлення біомаркерів, які б дозволили вимірювати рівень споживання алкоголю шляхом виявлення пошкодження тканин або інших фізіологічних реакцій на зловживання алкоголем протягом тривалого часу. Стратегії пошуку біомаркерів алкоголізму повинні включати ідентифікацію білків, кількість яких відрізняється у алкоголіків і не-алкоголіків. Розшифровка індивідуального протеому, ймовірно, буде частиною розвитку персоналізованої медицини майбутнього.

Ключові слова: алкогольна інтоксикація, протеом.

Етанол належить до переліку небагатьох нутрієнтів, які володіють значною токсичною дією. Відомим фактом є те, що прогнози стосовно клінічного перебігу і кінцевого результату алкогольної хвороби печінки є досить невтішними. Дійсно, в проспективному дослідженні 280 пацієнтів з алкогольним ураженням печінки, було виявлено, що протягом 48 місяців спостереження, більше половини з тих, у кого діагностували цироз печінки, і дві третини тих, у кого був цироз з алкогольним гепатитом, померли. Подібний рівень смертності є більшим, ніж за умов багатьох видів онкозахворювань, але, на жаль, викликає набагато менше занепокоєння, як серед громадськості, так і медичних працівників [1]. Така позиція може відображати, щонайменше частково, спільну думку щодо неспроможності глобального вирішення цієї проблеми. Але, треба визнати, що подолання алкогольної залежності та її наслідків, так як і ранньої її діагностики для більш оптимістичних прогнозів лікування, є одним з найважливіших питань охорони здоров'я.

Хоча гостре споживання алкоголю може бути легко виявлене за допомогою вимірювання вмісту етанолу в

крові і у видихуваному повітрі, цей вимір не дає ніяких уявлень стосовно паттернів хронічного вживання алкоголю, які безпосередньо пов'язані з діагнозом алкогольної залежності [2, 3]. Крім того, кількісні біомаркери, які б дозволили однозначно оцінити споживання алкоголю в ретроспективі через кілька днів або тижнів залишаються загалом невловними [3, 4]. В даний час, використовувані в клініці біомаркери, які дозволяють виявити хронічне зловживання алкоголем, включають як небілкові – середній корпускулярний об'єм еритроцита, етиловий глюкуронід, 5-гідрокситриптофол, так і білкові – вуглевод-дефіцитний трансферин, γ-глутаміл трансферази. Жоден з цих маркерів не забезпечує точної діагностики хронічної алкогольної інтоксикації, оскільки вони мають малу специфічність і можуть змінюватися при хворобах неалкогольного походження [2]. Враховуючи ці недоліки існує гостра потреба в розробці більш чутливих і специфічних маркерів зловживання алкоголем. Останні досягнення в галузях геноміки, протеоміки та метаболоміки значно розширюють можливості для їх відкриття.

Варто зазначити, що термін "біомаркер" найчастіше використовується для опису статистично значущих біохімічних або молекулярних змін між двома популяціями (в нашому випадку – це населення з різним відношенням до споживання алкогольних напоїв) [3]. В той же час Національний інститут здоров'я США визначає біомаркер, як об'єктивно вимірювану і оцінювану ознаку, що може слугувати індикатором нормальних біологічних процесів, патогенних процесів або фармакологічної відповіді на терапевтичне втручання [5]. Різниця між цими двома визначеннями полягає в тому, що в першому випадку акцент робиться на оцінку відмінностей між двома популяціями, у той час як в другому чітко детермінується, що біомаркери повинні бути інформативними стосовно окремих суб'єктів, дозволяючи їх впевнено класифікувати [3]. Таким чином, в контексті зловживання алкоголем, біомаркер повинен бути точним індикатором споживання алкоголю індивіда за певний період часу. Важливо відзначити, що біомаркер характеризує конкретний стан та не повинен мати причинного або механістичного значення [6, 7].

Біомаркери алкоголізму мають важливе значення, як для медицини, так і для громадської безпеки [8]. В клініці вони не тільки забезпечують об'єктивні параметри споживання алкоголю, щоб допомогти діагностувати алкоголізм, але також можуть бути використані для відстеження протікання захворювань, пов'язаних із зловживанням етанолу. Все частіше біомаркери алкоголізму використовуються в якості об'єктивних показників продуктивності лікування даного захворювання; точні біомаркери можуть бути використані для перевірки самозвітів пацієнтів або навіть повністю їх замінити [9]. Стосовно громадської безпеки, біомаркери хронічного алкоголізму можуть бути корисними для спостереження за певними особами з групи ризику в абстинентний період (наприклад, вагітні жінки) [10], або раніше засудженими за вчинення злочину, або особами, професії яких впливають на здоров'я та безпеку широкої громадськості (наприклад, медичні працівники, працівники повітряного транспорту) [9].

Молекулярні зміни в рівнях експресії генів внаслідок впливу алкоголю були зареєстровані в багатьох дослідженнях [11]. Але обмежуючий фактор для цих досліджень полягає в тому, що гени і кодовані ними білки не обов'язково експресуються паралельно. Було показано, що введення етанолу може призводити до змін на рівні трансляції білка, не впливаючи при цьому на відповідні рівні мРНК [12]. Так само і коливання рівнів мРНК не завжди відображають зміни у експресії білків [13–15]. МікроРНК були використані в якості інструментів для порівняння кількості мРНК і трансляційних рівнів. Показано, що деградація мРНК складає близько 75% від спостережуваних змін у синтезі білка [16] і мікроРНК викликають зниження рівнів мРНК, яке може пояснювати основну частину скорочення (84%) продукції білка [17]. Досягнення мас-спектрометрії та біоінформатики були використані для оцінки абсолютного числа копій клітинних білків та турноверу і рівнів експресії мРНК і білків. В результаті було виявлено, що зміни у рівнях мРНК складають тільки близько 40% від змін у рівнях білка [18]. Враховуючи, що контроль за кількістю білка відбувається переважно на рівні трансляції, стає зрозумілою цінність протеомних методів для діагностики алкогольної залежності.

Однією з особливостей етанолу є здатність викликати зміни в метаболізмі білків як тканиноспецифічні, так і на рівні цілісного організму [19]. Вплив етанолу може реалізуватися на різних етапах білкового обміну, зокрема, на рівні їх синтезу, секреції та протеолітичного

розщеплення. Хронічне зловживання алкоголем викликає збільшення екскреції азоту із супутньою втратою м'язової маси. Навіть гостре отруєння етанолом веде до зростання виділення азоту. Втрата білка скелетними м'язами (тобто, хронічна алкогольна міопатія) є однією з багатьох несприятливих реакцій на алкоголь і спостерігається у двох третин осіб, що зловживають алкоголем. Показано цілий ряд інших захворювань і тканинних порушень, які виникають внаслідок індукованих етанолом змін кількості окремих білків або цілих груп тканинних білків. Наприклад, зростання вмісту колагену печінки при цирозі, зниження вмісту міозину при кардіоміопатії, а також втрата колагену кісток при остеопорозі [19–22]. Етанол викликає зміни в метаболізмі білків, ймовірно, у всіх органах або тканинах. На сьогоднішній день доведено, що за дії етанолу відбувається порушення ключових шляхів внутрішньоклітинного транспорту білкових молекул, це, зокрема, клатрин-опосередкований ендоцитоз та транспортування новосинтезованих секреторних білків чи мембранних глікопротеїдів від апарату Гольджі, де може локалізуватися до 50% всіх акумульованих секреторних білків, до базолатеральної мембрани [23].

Клінічні дослідження у пацієнтів з алкогольною залежністю без явних симптомів захворювання печінки виявили у них знижений рівень синтезу білка скелетними м'язами, хоча обмін білка на рівні усього організму, схоже, не був суттєво порушений [24].

Печінка, як основний орган детоксикації хімічних сполук, однією з перших зазнає пошкоджуючої дії етанолу та його похідних. Саме тут активні протікають процеси синтезу та розпаду білків, які мають важливе значення для забезпечення потреб організму. Вважають, що виражене зниження білково-синтетичної функції печінки у наркологічних хворих може бути обумовлено наступними обставинами: порушенням ферментних систем печінки при її ураженні алкоголем, що призводить до пригнічення синтезу альбумінів; зменшення надходження амінокислот з їжею, що часто має місце у хворих, що страждають синдромом алкогольної залежності, зниженням всмоктувальної функції кишечника, що спостерігається в умовах дисбіозу [25].

На сьогодні досить точним маркером, при зловживанні етанолом вважають вуглевод-дефіцитний трансферин, оскільки він, в основному, не змінюється при інших захворюваннях (наприклад, неалкогольних хворобах печінки), на даний показник не впливають лікарські препарати – зокрема, антидепресанти або дисульфірам (препарат, який використовується для лікування алкоголізму). Оцінка рівня вуглевод-дефіцитного трансферину достовірно виявляє тривале вживання великих доз алкоголю (більше 60 г/день протягом 2 тижнів) [26]. Вміст вуглевод-дефіцитного трансферину визначають електрофоретично, хроматографічно, імунологічно, а також останнім часом методом мас-спектрометрії [27–30]. Чутливість та специфічність даного біомаркера приблизно 60–70 і 80–95% відповідно [31]. Наявність змін вмісту вуглевод-дефіцитного трансферину в сироватці крові можуть залежати і від інших умов, не пов'язаних із вживанням алкоголю, таких як нервова анорексія [32] і вагітність [33]. Крім того, вміст вуглевод-дефіцитного трансферину змінюється за дефіциту заліза, хронічних захворювань і в менопаузі. Помилково-негативні результати пов'язані з жіночою статтю, епізодичним невисоким вживанням алкоголю і гострою травмою зі втратою крові [34]. Крім того, виявлено, що рівень вуглевод-дефіцитного трансферину в деяких осіб залишається високим, навіть через шість тижнів після припинення вживання алкоголю [35]. Не-

зважаючи на ці обмеження, вуглевод-дефіцитний трансферин в даний час вважається найбільш корисним маркером зловживання алкоголем, і тільки він один схвалений FDA США для виявлення надмірного споживання алкоголю [36].

Для діагностики хронічної алкогольної інтоксикації використовують також визначення активності γ -глутамілтрансспептидази (ГГТ). Даний фермент є мембранозв'язаним глікопротеїном та каталізує перенесення амінокислот через клітинну мембрану, регулює руйнування і кон'югацію глутатіону, і навіть, метаболізм ейкозаноїдів. Активність ферменту підвищується на 70% при вживанні токсичних доз алкоголю протягом 6-15 днів і може зберігатися до 7-20 діб після припинення його споживання. Але недоліком даного біомаркери, в першу чергу, є низька специфічність. Висока активність ГГТ може відзначатись при холестази неалкогольного походження, а також певною мірою зростати при цукровому діабеті, нирковій та серцевій недостатності. Чутливість біомаркери складає тільки 50% [37].

Аланінамінотрансферази (АлАТ) і аспартатамінотрансфераза (АсАТ) є ензимами, які перетворюють α -кетокислоти в амінокислоти [27]. АсАТ головним чином міститься в печінці; АлАТ також знаходиться переважно в печінці, але інші тканини містять також його велику кількість. Подібно до ГГТ, підвищення рівня активності цих ферментів є індикатором генералізованого пошкодження печінки [31,38]. Очікувано чутливість обох цих ферментів в контексті зловживання алкоголем є низькою і сильно варіює [19]. Проте, подібно до ГГТ, визначення активності АлАТ і АсАТ є поширеною практикою завдяки простоті та низькій вартості [38].

Досить давно достатньо чутливим біомаркером хронічного споживання алкоголю вважають зміни активності β -гексозамінідази (β -ГКА) в сироватці крові і сечі [39, 40]. β -ГКА є лізосомальною гідролазою, що бере участь у метаболізмі вуглеводів і гангліозидів в печінці. Після надмірного вживання алкоголю, лізосоми пошкоджуються і вивільняють даний фермент у кров'яне русло [41]. Період напіврозпаду β -ГКА в сироватці становить приблизно 6,5 днів [27]. Повідомляється, що чутливість визначення активності β -ГКА в сироватці крові та сечі складає відповідно 69-94 і 81-85%, в той час як специфічність – відповідно 91-98 і 84-96% [27]. Підвищений рівень активності β -ГКА фіксують також у пацієнтів з артеріальною гіпертензією, цукровим діабетом, цирозом печінки, інфарктом міокарда, при вагітності і після застосування оральних контрацептивів [39, 42].

Добре відомим фактом є те, що основний продукт окислювального метаболізму етанолу – ацетальдегід в організмі вступає в реакції з різноманітними білками, формуючи відповідні аддукти [43]. Деякі з цих аддуктів виявляються через 3 тижні після вживання алкоголю. Останнім часом були розроблені мас-спектрометричні методи спрямовані на їхню детекцію, як біологічних маркерів зловживання спиртними напоями [44]. Крім того, є повідомлення, що в якості біомаркерів хронічного вживання алкоголю можуть визначатись циркулюючі антитіла до білкових аддуктів ацетальдегіду. Чутливість та специфічність даного методу – 65-73 і 88-94% відповідно [45].

Варто згадати про аполіпопротеїн J або кластерин (Апо J) – дисульфідно-зв'язаний гетеродимерний білок, залучений до обміну ліпідів між різними ліпопротеїнами [41]. Хронічний вплив етанолу зменшує сіалювання плазми Апо J [46]. Індекс сіалова кислота – Апо J відображає співвідношення молей сіалової кислоти на моль Апо J білка. Кількість сіалових кислот на кількість Апо J визначається імуноафінним очищенням Апо J з подальшим гідролізом залишків сіалової кислоти і спектро-

фотометричним визначенням її кількості. Кількість Апо J визначають за допомогою стандартних біохімічних аналізів, а потім обчислюють вищезгаданий індекс [27, 41, 46]. Індекс сіалова кислота – Апо J знижується за умов хронічного споживання алкоголю, повертаючись до нормального рівня протягом 8 тижнів, приблизний період напіврозпаду складає 4-5 тижнів [46]. Велика кількість залишків сіалової кислоти на Апо J (28 моль сіалової кислоти / 1 моль Апо J) може дозволити з більшою чутливістю свідчити про рівень споживання алкоголю порівняно з вуглевод-дефіцитним трансферином [41]. Крім того, індекс сіалова кислота – Апо J виявив дуже високу чутливість та специфічність в експериментальних дослідженнях (90-92% і майже 100%, відповідно) [46], але остаточне рішення стосовно корисності даного біомаркери ще не прийняте.

Цитокіни являють собою білки, залучені до міжклітинної комунікації та активації. Вони регулюють процеси, такі як запалення, загибель клітин, їх проліферація, міграція і репарація. Встановлено, що рівень циркулюючих цитокінів, таких як TNF- α , IL-1 і IL-6 зростає за хронічного та гострого алкогольного захворювання печінки [47]. Рівень TNF- α в середньому у алкоголіків вище, ніж серед населення в цілому, незалежно від рівня споживання алкоголю [48]. Значне зростання продукції IL-1 β , IL-6, IL-12 та TNF- α також спостерігається у хронічних алкоголіків без хвороби печінки та поза періодами активного споживання етанолу. Цікаво, що аномально низькі рівні цитокінів були виявлені у пацієнтів з алкогольним цирозом печінки в стадії активного запоя, але в період абстиненції у них не спостерігалось істотних змін даного показника [49]. Оцінка рівня TNF- α в сироватці крові, яка останнім часом стала рутинною процедурою в клінічній практиці [47], можливо може бути корисною для діагностики зловживання алкоголем. З іншого боку, враховуючи широке залучення цитокінів до різноманітних біологічних процесів, використання їх, як автономних маркерів алкоголізму видається малоймовірним.

У осіб, що зловживають спиртними напоями, виявляють значуще збільшення рівня інтерлейкіну-6, який ініціює синтез С-реактивного білка (СРБ), що запускає, у свою чергу, запальну реакцію в організмі, маркерами якої є білки гострої фази – СРБ, гаптоглобін [31]. Ацетальдегід викликає некротично-запальні зміни, стимулюючи синтез прозапальних цитокінів. Саме каскад цитокінових реакцій запускає синтез гострофазових білків в організмі [50].

Електрофорез фракцій білка в динаміці купіювання гострого алкогольного психозу виявив підвищення α -1- та α -2-глобулінів, що може свідчити про наявність запальних явищ в організмі хворих. Зокрема, фракція α -глобулінів утворена глікопротеїнами (гаптоглобін, церулоплазмін, α -1-антитрипсин, орозоумукоїд та ін.), рівень яких підвищується при гострих запальних, некротичних, алергічних і стресових станах [51].

Враховуючи сучасний розвиток методів системної біології, в тому числі геноміки, метаболоміки та протеоміки, наразі можливо краще розібратися в механізмах пошкодження клітин та ідентифікувати білкові мішені токсичної дії алкоголю [52]. Хоча вивчення експресії генів надає цінну інформацію стосовно регуляції транскрипції, може спостерігатись значне розходження між змінами в експресії РНК і білка, оскільки не всі гени, що експресуються надалі транслуються в білкові продукти [53]. Однією з цілей протеоміки якраз і є виявлення біомаркерів захворювань [53]. Двовимірний електрофорез або 2D електрофорез в поєднанні з мас-спектрометрією, широко застосовується для аналізу експресії білків і їх посттрансляційної модифікації [54].

Примітно, що протеомна техніка – 2D електрофорез був використаний більше 25-ти років тому, щоб показати саме зміни у сироватці крові людей, які страждають на алкоголізм. Зокрема у них було виявлене зростання рівня протеїнів, таких як α_1 -кислий глікопротеїн, IgA, α_1 -антихімотрипсин, гаптоглобін і Apo A-I ліпопротеїн, та зниження рівня антитромбіну III [55]. Десять років по тому та ж сама техніка була використана для пошуку біомаркерів фетального алкогольного синдрому: вісім білків було визначено, як кандидати біомаркерів, серед них знову ж таки α_1 -антитрипсин і гаптоглобін [56].

Перше застосування методів протеоміки (2D електрофорез) для посмертного дослідження мозку 4-х осіб, що страждали на алкоголізм у порівнянні з 4-ма здоровими суб'єктами показало, що у верхній лобній корі диференційно експресуються близько 180 білків. Причому, у алкоголіків переважно виявлялась понижуюча регуляція їхньої експресії (139 – інгібування проти 35 – активація) [57].

Також методами протеоміки було вивчено вплив зловживання алкоголем на дорсолатеральний префронтальний кортекс, який включає в себе поле Бродмана 9, з білою (wBA 9) і сірою речовинами (gBA9) [58, 59]. Дорсолатеральний префронтальний кортекс сполучений з багатьма ділянками мозку, залученими до когнітивних функцій за допомогою реципрокних взаємовідносин і є суб'єктом значного зменшення у алкоголіків, особливо це стосується білої речовини. Зразки були отримані автопсією у алкоголіків з цирозом та без, а також у осіб, що не зловживали алкоголем та проаналізовані з використанням 2D-електрофорезу в поєднанні з MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time-of-flight/Time-of-flight) мас-спектральним аналізом. В регіонах wBA9 і gBA9 мозку обох груп алкоголіків була виявлена диференційна експресія транскетолази і β -субодиниці піруватдегідрогенази E1, що дозволило авторам дослідження припустити зміни у тіамін-залежному каскаді. Крім того, були диференційно регульовані рівні багатьох пов'язаних з метаболізмом ферментів, зокрема, відповідальних за енергетичну трансдукцію (гліколіз, цикл Кребса), а це свідчить про дефіцит енергії, втрату життєздатності та загибель клітин в дорсолатеральному префронтальному кортексі алкоголіків.

Такими ж методами було проаналізовано хробака мозочка у алкоголіків з цирозом та без даного ускладнення [60]. Хробак мозочка отримує соматичну сенсорну інформацію і відповідає за позу тіла та локомоцію. Завдяки своїм зв'язкам з префронтальним кортексом, мозочок побічно залучений до когнітивних функцій, а у алкоголіків хробак мозочка є чутливим до загального зменшення або атрофії, яка супроводжується втратою клітин Пуркінє і зменшенням кількості дендритних розгалужень. Як це було показано і для дорсолатерального префронтального кортексу, транскетолази і β -субодиниця піруватдегідрогенази E1 також диференційно регулювались в обох групах алкоголіків, що свідчить про залучення змін ферментів від яких залежить метаболізм вітаміну B1 та енергії обміну речовин до ушкодження хробака мозочка у алкоголіків. Крім того, протеомний аналіз засвідчив унікальні зміни в хробакі мозочка у алкоголіків хворих на цироз, що дозволяє припустити специфічні ефекти на експресію білків в даному відділі мозку в результаті дисфункції печінки [60].

Супутнє посмертне дослідження тієї ж групи хворих було зосереджене на протеомному аналізі гіпокампу, який має вирішальну роль в когнітивному процесі, пам'яті і просторовій навігації [61]. Проби від неускладнених цирозом алкоголіків були порівняні з пробими від непитуєх суб'єктів. Показано, що у алкоголіків була

знижена експресія 18 з 20 ідентифікованих білків. Незважаючи на те, що деякі з них були виявлені і в інших областях мозку, протеомний аналіз гіпокампу показав унікальні, значні зміни в рівні експресії глутамінсінтетази, що переважно розташована в астроцитах здатних до детоксикації продуктів метаболізму, таких як аміак [61].

Протеомними методами було детально досліджено різні частини мозолистого тіла (задня, передня частини і стовбур) у алкоголіків з цирозом та без [62-63]. Мозолисте тіло з'єднує ліву і праву півкулі головного мозку, має найбільше білої речовини та регулює різні когнітивні функції. В результаті надмірного споживання алкоголю цей відділ головного мозку суттєво зменшується в об'ємі, що веде до когнітивної дисфункції. Порівняльний аналіз субрегіонів мозолистого тіла виявив індуковані хронічним споживанням етанолу зміни різних біохімічних шляхів, залежні від топографії та груп алкоголіків викликані алкоголем зміни. Декілька білків, залучених до різних метаболічних шляхів, таких як перекисне окислення ліпідів, окислювальний стрес та апоптоз продемонстрували здатність до специфічної диференційної експресії і в стовбурі мозолистого тіла. Ферменти біосинтезу тіаміну/енергії диференційно експресувались в задній частині мозолистого тіла, в той час як глутаматкарбоксипептидаза була ідентифікована, як в передній, так і в задній його частинах, але тільки при алкоголізмі ускладненому цирозом [62-63].

В двох протеомних дослідженнях людського мозку, що зазнавав хронічної алкогольної інтоксикації, проаналізували синапсомальні препарати з верхньої лобової звивини. Цей район є частиною дорсолатерального префронтального кортексу, який контролює виконавчі функції. Ця область мозку надзвичайно страждає від хронічного впливу алкоголю і є чутливою до алкоголь-індукованої втрати нейронів. У спробі розгадати механізм, що лежить в основі синаптичних розладів при алкоголізмі Etheridge зі співавт. [64] порівняли зміни у верхній лобовій звивині з такими в потиличній корі (область мозку, яка не схильна до втрати сірої речовини при алкоголізмі і не зазнає очевидних функціональних змін). Були порівняні синапсоми від хронічних алкоголіків та контрольної групи людей без алкоголь-залежності. Результати показали зміни у синаптичному протеомі алкоголіків, як у верхній лобовій звивині, так і у потиличній корі, порівняно з контролем. Це дослідження підтвердило зв'язок ряду білків з алкоголізмом (як це передбачали раніше), а також виявило зв'язок з даним захворюванням для нових білків. Несподівано, зміни більшості білків були виявлені в потиличній корі, а не верхній лобовій звивині. Ідентифіковані протеїни беруть участь в везикулярному транспорті, обміні речовин, фолдингу і транспорті, і трансдукції сигналу. Автори вважають, що алкоголь-індуковані зміни білків везикулярного транспорту та цитоскелету можуть бути пов'язані з порушенням синаптичних шляхів передачі та призводити до нейродегенеративних ефектів загальних порушень когнітивної функції [64].

У своєму наступному дослідженні дослідницька група Etheridge [65] використали ті ж методи для аналізу синапсом з верхньої лобової звивини групи контролю та груп алкоголіків з цирозом та без. В алкоголіків, що страждали на цироз було показано зміни в рівнях експресії білка в порівнянні з обома іншими дослідженими групами. Це, ймовірно, викликано відмінностями в тяжкості захворювання між підгрупами алкоголіків. Така залежна від стану хвороби регуляція експресії білків супроводжувалась значущими відмінностями між посттрансляційно зміненими ізоформами білків, які беруть

участь у базальному енергетичному обміні, рециркуляції синаптичних везикул та шаперонінгу [65].

Важливо відзначити, що результати дослідження протеому в організмі осіб, що зловживають алкоголем, є недостатніми та містять значну кількість артефактів у зв'язку з подвійним зловживанням іншими речовинами (наприклад, кокаїном або тютюном), специфічним дефіцитом харчування, або наявністю дисфункції органів [66]. В останні роки широко обговорюються особливості перебігу хронічних захворювань печінки змішаної етіології (вірусної та алкогольної). Зокрема, відомо, що більше 50% осіб, що зловживають алкоголем, мають вірусні інфекції [67]. В результаті, найбільш достовірні дані з вивчення впливу алкоголю на метаболізм білка були отримані в експериментах на тваринах, де режим введення етанолу може суворо контролюватися. У них, приміром, показано, що, як за хронічного, так і гострого введення, алкоголь здатен викликати зниження синтезу білка у м'язах скелету, а також у шкірі, кістках і тонкому кишківнику. Хронічні дослідження на тваринах також демонструють збільшення екскреції азоту з сечею і втрату білка скелетними м'язами. Причому, стосовно скелетних м'язів, то зниженню синтезу білка не вдається запобігти за допомогою інгібіторів синтази оксиду азоту та вважають, що його зниження відбувається не за рахунок генерації активних форм кисню, а може бути опосередковане дією реактивного метаболіту – ацетальдегіду [66].

Значна кількість експериментів на алкоголь-залежних тваринах стосується саме досліджень білкових спектрів сироватки, печінки та мозку. Зокрема, нещодавні дослідження протеома тканин печінки у 2-мірному агарозному гелі та 3-ступінчастий аналіз протеома сироватки крові щурів, що хронічно споживали алкоголь дозволили диференційно виявити до 46 білкових плям [68]. У печінці найбільш помітною зміною було зниження експресії білка масою 29 кДа, який згодом був ідентифікований як карбоангідраза III (КА III). Понижувальна регуляція експресії даного білка була підтверджена і за допомогою Вестерн-блот аналізу. Вміст мРНК КА III був також знижений [68]. В цих же досліджах було показано, що у сироватці крові щурів в різному ступені вираженості експресувався 41 білок. Серед них привертає увагу бетаїн-гомоцистеїн метилтрансфераза, експресія якої підвищувалась як в сироватці, так і в печінці щурів з хронічним алкоголізмом [68].

У щурів, які хронічно споживали етанол, було відтворено модель запою. Протеомний аналіз дозволив виявити зміни білкового профілю у печінці цих тварин [69]. Було показано, що хронічне споживання етанолу викликало зниження вмісту вуглекислої ангідрази 3 у печінці, яке було більш вираженим після запоїв. Причому однократне введення етанолу не впливало на цей білок, що на думку авторів дослідження може свідчити про його можливу роль в зростанні сприйнятливості печінки до ушкоджуючої дії етилового спирту під час запоїв у хронічних алкоголіків [69]. У 2-мірному агарозному гелі було показано лише незначне зниження цитозольних ізоцитратдегідрогенази та глутамінсинтетази після хронічного запою.

З іншого боку, після хронічного введення етанолу методом вестерн-блоту продемонстроване значне зниження вмісту лише глутамінсинтетази. Рівень мю ізоформи глутатіон-S-трансферази зростав після хронічного споживання етанолу, але був нижчим після введення у режимі запоїв у порівнянні з попередньою групою [69]. Показане значне зменшення рівня основної форми дисульфід ізомераза асоційованого протеїну 3 та зростання його кислої форми у печінці щурів після відтворення стану хронічного запою, але після хронічного або однократ-

ного введення етанолу подібних змін не спостерігали [69]. Істотні зміни білкового профілю за умов хронічного запою супроводжувалися помітним посиленням ураження печінки, про що свідчили підвищення ступеню жирового гепатозу, некрози, збільшення 4-гідроксіноненьальмічених білків, зростання експресії CYP2E1, а також зниження H2AX фосфорилування гістонів [69].

Враховуючи роль вуглекислої ангідрази 3, ізоцитратдегідрогенази та глутамінсинтетази в підтриманні про/антиоксидантного балансу; дисульфід ізомераза асоційованого протеїну 3 для контролю якості білка, апоптозу і репарації ДНК, а також зниження глутамінсинтетази, як чутливого маркера периферичного ураження печінки, автори визначають вищеозначені білки, як молекулярні мішені, яким належить потенційна роль у прогресуванні ураження печінки при запоях [69].

У щурів, що хронічно примусово вживали 30% розчин етанолу, на 11 добу експерименту було відмічене зростання у 40 разів вмісту білків з молекулярною масою 43-45 кДа, що певною мірою може бути спричинено підвищенням у клітинах вмісту колагену (44 кДа) [70], посилення вмісту якого викликає хронічна алкогольна інтоксикація [71]. Даний стимулюючий ефект реалізується за декількома механізмами, один з яких пов'язаний зі здатністю ацетальдегіду безпосередньо активувати ряд транскрипційних факторів, зокрема, AP-1, p35/EBPβ [72]. З іншого боку, утворюючи стабільні аддукти з карбоксил-термінальними пропептидами проколагену, ацетальдегід нівелює їх здатність інгібувати синтез колагену після вивільнення з молекул проколагену [73].

Слід зазначити, що інтенсифікація синтезу колагену спостерігається на більш пізніх термінах споживання алкоголю і може розглядатися як своєрідний маркер перероджень печінки, зокрема, початкових етапів розвитку фіброзів. У печінці щурів з хронічною алкогольною інтоксикацією фіксували збільшення в середньому у 9,5 разів вмісту білків з молекулярною масою 39-41 кДа протягом всього терміну проведення експерименту по відношенню до контрольних значень [70]. Можливо, що зміни у цьому молекулярному діапазоні мас, пов'язані з протеогліканом – люміканом, який має подібну молекулярну масу [74].

Було показано зростання у 8,75 разів вмісту фракції білків з молекулярною масою 48-50 кДа у гепатоцитах щурів, які хронічно споживали 30% розчин етанолу, на 21 добу у порівнянні з контролем [70]. Беручи до уваги, що за хронічної алкогольної інтоксикації відбуваються зміни у функціонуванні не лише тубулінових мікротрубочок, а й інших компонентів цитоскелету, зростання вмісту білків з даною молекулярною масою частково може бути результатом порушення організації кератинових проміжних філаментів, яке спостерігається при хронічних захворюваннях печінки різної етіології, в тому числі і спричинених тривалим споживанням алкоголю [75].

За умов експериментальної хронічної алкогольної інтоксикації можуть відбуватись зміни протеому не лише печінки, а і мозку піддослідних тварин. Протеомними методами було проаналізовано кору головного мозку та середній мозок мишей лінії 57BL/6J [76], яких піддавали хронічній переривчастій експозиції етанолу на моделі двох-пляшкової парадигми вибору, яка є однією з найкращих доступних моделей алкогольної залежності у тварин [77]. До дослідження були залучені миші, що піддавалися експозиції повітря, насиченого парами етанолу (алкоголь-залежні) та миші, що піддавалися впливу чистого повітря (алкоголь-незалежні). Обидві групи, крім того, мали вільний доступ до алкоголю. Також була включена третя група мишей, які не були знайомі з алкоголем (інтактні). Були виявлені значні зміни експресії

білків у мозку мишей, що вдихали етанол, порівняно з двома іншими групами. Для значної кількості ізоформ білків було виявлено регіон-специфічну диференційну регуляцію. Показано участь специфічних білків, таких як дінамін-1 і його ізоформи, які в основному активувались у мишей з алкогольною залежністю. Зміни в рівнях білків, виявлених в даному дослідженні на думку авторів можуть грати ключову роль в ескаляції споживання етанолу пов'язаній із алкогольною залежністю [76].

Нещодавно І. Степанець виявлено зниження вмісту білкових фракцій із молекулярною масою 46-48 кДа (у 2,3 рази), 34-35 кДа (у 2,1 рази), 27-30 кДа (у 4,7 рази) та 16-18 кДа (у 1,5 рази) у гомогенатах мозку щурів на 21 добу експерименту [70]. Процитовані результати не суперечать даним інших дослідників – зокрема, експерименти з використанням 3Н-лейцину виявили зниження його включення в пул нейрональних білків як за хронічної дії етанолу, так і під час розвитку абстинентного синдрому, що вказує на пригнічення синтетичної активності клітин мозку за даних умов [78].

Witzmann зі співавторів [79] проаналізували відмінності експресії білка в двох областях мозку – мигдалині та прилеглому ядрі інбредних інтактних, алкоголь-залежних та алкоголь-незалежних щурів. Рівень диференційної експресії білків в обох досліджених регіонах мозку, як правило, був нижче в алкоголь-залежних щурів у порівнянні з алкоголь-незалежними тваринами. Значні відмінності були виявлені для клітинного ретиноевої кислоти-зв'язуючого білка 1 і кальмодулін-залежної протеїнази (обидва беруть участь у сигнальних механізмах клітин). Додаткові зміни були визначені в прилеглому ядрі для білків з наступними функціями: обмін речовин, міжклітинний та внутрішньоклітинний білковий транспорт, молекулярні шаперони, сигнальні механізми клітин, синаптична функція, стримування окислювального стресу, ріст / диференціація [79].

Було досліджено ефекти багаторазового системного введення помірних доз (1 г/кг) етанолу на рівень білків схильних та несхильних до алкоголю інбредних щурів, а також не інбредних щурів лінії Вістар [80]. Введення етанолу щурам не схильним до алкоголю призводило до модифікації паттернів експресії більшої кількості білків, ніж у щурів схильних до алкоголю та не інбредних тварин. Більшість змін відбулася в кальцій-кальмодуліновій сигнальній системі, G-протеїн сигнальній системі, синаптичних структурах, а також гістонах. В цілому, це дослідження показало унікальну відповідь оболонки прилеглому ядра на введення етанолу у не схильних до алкоголю щурів порівняно зі схильними до алкоголю. Такий феномен може відображати зміни у функціонуванні нейронів в цій області мозку, які можуть відповідати за пов'язану зі споживанням алкоголю поведінку та / або підвищену чутливість до алкоголю, що проявляється не схильних до етанолу щурів.

І. Степанець зі співавторів показали, що у всіх досліджуваних пробах сироватки крові, як контрольних щурів, так і за умов розвитку хронічної алкогольної інтоксикації, були присутні білкові фракції з відносними молекулярними масами від 7 до 208 кДа [81]. Зокрема, дослідники спостерігали зростання рівня фракцій з молекулярною масою 180 кДа на 7, 14 і 28 добу експерименту на 20%, 17%, 22%, відповідно. Можливо, що зазначена фракція відповідає α_2 -макроглобуліну, оскільки відомо, що α_2 -макроглобулін складається з 4-х однакових субодиниць з молекулярною масою 180 кДа та відноситься до білків гострої фази, а його концентрація підвищується за умов патологічного стану (при запальних процесах), який розвивається і при введенні етанолу [82].

В тих же експериментах було встановлено зниження вмісту білкової фракції найбільш представленого в сироватці крові білка – альбуміну (67 кДа) на 12% на 7 добу введення етанолу в порівнянні з контрольними значеннями. На 14 добу спостерігалось максимальне зниження (на 21%) [81]. Це може свідчити про пригнічення білок-синтетичної функції печінки внаслідок алкогелізації, оскільки основним місцем синтезу альбумінів є саме гепатоцити [83].

Крім того, у роботі І. Степанець зі співавторів показано підвищення білкової фракції 9 кДа на 25 % на 7 добу введення етанолу, тоді як на 14, 28 добу експерименту відбулося зниження на 12% та 27%, відповідно [81]. Автори вважають, що ці результати можуть віддзеркалювати зміни вмісту гаптоглобіну [81], молекула якого складається з двох ланцюгів по 40 кДа і двох ланцюгів по 16 чи 9 кДа, рівень яких значно зростає за умов різних патологічних станів (запалення, тканинне ушкодження, пухлинний процес та інші) [84, 85].

За умов хронічної алкогольної інтоксикації в крові щурів показане зростання рівня компонентів γ -глобулінової фракції з молекулярною масою 280 кДа на 50%, 63%, 56 % на 7, 14, 28 добу експерименту відповідно [70]. До даної фракції відносяться імуноглобуліни А (160-380 кДа), G (150-170 кДа), М (970 кДа), що володіють захисними властивостями, забезпечуючи гуморальний захист організму. Імуноглобуліни (Ig) являють собою глікопротеїни з молекулярною масою від 150 до 1000 кДа. Молекули імуноглобулінів складаються з 4 ланцюгів: 2 однакових важких ланцюгів (50 – 70 кДа) і 2 легких ланцюгів (по 23 кДа) [86]. Зростання рівня імуноглобулінів за даних умов може свідчити про активацію імунної системи, що зумовлює розвиток запального процесу [84].

Сучасні протеомні методики надали можливість відкриття нових біомаркерів алкогольної залежності. У 2004 році, Nomura та ін. повідомив про перше застосування мас-спектрометричного методу SELDI-TOF-MC (Surface Enhanced Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) в галузі пошуку біомаркерів алкоголізму, визначивши, що за хронічного вживання алкоголю знижується вміст фрагментів фібриногену αE (5,9 кДа пептид) і Apo AII (7,8 кДа), значно зростаючи в період алкогольної абстиненції [87].

На відміну від цього Freeman зі співавторів мас-спектрометричним методом виявили зростання рівня Apo AII в сироватці крові мавп, що добровільно споживали етанол [88]. Пізніше, Nomura з колегами використали пік 5,9 кДа, в поєднанні з ГГТ і додатковим білком масою 28 кДа для виявлення звичних п'яниць з чутливістю 96,8% і специфічністю 60,9% [89]. Та ж група дослідників також використала MALDI-TOF / TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization- Time-of-flight / Time-of-flight) для виявлення підвищуючої регуляції фібринопептиду А (незміненого та фосфорильованого) і понижуючої регуляції фібриногену αC викликаних хронічним алкоголізмом [90]. Нещодавно Nomura з використанням традиційних протеомних методів – SDS-PAGE (dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) та ELISA (enzyme-linked immuno sorbent assay) запропонував в якості біомаркерів надмірного вживання алкоголю фактор пігментного епітелію. Було показано, що фактор пігментного епітелію збільшується в осіб питущих помірно і тяжко питущих в порівнянні з особами, що не вживали алкоголю [91]. Методами рідинної хроматографії та мас-спектрометрії як потенційні біомаркери зловживання алкоголем досліджені та визначені інші білки, такі як гелізолин, селенопротеїни Р, серотрансферин, тетрапектин і гемопексин [92].

Нещодавно Freeman і Vrana дослідили можливість використання панелі білків, а не одного білка для оцінки схильності індивіду до алкоголю. Плазмова панель, яка налічує 17 білків була виявлена за допомогою Luminex аналізу 90 відомих плазматичних цитокінів, факторів росту та інших білків. Вона дозволила правильно виявити алкогольну залежність зі 100% чутливістю і диференціювати будь-який рівень абстиненції з 88% точністю у не людиноподібних приматів [93]. У мавп, 2D-DIGE (two-dimensional difference in gel electrophoresis) був використаний для кількісної оцінки білків плазми в зразках, відібраних перед впливом етанолу і через 3 місяці надмірного добровільного вживання етанолу. Було показано зміни рівнів амілоїдного A4 сироватки крові, ретинол-зв'язуючого білка, інтер- α інгібітора H4, Apo J (кластерин) і фібронектину. Ці зміни були підтверджені імуноблотингом. Ці білки-мішені у людей з надмірним споживанням алкоголю змінювались наступним чином: збільшення рівнів сироваткового амілоїду A4 і Apo J та зниження рівня фібронектину в порівнянні з контролем [94].

Підсумовуючи проведений аналіз наукової літератури можна засвідчити недостатню кількість досліджень, які стосуються змін протеому на різних етапах розвитку алкогольної інтоксикації. Оскільки зміни експресії білків можуть свідчити про метаболічні порушення в організмі, їх детальне вивчення під час формування розвитку алкогольної залежності дозволить не лише розширити наші уявлення про механізми даного патогенезу, а й розробити нові підходи до діагностики даної патології, зокрема на ранніх етапах. Важливим завданням є виявлення біомаркерів, які б дозволили вимірювати рівень споживання алкоголю шляхом виявлення пошкодження тканин або інших фізіологічних реакцій на пияцтво протягом довгого часу. Оскільки, приміром печінкові проби є доступним аналізом, але вони не можуть виявити проблеми зловживання алкоголем на пізніх стадіях захворювання. Це ускладнюється ще й тим, що пошкодження печінки присутнє не у всіх алкоголіків. Наприклад, є повідомлення стосовно того, що дві третини осіб з алкоголізмом мали нормальну функцію печінки на початку лікування [95]. Розробка надійного молекулярного аналізу крові стосовно виявлення алкогольної залежності і тяжких запойів стане важливою віхою в діагностиці і лікуванні даного захворювання.

Стратегії пошуку біомаркерів алкоголізму повинні включати ідентифікацію білків, кількість яких відрізняється у алкоголіків і не-алкоголіків. Вони мають легко вимірюватись з метою оцінки того, чи людина нещодавно епізодично вжила алкогольний напій, або є алкоголіком. Висока пропускна здатність таких технологій, такі як протеоміка та геноміка значно збільшують ймовірність виявлення панелі найбільш чутливих і специфічних біомаркерів. Перспективними в цьому плані можуть бути дослідження з участю нелюдиноподібних приматів, оскільки для них не існує деяких обмежень, пов'язаних з людськими суб'єктами, наприклад такими як, суперечлива самооцінка рівня споживання алкоголю, варіації в дієті та інші індивідуальні відмінності між суб'єктами. По мірі того, як вчені будуть відкриті нові біомаркери споживання алкоголю, які відображатимуть або рівень споживання алкоголю, або алкоголь індуковане пошкодження органів, лікарі будуть забезпечені інструментами для рутинного тестування зловживання алкоголем та отримають нові можливості діагностики та лікування даного захворювання.

Розшифровка індивідуального протеому, ймовірно, буде частиною розвитку персоналізованої медицини майбутнього [96]. Протягом наступних десятиліть, коли діагностичні інструменти стануть більш інтелектуальни-

ми, а підходи до лікування більш профілактичними, нові економічно ефективні та комплексні технології дозволять індивідуумам мати доступ до відповідних частин послідовності їх геномів і протеомів. Регламентні процедури для оцінки збереження здоров'я, діагностування стану хвороби і ризиків майбутніх хвороб будуть доступні для кожної людини і, швидше за все, включатимуть багато параметричну інформативну молекулярну діагностику в через аналіз крові [97-99]. Покращена протеоміка, разом з новими технологіями, в кінцевому рахунку, сприятиме розробці профілактичних препаратів для людей з генетичною або психосоціальною схильністю до алкоголізму і стане проривом в подоланні цієї залежності.

Список використаних джерел

1. Lieber C.S. Hepatic, Metabolic, and Nutritional Disorders of Alcoholism: From Pathogenesis to Therapy / Lieber C.S. – Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences. – 2000. – V.37, 6. – P.551–584.
2. Kalapatapu R.K. Novel objective biomarkers of alcohol use: potential diagnostic and treatment management tools in dual diagnosis care / Kalapatapu R.K., Chambers R. – 2009. – Journal of Dual Diagnosis. – 5, №1. – P.57–82.
3. Freeman W.M. Future prospects for biomarkers of alcohol consumption and alcohol-induced disorders / Freeman W.M., Vrana K.E. – Alcoholism: Clinical Experimental Research – 2010. – V.34, №6. – P.946–954.
4. Bearer C.F. Advancing alcohol biomarkers research / Bearer C.F., Bailey S.M., Hoek J.B. – Alcoholism: Clinical Experimental Research. – 2010. – V.34, №6. – P.941–945.
5. Biomarkers Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework / Clinical Pharmacology Therapeutics. – 2001. – V.69, №3. – P.89–95.
6. Recommendations for biomarker identification and qualification in clinical proteomics / [Mischak H., Allmaier G., Apweiler R. et al.]. – Science Translation Medicine. – 2010. – V.2, №46. – P.46ps42.
7. Goodsaid F. Grand rounds in proteomics at the FDA white oak, silver spring, MD, USA, April 3, 2007 / Goodsaid F., Bandow J.E., Mischak H. – Proteomics Clinical Applications – 2007. – V.1, №12. – P.1526–1531.
8. Litten R.Z. Self-report and biochemical measures of alcohol consumption / Litten R.Z., Fertig J. – Addiction. – 2003. – V.98 (Suppl. 2). – P.iii–iv.
9. Litten R.Z. Alcohol biomarkers in applied settings: recent advances and future research opportunities // Litten R.Z., Bradley A.M., Moss H.B. – Alcoholism: Clinical and Experimental Research. – 2010. – V.34, №6. – P.955–967.
10. Determination of maternal-fetal biomarkers of prenatal exposure to ethanol: a review / [Joya X., Friguls B., Ortigosa S. et al.]. – Journal Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2012. – V. 69. – P.209–222.
11. Gorini G. Molecular targets of alcohol action: Translational research for pharmacotherapy development and screening / Gorini G., Bell R.L., Mayfield R.D. – Progress in Molecular Biology and Translational Science. – 2011. – V.98. – P.293–347.
12. Dodd P.R. Cell death mediated by amino acid transmitter receptors in human alcoholic brain damage: conflicts in the evidence / Dodd P.R., Lewohl J.M. – Annual New York Academy Science. – 1998. – V.844. – P.50–58.
13. Discordant protein and mRNA expression in lung adenocarcinomas / [Chen G., Gharib T.G., Huang C.-C. et al.]. – Molecular Cell Proteomics. – 2002. – V.1. – P.304–313.
14. Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale / [Greenbaum D., Colangelo C., Williams K., Gerstein M.]. – Genome Biology. – 2003. – V.4. – P.117.
15. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast / [Gygi S.P., Rochon Y., Franz B.R., Aebersold R.]. – Molecular Cell Biology. – 1999. – V.19. – P.1720–1730.
16. Concordant regulation of translation and mRNA abundance for hundreds of targets of a human microRNA / [Hendrickson D.G., Hogan D.J., McCullough H.L. et al.]. – PLoS Biology. – 2009. – V.7. – P.1000238.
17. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels / [Guo H., Ingolia N.T., Weissman J.S., Bartel D.P.]. – Nature. – 2010. – V.466. – P.835–840.
18. Global quantification of mammalian gene expression control / [Schwanhauser B., Busse D., Li N. et al.]. – Nature. – 2011. – V.473. – P.337–342.
19. Cederbaum A.I. Alcohol Metabolism / Cederbaum A.I. – Clinics in Liver Disease. – 2012. – 16, 4. – P. 667–685.
20. Mak K.M., Sehgal P., Harris C.K. Type VI Collagen: Its Biology and Value as a Biomarker of Hepatic Fibrosis. / Mak K.M., Sehgal P., Harris C.K. – Austin Biomarkers Diagnosis. – 2014. – V.1, 2. – P.9.
21. Laurent D. Alcoholic Cardiomyopathy: Multigenic Changes Underlie Cardiovascular Dysfunction / Laurent D., Edwards J.G. – Journal Cardiology Clinical Research. – 2014. – V.2, № 1. – P.1022.
22. Alcohol and bone: review of dose effects and mechanisms / [Maurel D.B., Boisseau N., Benhamou C.L., Jaffre C.]. – Osteoporosis international. – 2012. – V. 23, №1. – P.1-16.

23. Shepard B.D. Alcohol consumption impairs hepatic protein trafficking: mechanisms and consequences / Shepard B.D., Fernandez D.J., Tuma P.L. – *Genes Nutrition*. – 2010. – № 5. – P. 129–140.
24. Alcoholic skeletal muscle myopathy: definitions, features, contribution of neuropathy, impact and diagnosis / [Preedy V.R., Adachi J., Ueno Y. et al.]. – *European Journal of Neurology*. – 2001. – V.8, №6. – P. 677–687.
25. Нужный В.П. Фитокомпозиция "Депромил". Исследование влияния на элиминацию алкоголя и появления алкогольной интоксикации у больных алкоголизмом / Нужный В.П. – *Наркология*. – 2008. – № 2. – С. 47–55.
26. Bilban M. Blood biomarkers of alcohol abuse / Bilban M., Vrhovec S., Karlovsek M.Z. – *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*. – 2003. – V.54, № 4. – P. 253–231.
27. Biochemical markers of alcoholism / [Hannuksela M.L., Liisanantti M.K., Nissinen A.E., Savolainen M.J.]. – *Clinical Chemistry Laboratory Medicine*. – 2007. – V.45, № 8. – P.953–961.
28. Comparative evaluation of capillary zone electrophoresis and HPLC in the determination of carbohydrate-deficient transferrin / [Daves M., Cemin R., Floreani M. et al.]. – *Clinical Chemistry Laboratory Medicine*. – 2011. – V. 49, № 10. – P.1677–1680.
29. Oberrauch W. HPLC and mass spectrometric characterization of a candidate reference material for the alcohol biomarker carbohydrate-deficient transferrin (CDT) / Oberrauch W., Bergman A.C., Helander A. – *Clinical Chemistry Acta*. – 2008. – V. 395, № 1–2. – P.142–145.
30. Automated measurement of carbohydrate-deficient transferrin using the Bio-Rad %CDT by the HPLC test on a variant HPLC system: evaluation and comparison with other routine procedures / [Schellenberg F., Mennetrey L., Girre C. et al.]. – *Alcoholic and Alcoholism*. – 2008. – V. 43, № 5. – P.569–576.
31. Tavakoli H.R. Review of current clinical biomarkers for the detection of alcohol dependence / Tavakoli H.R., Hull M., Michael Okasinski L. – *Innovations Clinical Neuroscience*. – 2011. – V. 8, №3. – P.26–33.
32. Reif A. Carbohydrate-deficient transferrin parallels disease severity in anorexia nervosa / Reif A., Fallgatter A.J., Schmidtke A. – *Psychiatry Research*. – 2005. – V.137. – №1–2. – P.143–146.
33. Changes in transferrin glycosylation during pregnancy may lead to false-positive carbohydrate-deficient transferrin (CDT) results in testing for riskful alcohol consumption / [Kenan N., Larsson A., Axelsson O., Helander A.]. – *Clinical Chemistry Acta*. – 2011. – V.412, №1–2. – P.129–133.
34. Fleming M.F. A review of genetic, biological, pharmacological, and clinical factors that affect carbohydrate-deficient transferrin levels / Fleming M.F., Anton R.F., Spies C.D. – *Alcohol Clinical Experimental Research*. – 2004. – V.28, №9. – P.1347–1355.
35. Analysis of carbohydrate deficient transferrin serum levels during abstinence / [Ridinger M., Kehl P., Gible E., et al.]. – *Experimental Molecular Pathology*. – 2012. – V.92, №1. – P.50–53.
36. Anton R.F. Editorial commentary: alcohol biomarker papers / Anton R.F. – *Alcohol Clinical Experimental Research*. – 2010. – V.34, №6. – P.939–940.
37. Torrente M.P. Protein biomarkers of alcohol abuse / Torrente M.P., Freeman W.M., Vrana K.E. – *Expert Review Proteomics*. – 2012. – V.9, № 4. – P. 425–436.
38. Traditional markers of excessive alcohol use / [Conigrave K.M., Davies P., Haber P., Whitfield J.B.]. – *Addiction*. – 2003. – V.98 (Suppl. 2). – P.31–43.
39. Glycoconjugates in the detection of alcohol abuse / [Waszkiewicz N., Szajda S.D., Kepka A. et al.]. – *Biochemical Society Transactions*. – 2011. – V.39, №1. – P.365–369.
40. The effects of moderate drinking and abstinence on serum and urinary beta-hexosaminidase levels / [Karkkainen P., Jokelainen K., Roine R. et al.]. – *Drug and Alcohol Dependence Journal*. – 1990. – V.25, №1. – P.35–38.
41. Javors M.A. Current status of carbohydrate deficient transferrin, total serum sialic acid, sialic acid index of apolipoprotein J and serum beta-hexosaminidase as markers for alcohol consumption / Javors M.A., Johnson B.A. – *Addiction*. – 2003. – V.8 (Suppl. 2). – P.45–50.
42. Karkkainen P. Serum and urinary beta-hexosaminidase as markers of heavy drinking / Karkkainen P. – *Alcohol and Alcoholism*. – 1990. – V.25, №4. – P.365–369.
43. Modification of proteins and other biological molecules by acetaldehyde: adduct structure and functional significance / [Nicholls R., de Jersey J., Worrall S., Wilce P.]. – *International Journal Biochemistry*. – 1992. – V.24, №12. – P.1899–1906.
44. De Benedetto G.E. A new CE-ESI-MS method for the detection of stable hemoglobin acetaldehyde adducts, potential biomarkers of alcohol abuse / De Benedetto G.E., Fanigliulo M. – *Electrophoresis*. – 2009. – V.30, №10. – P.1798–1807.
45. IgAs against acetaldehyde-modified red cell protein as a marker of ethanol consumption in male alcoholic subjects, moderate drinkers, and abstainers / [Hietala J., Koivisto H., Latvala J. et al.]. – *Alcohol Clinical Experimental Research*. – 2006. – V.30, №10. – P.1693–1698.
46. Ghosh P. Plasma sialic acid index of apolipoprotein J (SIJ): a new alcohol intake marker / Ghosh P., Hale E.A., Lakshman M.R. – *Alcohol*. – 2001. – V.25, №3. – P.173–179.
47. Achur R.N. Circulating cytokines as biomarkers of alcohol abuse and alcoholism / Achur R.N., Freeman W.M., Vrana K.E. – *Journal Neuro-immune Pharmacology*. – 2010. – V.5, №1. – P. 83–91.
48. Serum TNF-alpha levels in relation to alcohol consumption and common TNF gene polymorphisms / [Gonzalez-Quintela A., Campos J., Loidi L. et al.]. – *Alcohol*. – 2008. – V.42, №6. – P.513–518.
49. Production of inflammatory cytokines by peripheral blood monocytes in chronic alcoholism: relationship with ethanol intake and liver disease / [Laso F.J., Vaquero J.M., Almeida J. et al.]. – *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*. – 2007. – V.72, №5. – P. 408–415.
50. AUDIT-C as a brief screen for alcohol misuse in primary care / [Bradley K.A., DeBenedetti A.F., Volk R.J. et al.]. – *Alcoholism: Clinical Experimental Research*. – 2007. – V.31, №7. – P.1208–1217.
51. Соловьева Н.В. Изменения белкового состава сыворотки крови у больных с острым алкогольным психозом / Соловьева Н.В., Шидакова Н.А., Соловьев А.Г. – *Современные проблемы науки и образования. Электронный ресурс. Режим доступа: <http://www.science-education.ru/109-r9253>*
52. Gstaiger M. Applying mass spectrometry-based proteomics to genetics, genomics and network biology / Gstaiger M., Aebersold R. – *Nature Reviews Genetics*. – 2009. – V.10. – P.617–627.
53. Proteomics and liver fibrosis: identifying markers of fibrogenesis / [Mas R.V., Fisher R.A., Archer K.J., Maluf D.G.]. – *Expert Review of proteomics*. – 2009. – V.6. – P.421–431.
54. Clinical proteomics for liver disease: a promising approach for discovery of novel biomarkers / [Uto H., Kanumra S., Takami Y., Tsubouchi H.]. – *Proteome Science*. – 2010. – V.8. – P.70.
55. Marshall T. Effects of alcohol abuse on human serum proteins revealed by two-dimensional electrophoresis / Marshall T., Vesterberg O., Williams K. – *Electrophoresis*. – 1984. – №5. – P.122–128.
56. Two-dimensional protein electrophoresis and multiple hypothesis testing to detect potential serum protein biomarkers in children with fetal alcohol syndrome / [Robinson M.K., Myrick J.E., Henderson L.O. et al.]. – *Electrophoresis*. – 1995. – V.16, № 7. – P.1176–1183.
57. The application of proteomics to the human alcoholic brain / [Lewohl J.M., Dyk D.D., Van Craft G.E. et al.]. – *Annals research New York Academy Science*. – 2004. – V.1025. – P.14–26.
58. Differential protein expression in the prefrontal white matter of human alcoholics: a proteomics study / [Alexander-Kaufman K., James G., Sheedy D. et al.]. – *Molecular Psychiatry Journal*. – 2006. – V.11. – P.56–65.
59. A proteome analysis of the dorsolateral prefrontal cortex in human alcoholic patients / [Alexander-Kaufman K., Cordwell S., Harper C., Matsumoto I.]. – *Proteomics Clinical Applications*. – 2007. – № 1. – P.62–72.
60. Cerebellar vermis proteome of chronic alcoholic individuals / [Alexander-Kaufman K., Harper C., Wilce P., Matsumoto I.]. – *Alcoholism: Clinical Experimental Research*. – 2007. – V.31. – P.1286–1296.
61. Differential protein expression profiles in the hippocampus of human alcoholics / [Matsuda-Matsumoto H., Iwazaki T., Kashem M.A. et al.]. – *Neurochemistry International Journal*. – 2007. – V.51. – P.370–376.
62. Differential protein expression in the corpus callosum (splenium) of human alcoholics: a proteomics study / [Kashem M.A., James G., Harper C. et al.]. – *Neurochemistry International Journal*. – 2007. – V.50. – P.450–459.
63. Differential protein expression in the corpus callosum (body) of human alcoholic brain / [Kashem M.A., Etages H.D., Kopitar-Jerala N. et al.]. – *Journal Neurochemistry*. – 2009. – V.110. – P.486–495.
64. Synaptic proteome changes in the superior frontal gyrus and occipital cortex of the alcoholic brain / [Etheridge N., Lewohl J.M., Mayfield R.D. et al.]. – *Proteomics Clinical Applications*. – 2009. – №3. – P.730–742.
65. Identifying changes in the synaptic proteome of cirrhotic alcoholic superior frontal gyrus / [Etheridge N., Mayfield R.D., Harris R.A., Dodd P.R.]. – *Current Neuropharmacology*. – 2011. – №9. – P.122–128.
66. Preedy V.R. Protein metabolism in alcoholism: effects on specific tissues and the whole body / Preedy V.R., Reilly E.R., Patel V.B. – *Nutrition*. – 1999. – V.15, №7-6. – P.604–608.
67. Танащук Е.Л. Особенности смешанного варианта (вирусного и алкогольного) поражения печени / Танащук Е.Л. – *Гепатологический форум: приложения к журн. Клиническая фармакология и терапия*. – 2005. – № 4. – С. 24–27.
68. Combined proteomic analysis of liver tissue and serum in chronically alcohol-fed rats / [Yamada M., Satoh M., Seimiya M. et al.]. – *Alcoholism Clinical Experimental Research*. – 2013 – Suppl 1. – P. E79–87.
69. Proteomic analysis of liver after ethanol binge in chronically ethanol treated rats / [Aroor A.R., Roy L.J., Restrepo R.J. et al.]. – *Proteome Science*. – 2012. – № 10. – P.29.
70. Степанец І.О. Потенційні білкові маркери розвитку хронічної алкогольної інтоксикації: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук: спец. 03.00.04 "Біохімія" / І.О. Степанець. – Київ, 2014. – 20 с.
71. Siegmund S.V. Molecular mechanisms of alcohol-induced hepatic fibrosis / Siegmund S.V., Dooley S., Brenner D.A.// – *Digestive Diseases*. – 2005. – № 23. – P. 264–274.;
72. Thompson K.J. Targeting collagen expression in alcoholic liver disease / Thompson K.J., McKillop I.H., Schrum L.W. – *World Journal Gastroenterology*. – 2011. – V. 17, № 20. – P. 2473–2481.
73. Intracellular signaling pathways involved in acetaldehyde-induced collagen and fibronectin gene expression in human hepatic stellate cells / [Svegliati-Baroni G., Ridolfi F., Sario D.A. et al.]. – *Hepatology*. – 2001. – V. 33, № 5. – P. 1130–1140.
74. Lumican, an extracellular matrix proteoglycan, is a novel requisite for hepatic fibrosis / [Krishnan A., Li X., Kao W.Y. et al.]. – *Laboratory Investigation*. – 2012. – V. 92, № 12. – P. 1712–1725.
75. Shepard B.D. Alcohol-induced alterations of the hepatocyte cytoskeleton / Shepard B.D., Tuma P.L. – *World Journal Gastroenterology*. – 2010. – V. 16, № 11. – P. 1358–1365.
76. Gorini G. Neurobiological signatures of alcohol dependence revealed by protein profiling / Gorini G., Roberts A.J., Mayfield R.D. – *PLoS ONE*. – 2013. – № 8. – 82656.

77. Lopez M.F. Effect of pattern and number of chronic ethanol exposures on subsequent voluntary ethanol intake in C57BL/6J mice / Lopez M.F., Becker H.C. – Psychopharmacology. – 2005. – V. 181. – P. 688–696.
78. Kazakova P.B. Changes in protein metabolism in brain neurons during the withdrawal syndrome in chronically alcoholized rats (histoautoradiographic and interferometric research) / Kazakova P.B., Khokhrina N.T., Rakhmanova V.I. – The Physiology of polyamines. – 1990. – V. 109, № 3. – P.244–246.
79. Innate differences in protein expression in the nucleus accumbens and hippocampus of inbred alcohol-preferring and -nonpreferring rats / [Witzmann F.A., Li J., Strother W.N. et al.]. – Proteomics. – 2003. – № 3. – P.1335–1344.
80. Differential effects of ethanol in the nucleus accumbens shell of alcohol-preferring (P), alcohol-non-preferring (NP) and Wistar rats: a proteomics study / [McBride W.J., Schultz J.A., Kimpel M.W. et al.]. – Pharmacology Biochemistry and Behavior. – 2009. – V. 92. – P.304–313.
81. Степанець І.О. Білковий склад сироватки крові щурів за умов розвитку хронічної алкогольної інтоксикації / Степанець І.О., Моргаченко О.О., Остапченко Л.І. – Вісник Львівського Університету. Серія біологічна. – 2013. – № 61. – С. 30–36.
82. Vandenven F. Human $\alpha 2$ -macroglobulin: structure and function / Vandenven F. – Trends Biochemical Science. – 1982. – V.7, № 5. – P. 185–187.
83. Tuma D.J. Effects of Ethanol on Protein Trafficking in the Liver / Tuma D.J., Sorrell M.F. – Seminars in liver disease – 1988. – V. 8, № 1. – P. 69–80.
84. Ritchie R. Wellness assessment: Targeted testing for specific problems which are not the measurement of health / Ritchie R. – Serum Proteins in Clinical Medicine. – 1999. – Vol. II, Clinical Section. – Foundation for Blood Research. Publishers: Scarborough. – P. 120.00–1 – 120.00–9.
85. Haptoglobin heavy and light chains / [Valette I., Waks M., Wejman J.C. et al.]. – Journal Biological chemistry. – 1981. – V. 256. – P. 672–679.
86. Schroeder H.W. Structure and function of immunoglobulins / Schroeder H.W., Cavacini L. – Journal Allergy Clinical Immunology. – 2010. – V. 125, № 2. – P.41–52.
87. Identification of novel and downregulated biomarkers for alcoholism by surface enhanced laser desorption/ionization-mass spectrometry / [Nomura F., Tomonaga T., Sogawa K. et al.]. – Proteomics. – 2004. – V.4, №4. – P.1187–1194.
88. Apo-AII is an elevated biomarker of chronic non-human primate ethanol self-administration / [Freeman W.M., Gooch R.S., Lull M.E. et al.]. – Alcohol and Alcoholism. – 2006. – V.41. – P.300–305.
89. Diagnostic values of surface-enhanced laser desorption/ionization technology for screening of habitual drinkers / [Sogawa K., Itoga S., Tomonaga T., Nomura F.]. – Alcoholism: Clinical Experimental Research. – 2007. – V.31(Suppl. 1). – P.S22–S26.
90. A search for novel markers of alcohol abuse using magnetic beads and MALDI-TOF/TOF mass spectrometry / [Sogawa K., Satoh M., Kodera Y. et al.]. – Proteomics Clinical Applications. – 2009. – V.3. – P.821–828.
91. Increased serum levels of pigment epithelium-derived factor by excessive alcohol consumption-detection and identification by a three-step serum proteome analysis / [Sogawa K., Kodera Y., Satoh M. et al.]. – Alcoholism: Clinical and Experimental Research. – 2011. – V.35. – P.211–217.
92. A proteomic workflow for discovery of serum carrier protein-bound biomarker candidates of alcohol abuse using LC-MS/MS / [Lai X., Liangpunsakul S., Crabb D.W. et al.]. – Electrophoresis. – 2009. – V.30. – P.2207–2214.
93. Classification of alcohol abuse by plasma protein biomarkers / [Freeman W.M., Salzberg A.C., Gonzales S.W. et al.]. – Biological Psychiatry. – 2010. – V.68. – P. 219–222.
94. Plasma proteomic alterations in non-human primates and humans after chronic alcohol self-administration / [Freeman W.M., Vanguilder H.D., Guidone E. et al.]. – International Journal Neuropsychopharmacol. – 2011. – P. 899–911.
95. Sobell L.C. Utility of liver function tests for screening 'alcohol abusers' who are not severely dependent on alcohol / Sobell L.C., Agrawal S., Sobell M.B. – Substance Use Misuse – 1999. – V.34. – P.1723–1732.
96. Personal omics profiling reveals dynamic molecular and medical phenotypes / [Chen R., Mias G.I., Li-Pook-Than J. et al.]. – 2012. – Cell. – V.148. – P.1293–1307.
97. Bailey R.C. New multiparameter bioanalytical technologies for applications in personalized medicine, drug discovery, and fundamental biology / Bailey R.C. – Bioanalysis. – 2009. – P.1043–1047.
98. Systems biology and new technologies enable predictive and preventative medicine / [Hood L., Heath J.R., Phelps M.E., Lin B.]. – Science. – 2004. – V.306. – P.640–643.
99. Mayfield R.D. Gene expression profiling in blood: new diagnostics in alcoholism and addiction? / Mayfield R.D., Harris R.A. – Neuropsychopharmacology. – 2009. – V.34. – P.250–251.

Надійшла до редколегії 30.11.15

О. Харченко, канд. биол. наук, А. Савчук, д-р биол. наук, Л. Остапченко, проф.
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

АНАЛИЗ ИЗМЕНЕНИЙ БЕЛКОВОГО ПРОФИЛЯ ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ ДЛЯ ДИАГНОСТИРОВАНИЯ РАЗВИТИЯ ДАННОГО ПАТОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ ОРГАНИЗМА

В обзоре проанализированы существующие на сегодня биомаркеры, которые позволяют выявить хроническое злоупотребление алкоголем, а именно: углевод-дефицитный трансферрин, активности ГГТ, АлАТ, АсАТ, β -ГКА; индекс сиаловая кислота – Апо J, уровень циркулирующих цитокинов (TNF- α , IL-1 и IL-6), α -1 и α -2-глобулинов, сывороточного амилоида A4, фибронектина и др. На сегодня результаты исследования протеома в организме лиц, злоупотребляющих алкоголем, содержат значительное количество артефактов в связи с двойным злоупотреблением другими веществами (например, кокаином, табаком), специфическим дефицитом питания, наличием дисфункции органов. Подытоживая проведенный анализ научной литературы можно говорить о недостаточном количестве исследований, касающихся изменений протеома на разных этапах развития алкогольной интоксикации. Важной задачей является выявление биомаркеров, позволяющих измерять уровень потребления алкоголя путем выявления повреждения тканей или других физиологических реакций на уровень злоупотребления алкоголем в течение длительного времени. Стратегии поиска биомаркеров алкоголизма должны включать идентификацию белков, количество которых отличается у алкоголиков и не-алкоголиков. Расшифровка индивидуального протеома, вероятно, будет частью развития персонализированной медицины будущего.

Ключевые слова: алкогольная интоксикация, протеом.

O. Kharchenko, PhD, O. Savchuk, D. Sc, L. Ostapchenko, Prof.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

ANALIZ PROTEIN PROFILE CHANGES IN CHRONIC ALCOHOL INTOXICATION TO DIAGNOSE THE DEVELOPMENT OF THIS PATHOLOGICAL CONDITIONS

In the review it was characterized today existing biomarkers that allow to detect chronic alcohol abuse, namely: carbohydrate-deficient transferrin, the activity of GGT, ALT, AST, β -hexosaminidase; sialic acid index of apolipoprotein J, circulating levels of cytokines (TNF- α , IL-1 and IL-6), α -1- and α -2 globulins, serum amyloid A4, fibronectin, and others. At present results of the studies of alcohol abusers organism's proteome contain significant amount of artifacts, which are connected with the other substances of double abuse (e.g. cocaine, tobacco), specific nutrition deficiency, and the presence of organs dysfunction. Summarising the scientific literature analysis we can attest the lack of research concerning proteome changes at different stages of alcohol intoxication. An important task is to identify biomarkers that would allow measuring the level of alcohol consumption by detecting tissue damage and other physiological reactions on the alcohol abuse over time. Strategies of alcoholism biomarkers research should include the identification of proteins, which number differs in in alcoholics and non-alcoholics. Decoding of individual proteome is likely to be part of the future personalized medicine.

Key words: alcohol intoxication, protein.

УДК 616. 34-008.87.613.25

І. Лещенко, асп., О. Вірченко, канд. біол. наук, О. Гаділія, канд. біол. наук,
Т. Фалалєєва, д-р біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ,
Л. Лазаренко, д-р біол. наук
Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України, Київ

ПАРАМЕТРИ ВУГЛЕВОДНОГО ОБМІНУ ПРИ ГЛУТАМАТ-ІНДУКОВАНОМУ ОЖИРІННІ У ЩУРІВ ЗА УМОВ КОРЕКЦІЇ ПРОБІОТИЧНИМИ ШТАМАМИ ЛАКТОБАЦИЛ ТА БІФІДОБАКТЕРІЙ

*З'ясували вплив пробіотичних штамів на інсулінорезистентність, викликану глутамат-індукованим ожирінням у щурів. Ожиріння викликали шляхом неонатального введення глутамату натрію (4 мг/г, підшкірно) на 2, 4, 6, 8, 10 день життя. Введення пробіотиків починали через 4 тижні після народження та продовжували двотижневими курсами з перервами у 2 тижні. Через 4 місяці у щурів всіх груп було проведено аналіз вмісту глюкози і інсуліну в крові та індекс інсулінорезистентності НОМА. Неонатальне введення глутамату натрію призводило до розвитку інсулінорезистентності у щурів 4-хмісячного віку. Періодичне введення комбінованих пробіотиків попереджало розвиток інсулінорезистентності у щурів. Найбільш значний ефект мав комбінований пробіотик на основі штамів *Lactobacillus casei* IMVB-7280, *Bifidobacterium animalis* VKL, *Bifidobacterium animalis* VKB. Результати роботи дозволяють стверджувати про ефективність застосування пробіотичних штамів біфідобактерій та лактобацил для попередження розвитку інсулінорезистентності.*

Ключові слова: ожиріння, інсулінорезистентність, цукровий діабет 2 типу, пробіотики.

Вступ. Робота містить результати досліджень, проведених при грантовій підтримці Держаного фонду фундаментальних досліджень за конкурсним проектом "Механізми профілактично-лікувальної дії пробіотиків за умов розвитку ожиріння гіпоталамічного ґенезу" (2015 р., № держреєстрації 0115U004862).

Вступ. Цукровий діабет є одним з найпоширеніших захворювань і складає 6-7% всієї популяції людей [1, 2]. Особливе місце займає цукровий діабет типу 2 (ЦД2), який становить 85-90% серед усіх хворих на ЦД, а поширеність у людей похилого віку досягає близько 20% всієї популяції [3-5]. Люди з ожирінням складають особливу групу ризику щодо захворювання на ЦД2, адже майже в % випадків ожиріння провокує розвиток і ускладнення ЦД2 [6].

ЦД2 є багатофакторним і гетерогенним захворюванням генетичної природи, в основі якого лежить інсулінорезистентність (ІР) [7]. ІР розглядається як порушення біологічна відповідь периферичних тканин організму на вплив ендогенного або екзогенного інсуліну. Біологічна дія інсуліну полягає у регуляції метаболічних реакцій (обмін вуглеводів, жирів і білків) і мітогенних процесів (росту, диференціювання тканин, синтезу ДНК, транскрипції генів) [9]. Тому сучасне поняття ІР не зводиться до параметрів, що характеризують тільки метаболізм вуглеводів, а містить також зміни обміну жирів, білків, функції клітин ендотелію, експресії генів та ін. [8].

Аналіз наукової літератури останніх років свідчить про перспективу застосування пробіотиків у комплексному лікуванні хворих на ЦД2 та ожиріння [10, 11]. Особливий інтерес представляють специфічні мікробні препарати з "власної" симбіотичної мікрофлори людини. Вони модулюють різні фізіологічні функції організму, мають гіпохолестеринемічно-детоксикаційну дію, регулюють імунітет, здійснюють вазоактивний вплив [12]. У зв'язку з цим метою роботи було з'ясувати вплив пробіотичних штамів на інсулінорезистентність, викликану глутамат-індукованим ожирінням у щурів.

Методи досліджень. Дослідження проведені на 60 щурах-самцях з дотриманням нормативів Конвенції з біоетики Ради Європи 1997 року, Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей, загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (вересень 2001 року), інших міжнародних угод та національного законодавства у цій галузі. Тварин утримували в умовах акредитованого віварію згідно зі

"Стандартними правилами по упорядкуванню, устаткуванню та утриманню експериментальних біологічних клінік (віваріїв)". Прилади, що використовувалися для наукових досліджень, підлягали метрологічному контролю.

Щури були розділені на 6 групи по 10 тварин в кожній. Новонародженим щурам I групи підшкірно у об'ємі 8 мкл/г вводили плацебо (фізіологічний розчин). Новонародженим щурам II та III груп підшкірно у об'ємі 8 мкл/г вводили глутаматнатрію (4 мг/г) відповідно на 2, 4, 6, 8, 10 день життя [13]. Впродовж 4 місяців після народження щури знаходилися на звичайному харчовому раціоні. Група II відповідно отримувала 2,5 мл/кг води (в/ш). III, IV, V, VI групи відповідно отримували 2,5 мл/кг водного розчину суміші пробіотиків (2:1:1 *Lactobacillus casei* IMVB-7280, *Bifidobacterium animalis* VKL, *Bifidobacterium animalis* VKB; *Bifidobacterium animalis* VKL; *Bifidobacterium animalis* VKB; *Lactobacillus casei* IMVB-7280 відповідно) у дозі 5×10^9 КУО/кг (50 мг/кг) (внутрішньошлунково, в/ш). Введення починали через 4 тижні після народження та продовжували двотижневими курсами з перервами у 2 тижні.

Вуглеводний обмін оцінювали за показниками концентрації глюкози, інсуліну та індексу НОМА. Для визначення концентрації глюкози в крові використовували глюкозооксидазний метод Тріндера [14]. Показник концентрації глюкози виражали в ммоль/л. Концентрацію інсуліну в сироватці визначали за допомогою набору для імуноферментного аналізу (Rat/Mouse Insulin ELISA Kit, LincoResearch, США). Показник концентрації інсуліну виражали в $\mu\text{U}/\text{мл}$. Індекс інсулінорезистентності НОМА розраховували як добуток від множення концентрації глюкози в крові натще та концентрації інсуліну в сироватці, розділений на 22,5 [15].

Результати досліджень. Через 4 місяці після народження у щурів, яким на 2-10 добу життя підшкірно вводили глутамат натрію у дозі 4 мг/г, виявили суттєве порушення обміну вуглеводів. Так, в крові щурів з ожирінням було зареєстровано зростання на 41,6% ($p < 0,05$) вмісту глюкози порівняно з показниками інтактних щурів (рис. 1). Одночасно зростав рівень інсуліну в крові в 2,1 рази ($p < 0,05$) порівняно з інтактним контролем, що свідчить про розвиток діабету у щурів з ожирінням (рис. 2). Визначення індексу НОМА показало розвиток інсулінорезистентності у тварин, яким неонатально вводили глутамату натрію. Так, цей параметр зростав в 2,9 рази ($p < 0,05$) при глутаматному ожирінні щодо контрольних тварин (рис. 3). Отже, отримані дані

свідчать про розвиток діабету 2 типу за умов ожиріння гіпоталамічного генезу.

Введення пробіотичних штамів справляло значний превентивний вплив на стан вуглеводного обміну та запобігало розвитку його порушень. Вміст глюкози за умов застосування моноштамів виявився меншим на 21,1% ($p < 0,05$) в групі щурів, яким вводили *Bifidobacterium animalis* VKL, на 28,1% ($p < 0,05$) при введенні *Bifidobacterium animalis* VKB та 21,4% ($p < 0,05$) при введенні *Lactobacillus casei* MVB-7280 в порівнянні з контрольними

ми тваринами з ожирінням (рис. 1). При цьому при застосуванні монопробіотика *Bifidobacterium animalis* VKL рівень глюкози у щурів значущо не відрізнявся від показників інтактних тварин (рис. 1). Введення трьохштамного пробіотика *Bifidobacterium animalis* VKL і VKB та *Lactobacillus casei* MVB-7280 (1:1:2) призводило до зменшення рівня глюкози на 23,1% ($p < 0,05$) порівняно зі щурами з ожирінням. При цьому введення цього комбінованого пробіотика відновлювало вміст глюкози до рівня контрольних значень.

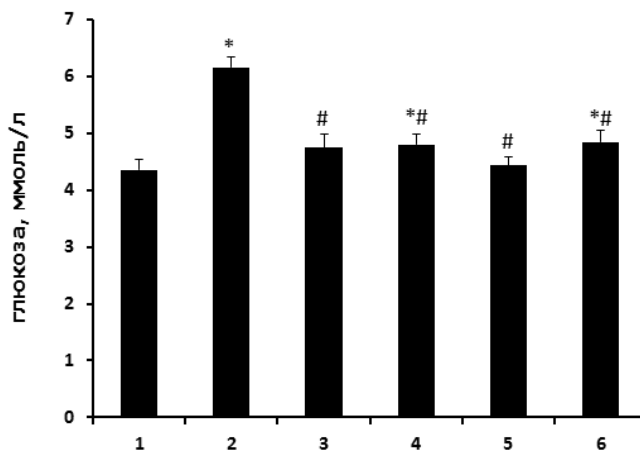


Рис. 1. Концентрація глюкози в сироватці крові щурів за умов ожиріння, викликаного неонатальним введенням глютамату натрію, за умов введення пробіотичних штамів ($3,2 \cdot 10^{10}$ КУО/кг) ($n=10$ в кожній групі, $M \pm m$): 1 – інтактні щури; 2 – контрольні щури з ожирінням; 3 – ожиріння + *Bifidobacterium animalis* VKL і VKB та *Lactobacillus casei* MVB-7280 (1:1:2); 4 – ожиріння + *Bifidobacterium animalis* VKL; 5 – ожиріння + *Bifidobacterium animalis* VKB; 6 – ожиріння + *Lactobacillus casei* MVB-7280. * $p < 0,05$ – порівняно з інтактними щурами, # $p < 0,05$ – порівняно з контрольними щурами з ожирінням

Оцінка рівня інсуліну при введенні монопробіотиків показала зменшення цього показника на 17,6% ($p < 0,05$) в групі щурів, яким вводили *Bifidobacterium animalis* VKL, на 15,0% ($p < 0,05$) при введенні *Bifidobacterium animalis* VKB та 26,0% ($p < 0,05$) при введенні

Lactobacillus casei MVB-7280 порівняно з контрольними тваринами з ожирінням (рис. 2). При цьому досягнення рівня інтактних щурів при застосуванні моноштамних пробіотиків не спостерігали.

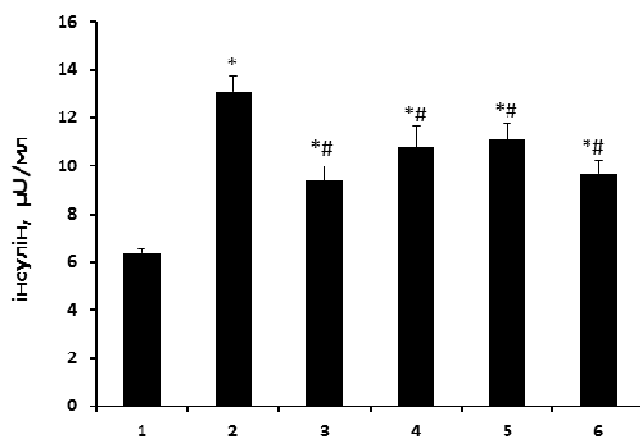


Рис. 4.2. Концентрація інсуліну в сироватці крові щурів за умов ожиріння, викликаного неонатальним введенням глютамату натрію, за умов введення пробіотичних штамів ($3,2 \cdot 10^{10}$ КУО/кг) ($n=10$ в кожній групі, $M \pm m$): 1 – інтактні щури; 2 – контрольні щури з ожирінням; 3 – ожиріння + *Bifidobacterium animalis* VKL і VKB та *Lactobacillus casei* MVB-7280 (1:1:2); 4 – ожиріння + *Bifidobacterium animalis* VKL; 5 – ожиріння + *Bifidobacterium animalis* VKB; 6 – ожиріння + *Lactobacillus casei* MVB-7280. * $p < 0,05$ – порівняно з інтактними щурами, # $p < 0,05$ – порівняно з контрольними щурами з ожирінням

За умов застосування комбінованого пробіотика *Bifidobacterium animalis* VKL і VKB та *Lactobacillus casei* MVB-7280 (1:1:2) рівень інсуліну зменшувався на 28,1% ($p < 0,05$) порівняно зі щурами з ожирінням.

Вплив даного пробіотика був найсильнішим серед досліджуваних, хоча показник вмісту інсуліну не досягав рівня інтактних щурів (рис. 2).

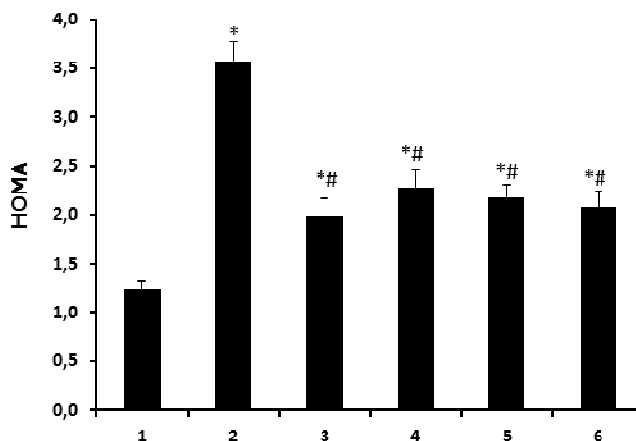


Рис. 4.3. Індекс інсулінорезистентності HOMA у щурів за умов ожиріння, викликаного неонатальним введенням глутамату натрію, за умов введення пробіотичних штамів ($3,2 \cdot 10^{10}$ КУО/кг) ($n=10$ в кожній групі, $M \pm m$): 1 – інтактні щури; 2 – контрольні щури з ожирінням; 3 – ожиріння + *Bifidobacterium animalis* VKL і VKB та *Lactobacillus casei* MVB-7280 (1:1:2); 4 – ожиріння + *Bifidobacterium animalis* VKL; 5 – ожиріння + *Bifidobacterium animalis* VKB; 6 – ожиріння + *Lactobacillus casei* MVB-7280. * $p < 0,05$ – порівняно з інтактними щурами, # $p < 0,05$ – порівняно з контрольними щурами з ожирінням

Індекс інсулінорезистентності HOMA був на 36,5% ($p < 0,05$) меншим при введенні *Bifidobacterium animalis* VKL, на 39,1% ($p < 0,05$) при введенні *Bifidobacterium animalis* VKB та 41,9% ($p < 0,05$) при введенні *Lactobacillus casei* MVB-7280 в порівнянні з контрольними тваринами з ожирінням (рис. 3). Введення трьохітанного пробіотику *Bifidobacterium animalis* VKL і VKB та *Lactobacillus casei* MVB-7280 (1:1:2) призводило до зменшення індексу інсулінорезистентності HOMA на 44,4% ($p < 0,05$) порівняно зі щурами з ожирінням, що свідчить про найсильніший вплив комбінованого пробіотику на даний показник. Проте застосування пробіотиків не відновлювало індекс HOMA до значень інтактних щурів.

Підсумовуючи результати впливу пробіотичних штамів на вуглеводний обмін за умов ожиріння, можна зробити висновок про ефективний вплив пробіотиків на вміст глюкози, рівень інсуліну та індекс інсулінорезистентності HOMA. Пробиотичні штами знижували ці показники, проте відновлення до рівня інтактних тварин не реєстрували. Параметри вуглеводного обміну у щурів з ожирінням свідчать про розвиток інсулінорезистентності у тварин та діабету II типу. Застосування пробіотиків запобігало розвитку даного патологічного процесу та підтримувало нормальну чутливість до інсуліну тканин, що відображає індекс інсулінорезистентності. Найсильніший вплив на вказані показники здійснював комбінований пробіотик з трьох штамів *Bifidobacterium animalis* VKL і VKB та *Lactobacillus casei* MVB-7280 (1:1:2). Це може свідчити про синергетичний ефект дії пробіотичних штамів, коли ефект їх суми більший, ніж ефекти окремих штамів.

Висновок. Отримані результати свідчать про ефективність застосування пробіотичних штамів біфідобактерій та лактобацил для попередження розвитку цукрового діабету 2 типу, асоційованого з ожирінням та нормалізацію вуглеводного обміну. В роботі підтверджений більш сильний терапевтичний ефект комбінованих пробіотиків на основі декількох пробіотичних штамів.

Список використаної літератури

1. Kharroubi A. T. Diabetes mellitus: the epidemic of the century. / A. T. Kharroubi, H. M. Darwish // World journal of diabetes. – 2015. – Vol. 6, No. 6. – P. 850–867.

2. Bhattarai M. D. Three patterns of rising type 2 diabetes prevalence in the world: need to widen the concept of prevention in individuals into control in the community. / M. D. Bhattarai // JNMA; journal of the Nepal Medical Association. – Vol. 48, No. 174. – P. 173–9.

3. Body mass index and heart failure among patients with type 2 diabetes mellitus. / W. Li, P. T. Katzmarzyk, R. Horswell[et al.] // Circulation. Heart failure. – 2015. – Vol. 8, No. 3. – P. 455–63.

4. Prevalence of type 1 and type 2 diabetes among children and adolescents from 2001 to 2009. / D. Dabelea, E. J. Mayer-Davis, S. Saydah[et al.] // JAMA. – 2014. – Vol. 311, No. 17. – P. 1778–86.

5. Wong J. Morbidity and mortality in young-onset type 2 diabetes in comparison to type 1 diabetes: where are we now? / J. Wong, M. Constantino, D. K. Yue // Current diabetes reports. – 2015. – Vol. 15, No. 1. – P. 566.

6. Phillips A. A comparison of the effects of aerobic and intense exercise on the type 2 diabetes mellitus risk marker adipokines, adiponectin and retinol binding protein-4. / A. Phillips, C. Cobbald // International journal of chronic diseases. – 2014. – Vol. 2014. – P. 358058.

7. An analysis of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (ppar-gamma 2) pro12ala polymorphism distribution and prevalence of type 2 diabetes mellitus (t2dm) in world populations in relation to dietary habits. / R. Scacchi, A. Pinto, O. Rickards[et al.] // Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases: NMCD. – 2007. – Vol. 17, No. 9. – P. 632–41.

8. Insulin resistance and liver steatosis in chronic hepatitis c infection genotype 3. / L. Abenavoli, M. Masarone, V. Peta[et al.] // World journal of gastroenterology. – 2014. – Vol. 20, No. 41. – P. 15233–40.

9. Bedinger D. H. Metabolic, anabolic, and mitogenic insulin responses: a tissue-specific perspective for insulin receptor activators. / D. H. Bedinger, S. H. Adams // Molecular and cellular endocrinology. – 2015. – Vol. 415. – P. 143–56.

10. Park K.-Y. Lactobacillus rhamnosus gg improves glucose tolerance through alleviating er stress and suppressing macrophage activation in db/db mice. / K.-Y. Park, B. Kim, C.-K. Hyun // Journal of clinical biochemistry and nutrition. – 2015. – Vol. 56, No. 3. – P. 240–6.

11. Short-term periodic consumption of multiprobiotic from childhood improves insulin sensitivity, prevents development of non-alcoholic fatty liver disease and adiposity in adult rats with glutamate-induced obesity / O. Savcheniuk, N. Kobylak, M. Kondro[et al.] // BMC Complementary and Alternative Medicine. – 2014. – Vol. 14, No. 1. – P. 247.

12. Боднар П. М. Неалкогольна жирова хвороба печінки у хворих на цукровий діабет типу 2: патогенез, діагностика та лікування / П. М. Боднар, Г. П. Михальчишин, Н. М. Кобиляк // Ендокринологія. – 2012. – Vol. 17, No. 1. – P. 94–101.

13. Oida K. Plasma lipoproteins of monosodium glutamate-induced obese rats. / K. Oida, T. Nakai, T. Hayashij[et al.] // International journal of obesity. – 1984. – Vol. 8, No. 5. – P. 385–91.

14. Trinder P. Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. / P. Trinder // Journal of clinical pathology. – 1969. – Vol. 22, No. 2. – P. 158–61.

15. Fasting serum insulin and the homeostasis model of insulin resistance (homa-ir) in the monitoring of lifestyle interventions in obese persons. / M. Vogeser, D. König, I. Frey[et al.] // Clinical biochemistry. – 2007. – Vol. 40, No. 13–14. – P. 964–8.

Надійшла до редколегії 02.12.15

И. Лещенко, асп., А. Вирченко, канд. биол. наук, О. Гадилиа, канд. биол. наук, Т. Фалалеева, д-р биол. наук
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина,
Л. Лазаренко, д-р биол. наук
Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, Киев, Украина

ПАРАМЕТРЫ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА ПРИ ГЛУТАМАТ-ИНДУЦИРОВАННОМ ОЖИРЕНИИ У КРЫС В УСЛОВИЯХ КОРРЕКЦИИ ПРОБИОТИЧЕСКИМИ ШТАММАМИ ЛАКТОБАЦИЛЛ И БИФИДОБАКТЕРИЙ

Выявили влияние пробиотических штаммов на инсулинорезистентность, вызванную глутамат-индуцированным ожирением у крыс. Ожирение вызывали путем неонатального введения глутамата натрия (4 мг/г, подкожно) на 2, 4, 6, 8, 10 день жизни. Введение пробиотиков начинали через 4 недели после рождения и продолжали недельными курсами с перерывами в 2 недели. Через 4 месяца у крыс всех групп был проведен анализ содержания глюкозы и инсулина в крови и индекс инсулинорезистентности HOMA. Неонатальное введение глутамата натрия приводит к развитию инсулинорезистентности у крыс 4-х месячного возраста. Периодическое введение комбинированных пробиотиков предупреждало развитие инсулинорезистентности у крыс. Наиболее значительный эффект был комбинированный пробиотик на основе штаммов *Lactobacillus casei* IMVB-7280, *Bifidobacterium animalis* VKL, *Bifidobacterium animalis* VKB. Результаты работы позволяют утверждать об эффективности применения пробиотических штаммов бифидобактерий и лактобацилл для предупреждения развития инсулинорезистентности.

Ключевые слова: ожирение, инсулинорезистентность, сахарный диабет 2 типа, пробиотики.

I. Leshchenko, O. Virchenko, PhD., O. Gadiliya, PhD., T. Falalayeva, DSc.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine,
L. Lazarenko DSc.
Danylo Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, Kyiv, Ukraine

CARBOHYDRATE METABOLISM PARAMETERS UNDER THE GLUTAMATE-INDUCED OBESITY IN RATS AND CONCOMITANT CORRECTION WITH PROBIOTIC STRAINS OF LACTOBACILLI AND BIFIDOBACTERIA

To find out the effect of probiotic strains on insulin resistance induced by glutamate-induced obesity in rats.

Obesity was induced by neonatal administration of monosodium glutamate (4 mg/g, s.c.) at 2, 4, 6, 8, 10-day life. The introduction of probiotics started at the end of 4 week after birth and continued intermittently for 2-week courses. After 4 months, the rats of all groups glucose and insulin levels and insulin resistance index HOMA were analyzed. Neonatal administration of monosodium glutamate leads to the development of insulin resistance in rats 4 months of age. The periodic introduction of the combined probiotics prevented the development insulin resistance in rats. The most significant effect was revealed in the group of animals treated with the combined probiotic strains *Lactobacillus casei* IMVB-7280, *Bifidobacterium animalis* VKL, *Bifidobacterium animalis* VKB. The results suggest the effectiveness of the use of probiotic strains of bifidobacteria and lactobacilli to prevent the development of insulin resistance.

Keywords: obesity, insulin resistance, type 2 diabetes, probiotics.

595.44(477)

Є. Сінгаєвський, канд. біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

ДО ВИВЧЕННЯ ФАУНИ ПАВУКІВ (ARACHNIDA, ARANEI) ВОЛОГИХ ВІЛЬШАНИКІВ ЗАПЛАВИ Р. СТУГНА (КИЇВСЬКА ОБЛАСТЬ)

Досліджено видовий склад та відносну чисельність герпетобіонтних павуків вільшаників у долині р. Стугна, виявлено 52 види павуків із 12 родин, виділено домінуючі види. Встановлено, що за кількістю видів переважає родина *Linyphiidae* – 16 (28,8%), а за відносною щільністю екземплярів переважають павуки з родини *Lycosidae* – 52,8%. Виявлено домінування одразу трьох видів: *Piratula hygrophila* – 20% усієї кількості особин, *Pardosa alacris* – 19,9%, *Pachygnatha listeri* – 17,8%. Максимальні значення динаміки видового різноманіття (31 вид), та динамічної щільності павуків (80 екз./100 пастко-діб) зафіксовано у третій декаді травня. Основну частину населення павуків становлять мезофільні види – 39 (75%).

Ключові слова: герпетобіонтні павуки, фауна павуків, річка, видове різноманіття.

Вступ. Видовий склад павуків Лісостепової зони все ще залишається найменш дослідженим серед інших фізико-географічних зон України. Це безпосередньо стосується і південної частини Київської області. Літературні дані що до павуків даного регіону нечисельні [4, 5, 6, 7]. Зокрема, вільшаники, які являють собою періодично затоплювані, перезволожені біотопи зі специфічним набором рослинності та особливим набором гігрофільних видів павуків, залишаються маловивченими. Так, для вільшаників українського Лісостепу відомо, принаймні, 9 видів павуків з родини *Linyphiidae*, з яких лише 2 види вказуються саме для вільшаників Київської області [2, 3]. Автор даних робіт для збору матеріалу не використовував ґрунтові пастки Барбера, а користувався методом ручного збору павуків та просіюванням підстилки. Нашими дослідженнями, за допомогою методу ґрунтових пасток отримано матеріал, який суттєво розширює дані про видовий склад павуків вільшаників південної частини Київської області. Отримані дані можуть бути використані при складанні регіональних фауністичних списків та кадастрів.

Об'єкти та методи досліджень. Збір матеріалу здійснено методом ґрунтових пасток Барбера у кількос-

ті 10 штук, розташованих у лінію, інтервал між пастками 10 м. У якості пасток обрано пластикові ємності об'ємом 0,5 дм³ з отвором діаметром 8,7 см. У ролі консерванту використано 2–4% розчин формаліну з додаванням невеликої кількості рідкого мила для нейтралізації поверхневого натягу рідини. Дослідний стаціонар встановлено на території вільшаника у заплаві р. Стугна (Київська обл., Васильківський р-н., окол. с. Погреби; географічні координати: 50°8'23.58" Пн; 30°26'32.52" Сх). Період експозиції тривав з 28.03. до 22.05.2010. За даний час відпрацьовано 550 пастко-діб та зібрано матеріал у кількості 1089 екземплярів статевозрілих павуків. Згідно класифікації Т. Саутвуда, за ступенем представленості у матеріалі статевозрілих особин того чи іншого виду, використано наступні категорії: рецеденти – ≤5%, 5,1–10% – субдомінанти, 10,1–25% – домінянти, >25% – супердомінанти [9]. Матеріал зберігається у колекції автора.

Вільшаникам притаманна типова для заплави деревно-чагарникова рослинність. Формується у широких і плескатих притерасних зниженнях, в умовах сильного перезволоження переважно проточними водами, багатими на кисень та розчинені поживні речовини. ґрунти мокрі, перегнійно-мулуваті, торф'яні, торф'яно-глейові,

навесні та у час сильних злив сильно обводнені, у середньолітній період рівень ґрунтових вод може знижуватися до 1 м. Зімкненість крон 0,8. Деревостан двоярусний: у першому ярусі вільха чорна (*Alnus glutinosa* L.), у другому – види верб (*Salix fragilis* L. та ін.), в'яз гладкий (*Ulmus laevis* Pall.). Кущовий ярус заповнений частіше ожиною (*Rubus caesius* L.), іноді крушиною ламкою (*Frangula alnus* Mill.). Травостій не багатий видами, плямистий, пов'язаний з пристовбурними мікропідвищеннями або купинами і складений типовими гігро- та гелофітами, а також деякими нітрофітами: теліптерис болотний (*Thelypteris palustris* Schott), півники болотні (*Iris pseudacorus* L.), вербозілля звичайне (*Lysimachia vulgaris* L.), гравілат річковий (*Geum rivale* L.), кропива дводомна (*Urtica dioica*), хміль звичайний (*Humulus lupulus* L.) та ін. Проективне покриття травостою 70–90%.

Вільхово-осокова група асоціацій вільшняків характеризується тривалим весняним затопленням та літнім рівнем ґрунтових вод не нижче 60 см. Багате мінеральне живлення. Домінують у травостої осока побережна (*Carex riparia* Curtis), осока гостровидна (*C. acutiformis* Ehrh.), несправжньосмикавцева (*C. pseudocyperus* L.) та ін., калюжниця болотна (*Caltha palustris* L.) [1].

Результати та їх обговорення. Нетривалість експозиції пасток на дослідному стаціонарі зумовлена щільною рослинністю на місцевості. З початком літнього періоду тут встановлюється щільний, важкопрохідний рослинний покрив, що значно ускладнює збір матеріалу. Висока та щільна трав'яниста рослинність знижує ефективність застосування ґрунтових пасток, та ускладнює їх візуальний пошук. Тому, у третій декаді травня, було прийнято рішення про згорання дослідної ділянки. За таких умов малоефективними також є застосування методики косіння ентомологічним сачком, за допомогою якої збирають павуків трав'яного ярусу [8], та ручний збір з підстилки. Через вищезгадані об'єктивні природні чинники, цілорічні дослідження сезонної динаміки активності та змін у видовому складі населення павуків таких біотопів є досить складним завданням.

У результаті досліджень, із застосуванням пасток Барбера, для герпетобію вільшаника виявлено 52 види павуків що належать до 12 родин (табл.1). За кількістю видів значно переважає родина Linyphiidae – 16 (або 28,8% від загального числа виявлених видів). Родина Lycosidae представлена 10 видами (19,2%), значно меншою кількістю видів представлена родина Gnaphosidae – 6 (11,5%). До складу родини Thomisidae увійшло 5 видів (9,4%), по 3 види (5,7%) увійшло до складу родин Hahnidae, Tetragnathidae та Theridiidae. Представленість решти родин у зборах є менш значною, по 2 (3,8%) та 1 виду (1,9%). Всі виявлені види належать до типових мешканців герпетобію.

Найбільшою кількістю екземплярів у зборах представлена родина Lycosidae – 52,8%, на другому місці за кількістю особин Tetragnathidae – 18,3%. Родина Linyphiidae за представленістю лише на третьому місці з 16% від усього зібраного матеріалу, а представники родини Liocranidae складають у зборах лише 4,6%, частка решти 8 родин у зборах становить загалом 8,3%.

У структурі населення герпетобіотних павуків вологого вільшаника домінантами є одразу три види. На частку гігрофільного виду *Piratula hygrophila* припадає 20% усієї кількості особин, *Pardosa alacris* нараховує у зборах 19,9% (обидва представники родини Lycosidae). Частку виду *Pachygnatha listeri* у зборах становить 17,8%. Субдомінантом виступає *Trochosa terricola* частка цього виду у герпетобії даного біотопу становить 9,72%. Вищезгаданим чотирьом видам павуків належить частка у 67,43% від усіх зібраних особин. До рецедентних видів можна віднести *Agroeca brunnea* – 4,5%, *Walckenaeria alticeps* – 4,4% та *Glyphesis servulus* – 3,67%. Частка решти видів у наших зборах коливається від 2,2% до 0,09%.

Найвище значення динаміки видового різноманіття відмічено у третій декаді травня – 31 вид, найменше, у другій декаді квітня – 16 видів. Найвищий показник динамічної щільності павуків зафіксовано також у третій декаді травня – 80 екз./100 пастко-діб, що співпадає з піком динаміки видового різноманіття.

Незважаючи на високий рівень зволоженості, частка гігрофільних видів у герпетобії вільшаника відносно невелика, їх 12 (23,1% від зареєстрованої кількості видів): *Bathypantes nigrinus*, *Dicymbium nigrum*, *G. servulus*, *Panamomops mengei*, *Pachygnatha clercki*, *P. listeri*, *Pardosa amentata*, *P. prativaga*, *P. hygrophilus*, *Dolomedes fimbriatus*, *Antistea elegans* та *Ozyptila trux*. Основну частину населення павуків становлять мезофільні види – 39 (75%), які відмічені нами у більш сухих лісових біотопах, розташованих на узвишші долини р. Стугна. Відносно, висока частка представників родини Tetragnathidae обумовлена присутністю у зборах значної кількості особин мезофільного виду *P. listeri*. Це не є типовим для інших біотопів. У більш сухих, мезофільних біотопах долини р. Стугна частка представників родини Tetragnathidae несуттєва і складає менше 1%, а на частку Lycosidae тут припадає біля 37,2% [7]. З приведених даних помітно, що умови з підвищеним рівнем вологості є сприятливими для *P. listeri*, що проявляється у збільшенні щільності популяції даного виду.

Порівнюючи домінантний склад населення павуків підстилкового ярусу вільшаника з нашими дослідженнями у герпетобії мезофільного штучного ялиново-дубовому лісу [7], виявлено суттєві відмінності як у видовій структурі, так і у співвідношенні кількісної представленості цих видів (рис. 1). Наприклад, домінуючі гігрофільні види *P. hygrophilus* та *P. listeri* не були виявлені у герпетобії ялиново-дубового лісу взагалі. Інший мезофільний домінуючий вид павуків-вовків *P. alacris*, відзначається значно більшою динамічною щільністю особин у вільшанику ніж у ялиново-дубовому лісі – 19,9% та 7,39% відповідно. На частку мезофільних видів, що домінують у герпетобії ялиново-дубового лісу (*T. terricola* – 29,2% та *W. alticeps* – 24,6%) у вільшанику демонструють значно нижчу динамічну щільність, відповідно – 9,72% та 4,4%. *T. flavipes* взагалі не був виявлений у герпетобії вільшаника.

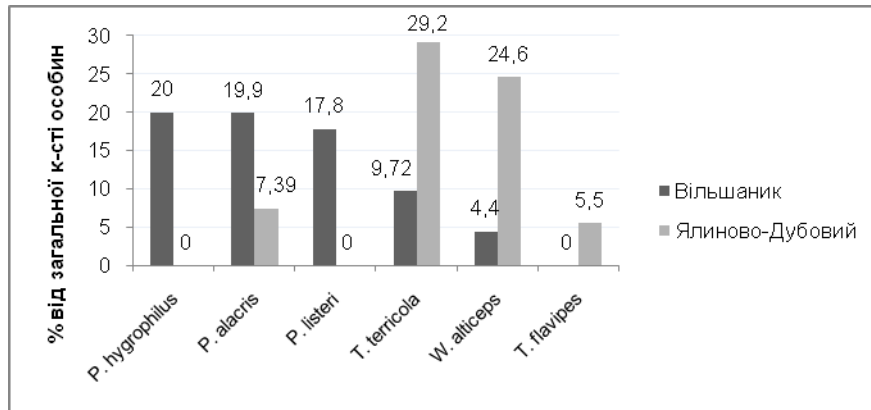


Рис. 1. Співвідношення комплексу домінуючих герпетобіотних видів вільшанику та мезофільного штучного мертвопокривного ялиново-дубового лісу

Таблиця 1. Видовий склад та відносна чисельність герпетобіотних павуків вільшанику заплави річки Стугна

Родина	Вид	Особини	%
Theridiidae	<i>Asagena meridionalis</i> (Kulczyński, 1894)	1	0,09%
	<i>Robertus arundineti</i> (O.P.-Cambridge, 1871)	1	0,09%
	<i>Robertus lividus</i> (Blackwall, 1836)	1	0,09%
Linyphiidae	<i>Bathypantes nigrinus</i> (Westring, 1851)	18	1,65%
	<i>Centromerus sylvaticus</i> (Blackwall, 1841)	2	0,18%
	<i>Ceratinella brevis</i> (Wider, 1834)	16	1,47%
	<i>Dicymbium nigrum</i> (Blackwall, 1834)	2	0,18%
	<i>Diplostyla concolor</i> (Wider, 1834)	17	1,56%
	<i>Glyphesis servulus</i> (Simon, 1881)	40	3,67%
	<i>Micrargus herbigradus</i> (Blackwall, 1854)	4	0,37%
	<i>Microneta viaria</i> (Blackwall, 1841)	4	0,37%
	<i>Nereine clathrata</i> (Sundevall, 1830)	4	0,37%
	<i>Nereine montana</i> (Clerck, 1757)	5	0,46%
	<i>Pelecopsis menzei</i> (Simon, 1884)	8	0,73%
	<i>Tapinocyba insecta</i> (L. Koch, 1869)	2	0,18%
	<i>Trichoncus affinis</i> Kulczyński, 1894	1	0,09%
	<i>Walckenaeria alticeps</i> (Denis, 1952)	48	4,40%
	<i>Walckenaeria nudipalpis</i> (Westring, 1851)	2	0,18%
Tetragnathidae	<i>Pachygnatha clercki</i> Sundevall, 1823	4	0,37%
	<i>Pachygnatha degeeri</i> Sundevall, 1830	1	0,09%
	<i>Pachygnatha listeri</i> Sundevall, 1830	194	17,80%
Lycosidae	<i>Alopecosa aculeata</i> (Clerck, 1757)	2	0,18%
	<i>Alopecosa pulverulenta</i> (Clerck, 1757)	4	0,37%
	<i>Pardosa agrestis</i> (Westring, 1861)	1	0,09%
	<i>Pardosa alacris</i> (C.L. Koch, 1833)	217	19,91%
	<i>Pardosa amentata</i> (Clerck, 1757)	1	0,09%
	<i>Pardosa paludicola</i> (Clerck, 1757)	1	0,09%
	<i>Pardosa pratigata</i> (L. Koch, 1870)	2	0,18%
	<i>Pirattula hygrophila</i> (Thorell, 1872)	218	20,00%
	<i>Trochosa ruficollis</i> (De Geer, 1778)	24	2,20%
	<i>Trochosa terricola</i> Thorell, 1856	106	9,72%
Pisauridae	<i>Dolomedes fimbriatus</i> (Clerck, 1757)	22	2,02%
	<i>Pisaura mirabilis</i> (Clerck, 1757)	2	0,18%
Zoridae	<i>Zora spinimana</i> (Sundevall, 1833)	1	0,09%
Hahnidae	<i>Antistea elegans</i> (Blackwall, 1841)	2	0,18%
	<i>Hahnina nava</i> (Blackwall, 1841)	2	0,18%
	<i>Hahnina ononidum</i> Simon, 1875	1	0,09%
Liocranidae	<i>Agroeca brunnea</i> (Blackwall, 1833)	49	4,50%
	<i>Liocranoeca striata</i> (Kulczyński, 1882)	1	0,09%
Clubionidae	<i>Clubiona lutescens</i> Westring, 1851	10	0,92%
Corinnidae	<i>Phrurolithus festivus</i> (C.L. Koch, 1835)	1	0,09%
Gnaphosidae	<i>Drassyllus lutetianus</i> (L. Koch, 1866)	1	0,09%
	<i>Drassyllus pusillus</i> (C.L. Koch, 1833)	16	1,47%
	<i>Haplodrassus cognatus</i> (Westring, 1861)	4	0,37%
	<i>Haplodrassus silvestris</i> (Blackwall, 1833)	1	0,09%
	<i>Zelotes electus</i> (C.L. Koch, 1839)	1	0,09%
	<i>Zelotes subterraneus</i> (C.L. Koch, 1833)	2	0,18%
Thomisidae	<i>Ozyptila praticola</i> (C.L. Koch, 1837)	3	0,28%
	<i>Ozyptila trux</i> (Blackwall, 1846)	7	0,64%
	<i>Xysticus cristatus</i> (Clerck, 1757)	1	0,09%
	<i>Xysticus luctator</i> L. Koch, 1870	8	0,73%
	<i>Xysticus ulmi</i> (Hahn, 1831)	3	0,28%
Сума екземплярів		1089	100%

Як видно з вищенаведеного розподілу домінуючих видів, вологі умови біотопу вільшаників виступають фактором, що сприяє підвищенню динамічної щільності таких гігрофільних видів як: *P. hygrophilus*, *P. alacris* та *P. listeri*. Для інших видів (*T. terricola*, *W. alticeps*) фактор перезволоженості середовища мешкання є менш сприятливим. Ймовірно вони проникають сюди з розташованих поруч мезофільних біотопів під час весняної реактивації статевозрілих особин після зимової діапаузи, та міграціями пов'язаними з репродуктивною активністю.

За літературними даними [2, 3] для вільшаників лісостепу України відомо принаймні 9 видів павуків: *Aphileta misera*, *Centromerus arcanus*, *C. levitarsus*, *Diplocephalus permixtus*, *Maro minutus*, *Tenuiphantes cristatus*, *T. tenuis*, *Walckenaeria vigilax*. Серед вказаних раніше видів нашими дослідженнями виявлено лише один вид – *G. servulus*. Таким чином, у результаті власних досліджень та літературних даних, для вільшаників Лісостепової зони України на сьогодні відомо 60 видів павуків що належать до 12 родин. Зважаючи на досить коротку тривалість проведених польових зборів, наведені у публікації дані щодо видового складу та екологічних особливостей населення герпетобіонтних павуків вільшаників лісостепу України, слід вважати первинними і такими що потребують подальшого вивчення із застосуванням різноманітних методик збору матеріалу.

Висновки. Вперше на території Київської частини Лісостепу досліджено павуків підстилкового ярусу біотопу вільшаників із застосуванням методу ґрунтових пасток Барбера. У результаті виявлено 52 види павуків з 12 родин. Частка гігрофільних видів у зборах становить 23,1%. Враховуючи літературні дані, загалом, для даного типу біотопів Лісостепової зони України відомо принаймні 60 видів павуків. Визначено домінуючу групу видів павуків герпетобіо вільшаника та порівняно її з домінуючими видами герпетобіо штучного мезофільно-го ялиново-дубового лісу. Найвищий показник динаміки

видового різноманіття відмічено у третій декаді травня – 31 вид; показник динамічної щільності у цей же період найвищий – 80 екз./100 пастко-діб. У подальших дослідженнях павуків вільшаників трав'яного ярусу необхідно застосовувати інші методики збору матеріалу у тому числі і ручний збір.

Список використаних джерел

1. Геоботаничне районування Української РСР. – К.: Наукова думка, 1977. – 306 с.
2. Гнелица В.А. Фауна пауков семейства Linyphiidae лесостепной зоны Украины: 1. Подсемейство Linyphiinae. / В.А. Гнелица // Известия Харьковского энтомологического общества. – 2000. – Т.8, вып.1. – С. 132–139.
3. Гнелица В.А. Фауна пауков семейства Linyphiidae (Aranei) лесостепной зоны Украины. 2. Подсемейство Erigoninae. / В.А. Гнелица // Известия Харьковского энтомологического общества – 2002. – Т.9, вып.2. – С. 193–201.
4. Евтушенко К.В. К изучению пауков (Aranei) агроценозов Киевской области. / К.В. Евтушенко, Т.М. Дымань, С.А. Яценко // Украинский энтомологический журнал. – 2012. – №1 (4). – С. 16–25.
5. Лукьянов Н. Список пауковъ (Araneina, Pseudoscorpionina и Phalangina) водящихся въ Юго-Западномъ крае и смежныхъ с нимъ губернияхъ Россіи. / Н. Лукьянов // Записки Киевского общества естествоиспытателей – 1897. – Т.14., вып.2. – С. 1–19.
6. Перелешина В.И. Материалы для фауны пауков западных и юго-западных частей Восточной Европы. / В.И. Перелешина // Ежегодный журнал зоологического музея АН СССР. – 1930. – Т.31, Вып.3–4. – С. 359–391.
7. Сингаевський Є.М. Павуки-герпетобіонти (Arachnida, Aranei) штучних ялиново-дубових лісових насаджень долини річки Стугна. / Є.М. Сингаевський, П.Я. Кіпочицький // Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка: серія Біологія. – 2011. – Т.58. – С. 39–41.
8. Чернов Ю.И. Об использовании энтомологического кошения как метода количественного учета беспозвоночных – обитателей травяного покрова. / Ю.И. Чернов, Л.В. Руденская // Зоологический журнал. – 1970. – Т.49, вып. 1. – С. 137–144.
9. Southwood T.R.E. Ecological methods / T.R.E. Southwood. – London: Chapman and Hall, 1978. – 253 p.

Надійшла до редколегії 10.10.15

Е. Сингаевский, канд. биол. наук
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

К ИЗУЧЕНИЮ ФАУНЫ ПАУКОВ (ARACHNIDA, ARANEI) ОЛЬШАНИКОВ ПОЙМЫ р. СТУГНА (КИЕВСКАЯ ОБЛАСТЬ)

Исследован видовой состав и относительная численность герпетобіонтных пауков ольшаников в долине р. Стугна, обнаружено 52 вида пауков из 12 семейств, определены доминирующие виды. Установлено, что по числу видов доминирует семейство Linyphiidae – 16 (28,8%), а по относительной численности экземпляров доминируют пауки из семейства Lycosidae – 52,8%. Отмечено доминирование сразу троих видов: *Piratula hygrophila* – 20% общего количество особей, *Pardosa alacris* – 19,9%, *Pachygnatha listeri* – 17,8%. Максимальные значения динамики видового разнообразия (31 вид) и динамической плотности пауков (80 экз./100 ловушко-суток) зафиксированы в третьей декаде мая. Основу населения пауков составляют мезофильные виды – 39 (75%).

Ключевые слова: герпетобіонтные пауки, фауна пауков, река Стугна, видовое разнообразие.

Е. Singaevskiy, PhD.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

TO THE STUDY OF SPIDER FAUNA (ARACHNIDA, ARANEI) OF THE ALDER GROVE IN THE STUHNA RIVER VALLEY (KIEV REGION)

The species composition and relative number herpetobiont spiders of the alder grove in the valley of Stugna River was investigated. 52 spider species from 12 families was noted, the dominant species was identified. Was established that spider family Linyphiidae is dominate by the species number – 16 (28.8%) and the spiders of the family Lycosidae is dominate by the relative density of specimens – 52.8%. The simultaneous dominance of the three species is revealed: *Piratula hygrophila* – 20% of the total number of individuals, *Pardosa alacris* – 19.9% and *Pachygnatha listeri* – 17.8%. The maximum value of the dynamics of species diversity (31 species), and dynamic density of spiders (80 ind. / 100 trap-days) was recorded in the third decade of May. The main part of the population of spiders is presented by mesophilic species – 39 (75%).

Keywords: herpetobiont spiders, spider fauna, river, species diversity.

УДК 582.24+582.28

Ю. Щербакова, асп., В. Джаган, канд. біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

ПЕРШІ ВІДОМОСТІ ПРО ГРИБИ ТА ГРИБОПОДІБНІ ОРГАНІЗМИ ПРИРОДНОГО ЗАПОВІДНИКА "ДРЕВЛЯНСЬКИЙ"

Представлено результати першого мікологічного обстеження природного заповідника "Древлянський". Аналіз таксономічної структури показав, що 36 зареєстрованих видів є представниками 32 родів, 24 родин, 14 порядків, 9 класів та 3 відділів. Три ідентифікованих види, *Trichobelonium kneiffii* (Wallr.) J. Schröt., *Ramsbottomia asperior* (Nyl.) Benkert & T. Schumach. та *Exidia recisa* (Ditmar) Fr. є новими для мікобіоти України. Окремо варто зазначити, що знахідки видів роду *Ramsbottomia* W.D. Buckley для території України досі не були зареєстровані.

Ключові слова: мікобіота, таксономічна структура, нові знахідки, природний заповідник "Древлянський".

Вступ. Природний заповідник "Древлянський", загальною площею 30872,84 га, було створено Указом Президента України № 1038/2009 від 11 грудня 2009 р. на території Народицького району у північно-східній частині Житомирської області. Територія заповідника охоплює значні площі лісів, розділених масивами перелогів, віднесених до зони безумовного відселення внаслідок значних рівнів радіоактивного забруднення, спричиненого катастрофою на Чорнобильській АЕС [6]. Наявність значних площ лісів у заповіднику передбачає високе видове різноманіття мікобіоти на цій території. Проте дані щодо грибів та грибоподібних організмів заповідника в доступній нам літературі були відсутні.

Метою роботи було встановити видовий склад грибів та грибоподібних організмів в межах території природного заповідника "Древлянський".

Матеріали і методи. Збір зразків було здійснено влітку 2014 року на території природного заповідника "Древлянський". Під час збору матеріалів фіксувалася інформація про місцезнаходження зразка, субстрат, на якому він зростає, асоційовані організми (за наявності) та рослинне угруповання. Камеральна обробка зібраного матеріалу проводилася згідно загальноприйнятих методик мікологічних досліджень. Для вивчення морфологічної структури та анатомічних особливостей використовували світловий мікроскоп Olab XY-B2T. Систематична структура виявлених видів подана у відповідності з класифікацією, наведеною у базі даних Міжнародної Мікологічної Асоціації "Mycobank" [8].

Ступінь флористичної новизни ідентифікованих видів визначався відповідно до бази даних веб-сайту Грибів України [7] та інших джерел, пов'язаних з поширенням грибів на території України [1-5].

Результати та їх обговорення. В результаті першого мікологічного дослідження, проведеного в природному заповіднику "Древлянський", було виявлено 36 видів грибів та грибоподібних організмів, що належать до 32 родів, 24 родин, 14 порядків, 9 класів та 3 відділів. З урахуванням літературних даних [1-5, 7], 14 видів виявились новими для Житомирської області, серед них три – *Trichobelonium kneiffii* (Wallr.) J. Schröt., *Ramsbottomia asperior* (Nyl.) Benkert & T. Schumach. та *Exidia recisa* (Ditmar) Fr., вперше зареєстровані на території України.

Нижче наведено анований систематичний список ідентифікованих видів грибів та грибоподібних організмів. Символом (*) позначено види, які на території Житомирської області зареєстровані вперше, символом (#) – нові для мікобіоти України види.

FUNGI

ASCOMYCOTA

Orbiliomycetes

Orbiliales

Orbiliaceae

**Orbilina delicatula* (P. Karst.) P. Karst. – околиці с. Лозниця, сосновий ліс, 04.07.2014. На деревині *Populus alba* L.

Leotiomycetes

Helotiales

Dermateaceae

Mollisia cinerea (Batsch) P. Karst. – околиці с. Лозниця, сосновий ліс, 04.07.2014. На деревині *P. alba*.

#*Trichobelonium kneiffii* (Wallr.) J. Schröt. – околиці с. Хутір-Росохівське, берег р. Уж, 04.07.2014. На рештках *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud.

Hyaloscyphaceae

Dasyscyphus virgineus (Batsch) Gray – околиці с. Хутір-Росохівське, берег р. Уж, 04.07.2014; околиці с. Ганівка, берег р. Лозниця, 05.07.2014. На рештках *Typha latifolia* L. та *T. angustifolia* L.

Rhytismatales

Rhytismataceae

Lophodermium pinastri (Schrad.) Chevall. – околиці с. Лозниця, сосновий ліс, 04.07.2014. На минулорічній хвої *Pinus sylvestris* L.

Pezizomycetes

Pezizales

Pezizaceae

**Peziza violacea* Pers. – околиці с. Ганівка, біля джерела "Древлянське", післяпожежна ділянка соснового лісу, 05.07.2014. На ґрунті.

Pyronemataceae

Anthrachia melaloma (Alb. & Schwein.) Boud. – околиці с. Ганівка, біля джерела "Древлянське", післяпожежна ділянка соснового лісу, 05.07.2014. На ґрунті.

#*Ramsbottomia asperior* (Nyl.) Benkert & T. Schumach. – околиці с. Ганівка, заболочена ділянка, 05.07.2014. На глинистому ґрунті.

**Scutellinia crinita* (Bull.) Lambotte – околиці с. Ганівка, заболочена ділянка, 05.07.2014. На деревині.

Sordariomycetes

Xylariales

Xylariaceae

**Hypoxylon fuscum* (Pers.) Fr. – околиці с. Лозниця, сосновий ліс, 04.07.2014. На деревині.

BASIDIOMYCOTA

Agaricomycetes

Agaricales

Amanitaceae

**Amanita fulva* Pers. – околиці с. Лозниця, сосновий ліс, 04.07.2014. На ґрунті.

Agaricaceae

Macrolepiota procera (Scop.) Singer – околиці с. Лозниця, сосновий ліс, 04.07.2014. На ґрунті.

Lycoperdon perlatum Pers. – околиці с. Лозниця, сосновий ліс, 04.07.2014. На ґрунті.

Inocybaceae

Crepidotus variabilis (Pers.) P. Kumm. – околиці с. Лозниця, сосновий ліс, 04.07.2014. На гілці *Pinus sylvestris* L.

Marasmiaceae

Marasmius oreades (Bolton) Fr. – околиці с. Лозниця, сосновий ліс, біля дороги, 04.07.2014. На ґрунті, серед трав'янистих рослин.

M. rotula (Scop.) Fr. – околиці с. Лозниця, сосновий ліс, 04.07.2014. На підстилці.

Pluteaceae

Pluteus cervinus (Schaeff.) P. Kumm. – околиці с. Лозниця, сосновий ліс, 04.07.2014. На трухлявому пні.

Schizophyllaceae

Schizophyllum commune Fr. – околиці с. Хутір-Росохівське, берег р. Уж, 04.07.2014. На деревині.

Tricholomataceae

***Resupinatus applicatus** (Batsch) Gray – околиці с. Лозниця, сосновий ліс, біля озера, 04.07.2014. На поваленому стовбурі.

Boletales

Tapinellaceae

Tapinella atrotomentosa (Batsch) Sutara – околиці с. Лозниця, сосновий ліс, 04.07.2014. На трухлявому пні.

Polyporales

Polyporaceae

Fomes fomentarius (L.) Fr. – околиці с. Ганівка, 05.07.2014. На поваленому стовбурі *Betula pendula* Roth.

Lentinus tigrinus (Bull.) Fr. – околиці с. Ганівка, заболочена ділянка, 05.07.2014. На поваленому стовбурі.

***Polyporellus tuberaster** (Jacq. ex Pers.) Pilát – околиці с. Ганівка, заболочена ділянка, 05.07.2014. На поваленому стовбурі.

Trametes gibbosa (Pers.) Fr. – околиці с. Лозниця, заболочена ділянка біля дамби, 0.07.2014. На трухлявому пні.

T. hirsuta (Wulfen) Lloyd – околиці с. Лозниця, заболочена ділянка біля дамби, 04.07.2014. На деревині.

Trichaptum biforme (Fr.) Ryvarden – околиці с. Лозниця, сосновий ліс, біля озера, 04.07.2014. На поваленому стовбурі *Betula pendula* Roth.

Russulales

Auriscalpiaceae

***Auriscalpium vulgare** Gray – околиці с. Лозниця, сосновий ліс, біля озера, 04.07.2014. На шишці *Pinus sylvestris* L.

Russulaceae

***Russula vinosa** Lindblad – околиці с. Ганівка, біля джерела "Древлянське", післяпожежна ділянка соснового лісу, 05.07.2014. На ґрунті.

R. virescens (Schaeff.) Fr. – околиці с. Ганівка, біля джерела "Древлянське", післяпожежна ділянка соснового лісу, 05.07.2014. На ґрунті.

Stereaceae

Stereum hirsutum (Willd.) Pers. – околиці с. Лозниця, сосновий ліс, біля озера, 04.07.2014. На поваленому стовбурі.

Dacrymycetes

Dacrymycetales

Dacrymycetaceae

***Dacrymyces capitatus** Schwein. – околиці с. Лозниця, сосновий ліс, біля озера, 04.07.2014. На гілці *Pinus sylvestris* L.

Tremellomycetes

Tremellales

Exidiaceae

Exidia glandulosa (Bull.) Fr. – околиці с. Ганівка, біля джерела "Древлянське", післяпожежна ділянка соснового лісу, 05.07.2014. На гілці.

***E. recisa** (Ditmar) Fr. – околиці с. Ганівка, біля джерела "Древлянське", післяпожежна ділянка соснового лісу, 05.07.2014. На деревині.

Exobasidiomycetes

Exobasidiales

Exobasidiaceae

Exobasidium vaccinii (Fuckel) Woronin – околиці с. Лозниця, сосновий ліс, 04.07.2014. На листках *Vaccinium myrtillus* L.

PROTOZOA

MYXOMYCOTA

Myxomycetes

Liceales

Reticulariaceae

Lycogala epidendrum (L.) Fr. – околиці с. Лозниця, сосновий ліс, біля озера, 04.07.2014. На деревині.

Stemonitales

Stemonitidaceae

***Diachea leucopodia** (Bull.) Rostaf. – околиці с. Лозниця, заболочена ділянка біля дамби, 04.07.2014. На минулорічному листі.

Висновки. Таким чином, на території заповідника "Древлянський" нами було виявлено 36 видів грибів та грибоподібних організмів з відділів Ascomycota, Basidiomycota та Myxomycota. З числа цих видів три – *Trichobelonium kneiffii*, *Ramsbottomia asperior* та *Exidia recisa* – вперше наводяться для території України. Окремо варто зазначити, що види роду *Ramsbottomia* для території України досі були не відомі. Попередні відомості про мікобіоту дослідженого заповідника дають всі підстави для очікування тут високого видового різноманіття грибів, отже подальші цілеспрямовані дослідження цих організмів є актуальними та перспективними.

Список використаної літератури

1. Визначник грибів України. Т.2. Аскоміцети / [С.Ф. Морочковський, М.Я. Зерова, З.Г. Лавітська, М.Ф. Сміцька]. – Київ : Наукова думка, 1969. – 518 с.
2. Визначник грибів України. Т.4. Базидіоміцети: Дакриміцетальні, Тремелальні, Аурикуляріальні, Сажковидні, Іржасті / [М.Я. Зерова, С.Ф. Морочковський, Г.Г. Радзівський, М.Ф. Сміцька]. – Київ : Наукова думка, 1971. – 316 с.
3. Зерова М.Я. Визначник грибів України. Т.5., книга 2. Базидіоміцети: Болетальні, Стробіломіцетальні, Трихоломотальні, Ентоломатальні, Русульальні, Агарикальні, Гастероміцети / М.Я. Зерова, П.Є. Сосін, Г.Л. Рожненко – Київ : Наукова думка, 1979. – 566 с.
4. Зерова М.Я. Визначник грибів України. Т.5., книга 1. Базидіоміцети: Екзобазидіальні, Афілофоральні, Кантарелальні / М.Я. Зерова, Г.Г. Радзівський, С.В. Шевченко. – Київ : Наукова думка, 1972. – 240 с.
5. Сміцька М.Ф. Флора грибів України. Оперкулярні дискіоміцети / М.Ф. Сміцька – К : Наукова думка, 1980. – 223 с.
6. Фіторізноманіття заповідників і національних природних парків України. Ч.1. Біосферні заповідники. Природні заповідники / [Андрієнко Т.М., Антосяк Т.М., Бойко Т.О. та ін.]; за ред. В.А. Онищенко і Т.Л. Андрієнко. – Київ : Фітосоціоцентр, 2012. – 406 с.
7. Fungi of Ukraine [Електронний ресурс] / Andrianova T.V., Dudka I.O., Hayova V.P., Heluta V.P., Ing B. et al. / Ed. D.W. Minter & I.O. Dudka. – 2006. – Режим доступу: www.cybertruffle.org.uk/ukrafung/rus.
8. MycoBank. Fungal Databases Nomenclature and Species Banks Online Taxonomic Novelties Submission [Електронний ресурс] / Stalpers J., Cock A. – 1999. – Режим доступу: <http://www.mycobank.org>.

Надійшла до редколегії 05.11.15

Ю. Щербаков, асп., В. Джаган, канд. биол. наук

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

ПЕРВЫЕ ДАННЫЕ О ГРИБАХ И ГРИБОПОДОБНЫХ ОРГАНИЗМАХ ПРИРОДНОГО ЗАПОВЕДНИКА "ДРЕВЛЯНСКИЙ"

Представлено результаты первого микологического обследования природного заповедника "Древлянский". В результате анализа таксономической структуры было установлено, что 36 зарегистрированных видов являются представителями 32 родов, 24 семейств, 14 порядков, 9 классов и 3 отделов. Три идентифицированных вида, *Trichobelonium kneiffii* (Wallr.) J. Schröt., *Ramsbottomia*

asperior (Nyl.) Benkert & T. Schumach. u *Exidia recisa* (Ditmar) Fr. – нові для мікобіоти України. Також стоїть відзначити, що знахідки видів роду *Ramsbottomia* W.D. Buckley на території України раніше не були відзначені.

Ключеві слова: мікобіота, таксономічна структура, нові знахідки, природний заповідник "Древлянський".

Yu. Shcherbakova, PhD-student., V. Dzhegan, PhD
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

THE FIRST DATA ABOUT FUNGI AND FUNGUS-LIKE ORGANISMS OF DREVLANSKIY NATURE RESERVE

The information about the first mycological investigation in the Drevlanskiy Nature Reserve is provided. The analysis of taxonomic structure of the collected species has shown that 36 registered species are representatives of 32 genera, 24 families, 14 orders, 9 classes and 3 phylums. Three species, *Trichobolonium kneiffii* (Wallr.) J. Schröt., *Ramsbottomia asperior* (Nyl.) Benkert & T. Schumach. and *Exidia recisa* (Ditmar) Fr., are new for Ukraine. It should be emphasized that the species of *Ramsbottomia* W.D. Buckley has not been reported in Ukraine previously.

Key words: fungal diversity, taxonomic structure, new records, Drevlanskiy Nature Reserve.

УДК 599.4:591.521

А. Білушенко, канд. біол. наук
Інститут еволюційної екології НАН України, Київ

ВИКОРИСТАННЯ РУКОКРИЛИМИ СХОВИЩ В УМОВАХ ЦЕНТРАЛЬНОГО ЛІСОСТЕПУ УКРАЇНИ

В роботі проаналізовано літературні та оригінальні дані щодо 182 сховищ 12 видів рукокрилих в умовах Центрального Лісостепу України з них оригінальні дані складають 77 сховищ для семи видів. Показано, що всі види рукокрилих досліджуваного регіону певною мірою схильні до синантропії, але більшість видів тяжіють до сховищ природного походження. Для двох видів, *P. kuhlii* та *E. serotinus*, не прослідковується зв'язок зі сховищами природного походження.

Ключові слова: рукокрилі, сховища, антропогенна трансформація, синантропія.

Вступ. Рукокрилі є невід'ємним компонентом будь-якої наземної екосистеми, а наявність сховищ, особливо природного походження є найважливішим фактором успішного існування їх популяцій. Праця, в яких містяться дані відносно використання сховищ рукокрилими в умовах Центрального Лісостепу України досить небагато. В основному сюди належать лише фрагментарні короткі повідомлення [2,13,17]. Особливої уваги заслуговує праця К. А. Сологору [16] в якій коротко вказані знайдені сховища з рукокрилими на території Середнього Придніпров'я, куди входить територія досліджень.

Робіт відносно чіткої класифікації сховищ для даної систематичної групи тварин теж не багато. Класифікацію сховищ антропогенного походження для даної систематичної групи тварин знаходимо в працях польських дослідників [19], де автори класифікують їх за: матеріалом, з якого була збудована кривля споруди; матеріалом з якого збудована споруда; розміром будівлі; ступенем заселення людьми. Деяка інформація відносно розподілу рукокрилих за природними сховищами проаналізовано в роботі українських дослідників [6]. Характеристику літніх сховищ подано в роботі російських дослідників [10].

Дана публікація присвячена знахідкам сховищ і особливостям використання їх рукокрилими в умовах Центрального Лісостепу України на прикладі Черкаської та Київської областей.

Метою роботи було встановити закономірності використання рукокрилими сховищ природного та антропогенного походження в умовах Центрального Лісостепу України.

Матеріал і методи. Збір оригінального матеріалу проводили в період з 2005 по 2015 рік на території Центрального Лісостепу. Пункти знаходження сховищ рукокрилих наведені нижче.

Черкаська область: 1) м. Черкаси (багатоповерхова забудова, та зелені зони міста (рекреаційно-паркові території)); 2) м. Сміла (територія малоповерхових та багатоповерхових забудов, зелені зони міста, приватний сектор); 3) с. Цвіткове, Городищенського району (ур. "Дубове" та будівля Цвітківської загальноосвітньої школи); 4) с. Сокирне, Черкаського району (сосновий

ліс); 5) с. Червона слобода, Черкаського району (територія малої багатоповерхової забудови); 6) Лісовий масив "Холодний Яр", Чигиринський район, біля с. Мельники; 7) Канівський природний заповідник (Правий берег та острів Зміїний); 8) Національний дендрологічний парк "Софіївка" м. Умань; 9) Виграївський ліс, Корсунь-Шевченківський район (в дуплі сосни); 10) с. Ковалиха Смілянського району (будівля місцевої восьмирічної школи); 11) с. Велика Яблунівка, Смілянського району (дупло клена ясенелистого та будівля місцевої церкви); 12) с. Мала Яблунівка, Смілянського району (Будівля котельні, що знаходиться біля загальноосвітньої школи). Київська область: 13) парк пам'ятка садово-паркового мистецтва (ППСПМ) "Феофанія".

Пошук сховищ проводили маршрутним методом, реєструючи соціальні звуки, вечірній виліт, ранкове роніння, наявність посліду в порожнинах старих дерев, під дахом будівель, тощо. Більшість знахідок стосується літнього періоду.

Дослідженнями різною мірою було охоплено усі можливі місця перебування рукокрилих – від населених пунктів та міського середовища закінчуючи лісовими біотопами. Всього виявлено 77 сховищ для семи видів рукокрилих: нічниця водяної (*Myotis daubentonii* Kuhl 1817), вечірниця рудої (*N. noctula*), пергача пізнього (*Eptesicus serotinus* Shreber 1774), нетопира пігмея (*Pipistrellus pygmaeus* Schreber 1774), лісового (*P. nathusii* Schreber 1774), середземноморського (*P. kuhlii* Kuhl 1817) та вуханя австрійського (*Plecotus austriacus* Fisher 1829). Усі знайдені сховища було розділено на сховища природного та антропогенного походження.

Для узагальнення даних в роботі було використано відомості з літературних джерел, що стосуються дослідженого регіону за період 1968-1998 р.р. За цей період було відмічено 105 сховищ за даними різних авторів [2, 5, 8, 13-17].

Результати та їх обговорення. На території Центрального Лісостепу України встановлено перебування 13 видів рукокрилих [4]. Нами на території дослідженого регіону впродовж 2005-2015 виявлено 77 сховищ для семи видів рукокрилих. Всього за сумою оригінальних

та літературних даних для аналізу доступними є дані відносно 182 сховищ (табл.1).

Серед них 64,3 % складають сховища природного типу і 35,7 % сховища антропогенного походження.

Для аналізу використання різними видами рукокрилих сховищ природного і антропогенного походження всі відомі нам матеріали наведені у вигляді гістограм, що наводить нам співвідношення знахідок видів у цих сховищах. Гістограму побудовано для восьми видів рукокрилих. До розподілу не ввійшли види (*Pl. austriacus*, *N. leisleri* Kuhl 1817, *Myotis nattereri* Kuhl 1817, *Pipistrellus pygmaeus* / *P. pipistrellus*), для яких знайдено менше ніж чотири сховища. На зображеній

гістограмі види ранжовані за зростанням частоти заселення ними сховищ природного походження (рис.1).

Встановлено, що місцеві види, які здатні існувати на відкритих стаціях особливо тісно пов'язані з антропогенними ландшафтами. Всі відомі нам виводкові колонії нетопира середземноморського (*P. kuhlii*), пергача пізнього (*E. serotinus*), деякі місця знаходження рудої вечірниці (*N. noctula*) були пов'язані з будівлями (від житлових споруд до господарських приміщень). Два з вище перерахованих видів – *P. kuhlii* та *E. serotinus* – є типовими синантропами, що використовують сховища виключно антропогенного походження (рис. 1).

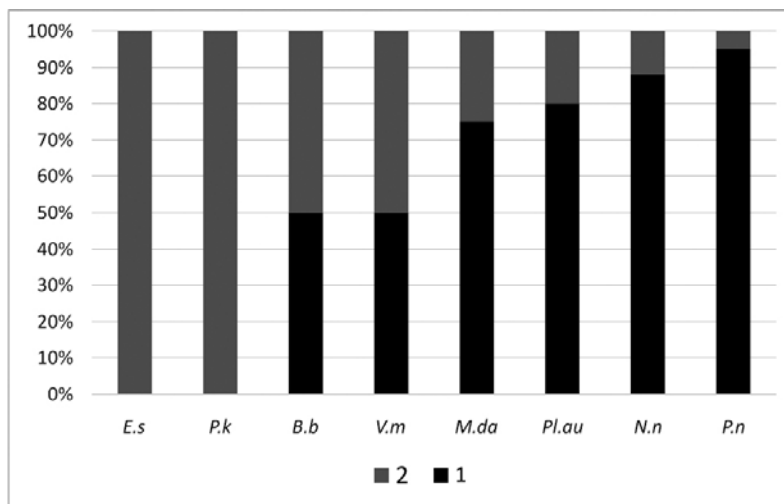


Рис. 1 Співвідношення кількості сховищ природного походження (1) та сховищ антропогенного походження (2), що використовують рукокрилі в умовах Центрального Лісостепу України

M.da – нічниця водяна (*Myotis daubentonii*), *N.n* – вечірниця руда (*Nyctalus noctula*),

E.s – пергач пізній (*Eptesicus serotinus* Shreber 1774), *P.n* – лісовий (*P. nathusii*), *P.k* – середземноморський (*P. kuhlii*), *V.m* – лилик двоколірний (*V. murinus*), *Pl.au* – вухань звичайний (*Pl. auritus*), *B.b* – широковух європейський (*B. barbastellus*)

Факти використання цими двома видами сховищ природного походження (дупла дерев) не підтверджуються результатами наших досліджень. Сховища антропогенного походження для цих двох видів, скоріш за все, є більш зручними, ніж природні і краще відповідають їх потребам. Відомо, що щільність популяцій *E. serotinus* в районі Карпат, та в інших гірських районах свідчить про гірське походження виду, а пристосованість до життя в будівлях вважається вторинним явищем [1]. Цілоком імовірно, що будівлі для цих двох видів замінюють їм природні сховища.

Руда вечірниця (*N. noctula*) є фоновим видом в населених пунктах, садово-паркових та лісових ландшафтах, і має відносно високу екологічну пластичність стосовно вибору сховищ. Причиною такої пластичності цілком можна вважати трансформацію природного середовища, враховуючи що даний вид вважається типовим дендрофільним представником серед рукокрилих. В умовах Центрального Лісостепу України було відмічено знаходження цього виду і в сховищах антропогенного походження, більшість з яких (80%) виявлені в осінньо-зимовий період (табл.1). Це свідчить про те, що сховища такого типу для рукокрилих цього виду служать місцями зимівлі, які задовольняють їх екологічні потреби, в першу чергу з боку мікроклімату. Серед деревних порід в дуплах яких спостерігали заселення цього виду на дослідженій території на 85% переважав дуб черешчатий (*Quercus robur*). Останні 15% приходились на такі деревні породи, як верба біла (*Salix alba*), сосна звичайна (*Pinus sylvestris*), вільха (*Alnus glutinosa*), клен ясенелистий (*Acer negundo*) та осика (*Populus tremula*). Сховища

природного походження для вечірниць відіграють переважно роль літніх місць перебування, де відбувається народження і вигодовування молоді. На території ППСМ "Феофанія" (м. Київ) в дуплах дуба було відмічено три сховища з виводковими колоніями. Зимове поселення цього виду було відмічено в дуплі дуба на рекреаційно господарській території. Свою активність тварини проявляли в періоди різких перепадів температур з початку листопада 2014 року, до першої половини січня 2015 року включно. Це дає підставу нам вважати, що частина популяції цього виду зимує на території парку. Аналогічне явище ми спостерігали в м. Черкаси в цю ж пору (2006-2007 рр) в парку ім. "Першого травня".

Вухань австрійський (*Pl. austriacus*) так само як і вухань звичайний (*Pl. auritus*), селиться невеликими групами або поодинокими особинами. В результаті досліджень відмічено лише дві знахідки *Pl. austriacus* у сховищах виключно антропогенного походження в осінньо-зимовий період. Широковуха європейського (*Barbastella barbastellus* Schreber 1774) в умовах регіону приваблюють сховища як природного [7,14,16], так і антропогенного походження [16].

В країнах Європи про існування видів-двійників нетопира пігмея (*P. pygmaeus*) та нетопира малого (*Pipistrellus pipistrellus* Schreber 1774) вперше стало відомо близько 15 років тому [18]. В місті Городище Черкаської області 25.08.2005 в місцевому парку під корою яблуні виявили одну особину (F, ad), яка тоді була ідентифікована нами, як *P. pipistrellus* без урахування ознак, що дозволяли відрізнити цей вид від виду-двійника нетопира пігмея (*P. pygmaeus*). З 16.07.2010, достовірно було

знайдено ще одне сховище, де перебувала виводкова колонія нетопирів-пігмів (*P. pygmaeus*) (табл. 1). Проте з літературних джерел на території Центрального Лісостепу відомий лише нетопир малий (*P. pipistrellus*) [16].

Тому невідомо якого виду стосується матеріал з літературних джерел: нетопира малого (*P. pipistrellus*) чи нетопира пігмея (*P. pygmaeus*). Слід зазначити, що відносно вибору біотопів цей вид займає проміжне положення між іншими двома видами нетопирів (*P. nathusii* та *P. kuhlii*), тобто його приваблюють природні біотопи але з елементами антропогенних перетворень. Частка знайдених сховищ цього виду серед інших видів найменша (1,4 %). Низьку чисельність *P. pygmaeus* можна пояснити з точки зору можливої конкуренції між ним та *P. kuhlii*. Навіть враховуючи те, що *P. pygmaeus* вважається представником дендрофільної екологічної групи, обидва види проявляють схильність до синантропії. Але, *P. kuhlii* має перевагу, оскільки формує осілі популяції, а *P. pygmaeus* є перлітним [9], що надає можливість першому виду більш продуктивно використовувати простір.

До кінця XX століття були відомі достовірні дані про знаходження лилика двоколірного (*Vespertilio murinus* Linnaeus, 1758) лише у сховищах природного походження [16]. Проте, починаючи з початку XXI ст. з'являється інформація про схильність цього виду до синан-

тропії на території дослідженого регіону [8]. В Європі цей вид (на півночі майже виключно) є мешканцем міського середовища, де селиться в будівлях, про що відомо ще з другої половини XX ст. (Ryberg; Natuschke цит. за [11]). В умовах Поволжя цей вид є наполовину синантропом [10]. Під час проведення обліків зустрічається спорадично майже в усіх біотопах. За сумою зборів серед інших видів його частка становить майже 2%, але нажалі нових даних відносно сховищ для цього виду поки що не відмічали. Лише 27.05.2015 було знайдено одну особину (F ad) в будівлі корпусу №37 на території ППСМ "Феофанія". Але масового скупчення тварин цього виду, яке б вказувало нам на розміщення колонії в будівлі не виявили.

Відомо також про заселення дуплянок для птахів такими видами рукокрилих, як вечірниця мала (*N. leisleri* Kuhl 1817), нічниця війчаста (*M. nattereri*), нетопир лісовий (*P. nathusii*) [2]. Також відмічені випадки поселення рукокрилих в дуплах спільно з сонями [5]. Проте автори нажалі не дають детальної інформації про види.

Розглядаючи класифікацію В. В. Кучерука [12], справжня, або переважна синантропія в умовах дослідженого регіону властива лише для *P. kuhlii* та *E. serotinus*. Всі інші види, що селяться в будівлях в тій чи іншій мірі, відносяться до видів з екологічно обмеженою синантропією.

Таблиця 1. Сховища рукокрилих, які знайдені на території Центрального Лісостепу України (2005 – 2015)

Вид	Природного походження		Сховища антропогенного походження					Всього	%
	Дупла дерев	Інші	Цегляні будівлі	Панельні будівлі	Дерев'яні будівлі	Дуплянки для птахів	Інші		
<i>M.d</i>	1	-	-	-	-	-	-	1	2,5
	2	-	-	-	1	-	-	3	
<i>M.n</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	1,2
	1	-	-	-	-	1	-	2	
<i>N.n</i>	23	-	6	1	-	-	-	30	37,6
	50	-	-	-	-	1	-	31	
<i>N.l</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	0,6
	-	-	-	-	-	1	-	1	
<i>E.s</i>	-	-	5	6	1	-	-	12	11,7
	-	-	3	-	4	-	1	7	
<i>P.pg/P.p</i>	-	1	-	-	-	-	-	1	6,8
	4	1	1	-	4	-	-	10	
<i>P.n</i>	9	-	-	-	-	-	-	9	16,6
	16	1	-	-	-	-	1	18	
<i>P.k</i>	-	-	11	11	-	-	-	22	13,6
	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>V.m</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	2,5
	2	-	1	-	-	1	-	4	
<i>Pl.au</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	3,1
	4	-	1	-	-	-	-	5	
<i>Pl.as</i>	-	-	1	-	-	-	1	2	1,2
	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>B.b</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	2,5
	1	1	-	-	1	-	1	4	
Всього	113	4	28	18	11	4	4	182	100

Примітка: Верхній рядок таблиці – власні дані, нижня – літературні відомості [2, 5, 8, 13-17].

M.da – нічниця водяна (*Myotis daubentonii*), *N.n* – вечірниця руда (*Nyctalus noctula*), *E.s* – негроч пізній (*Eptesicus serotinus* Shreber 1774), *P.pg / P.p* – нетопир пігмей / нетопир карлик (*Pipistrellus pygmaeus / P. pipistrellus*), *P.n* – лісовий (*P. nathusii*), *P.k* – середземноморський (*P. kuhlii*) *Pl.as* – вухань австрійський (*Plecotus austriacus*). *M.n* – нічниця війчаста (*M. nattereri*), *N.l* – вечірниця мала (*N. leisleri*), *V.m* – лилик двоколірний (*V. murinus*), *Pl.au* – вухань звичайний (*Pl. auritus*), *B.b* – широкоух європейський (*B. barbastellus*).

Сховища природного походження – інші (тріщини в старих урвищах, порожнини за відшарованою корою, гнізда ластівок).

В цілому здатність багатьох видів рукокрилих переходити до синантропного способу життя в умовах дослідженого регіону можна розглядати як поступову адаптацію тварин, яка сприяє їх виживанню в умовах трансформації навколишнього природного середовища. Це може свідчити про реальну нестачу сховищ, які відповідали б

їх екологічним потребам. Відомо, що вирубка в лісах і парках старих дерев призводить до зниження чисельності і в першу чергу видового складу рукокрилих [10]. Тому заходи щодо підтримання різноманіття цієї систематичної групи ссавців зараз є досить актуальними, особливо коли лісові масиви Центрального Лісостепу України за-

знають антропогенного впливу. Інакше ми ризикуємо застати поступову деградацію, а в майбутньому й повну втрату дендрофільного комплексу рукокрилих.

Висновки.

З'ясовано, що всі види рукокрилих дослідженої території, певною мірою мають, схильність, до синантропії. Два види нетопир середземноморський (*P. kuhlii*) та пергач пізній (*E. serotinus*) взагалі втратили зв'язок зі сховищами природного типу і поводяться як справжні синантропи. Проте, більшість видів рукокрилих, понад 75 % із вище перерахованих, тягнє до сховищ природного походження. Найяскравіше, це спостерігали у таких видів, як руда вечірниця (*N. noctula*), нетопир лісовий (*P. nathusii*) та вухань бурий (*Pl. auritus*). Це свідчить про достатню важливість таких сховищ, як фактор успішності існування більшості видів цієї систематичної групи. Заселення антропогенних сховищ цими видами свідчить про можливу нестачу природних, які відповідають їх екологічним потребам. Для *N. noctula* сховища антропогенного походження на дослідженій території відіграють роль масових місць зимівлі, а сам вид можна вважати факультативно-перелітним.

Найбільш важливою умовою перебування в регіоні рукокрилих є наявність придатних сховищ природного походження. Саме тому, головним заходом охорони є збереження сховищ такого типу в місцях, де відмічались колонії рукокрилих раніше, брати під охорону на рівні природоохоронного законодавства ділянки лісу, де сконцентровані дупла з тваринами, з метою запобігання санітарних та іншого типу вирубок.

Список використаних джерел

1. Абеленцев В. І. Ряд Рукокрилі або кажани – Chiroptera / В. І. Абеленцев, Б. М. Попов // Фауна України (Ссавці). – К.: Вид-во АН УРСР., 1956 – Т. 1, вип.1. – С.229 – 446.
2. Билецкая М. Г. Применение искусственных убежищ для привлечения рукокрылых / Билецкая М. Г., Лихотоп Р. И., Сологор Е. А. // Материалы по экологии и фаунистике некоторых представителей рукокрылых / Украинское отделение ВТО. – Киев: Ин-т зоол. АН УССР, 1990. – Препр. № 90.4. – С. 5–9.
3. Билушенко А. А. Первая находка ушана серого, *Plecotus austriacus* (Chiroptera, Vespertilionidae), в Черкасской области / А. А. Билушенко // Вестник зоологии. – 2009. – Т. 43. – №2. – с. 120.

4. Билушенко А. А. Рукокрилі (Chiroptera) Центрального Лісостепу України (фауна, екологія, охорона): Автореф. канд. біол. наук: спец. 03.00.08 "Зоологія". – Київ, 2006. – 24 с.

5. Билык Л. И. Биоценоотические связи сонь в лесных экосистемах бассейна среднего Днепра / Л. И. Билык, С. Л. Самарский // Биогеоценологические исследования на Украине: Тезисы докладов III республиканского совещания 18–19 декабря 1984 / Ин-т ботаники АН УССР. – Львов, 1984. – С. 48–49.

6. Годлевська О. В. Сучасний стан рукокрилих фауни України в умовах антропогенної трансформації середовища: Автореф. канд. біол. наук: спец. 03.00.08 "Зоологія". – Київ, 2006. – 23 с.

7. Голуб В. М. Зимовка европейской широкоушки в заповеднике "Холодный Яр" / В. М. Голуб // Вестник зоологии. – 1996. – № 1–2. – с. 72.

8. Загороднюк І. Уточнення щодо кажанів у Бернських списках / Ігор Загороднюк, Володимир Тищенко // Ссавці під охороною Бернської конвенції / Українське Теріологічне товариство НАН України (Праці Теріологічної школи. Вип. 2). – Київ, 1999. – С. 182–184.

9. Загороднюк І. Адвентивна теріофауна України і значення інвазій в історичних змінах фаун та угруповань / І. Загороднюк // Фауна в антропогенному середовищі (Праці Теріологічної школи). – Луганськ, 2006. – Вип. 8. – С. 18–47.

10. Ильин В.Ю. Влияние антропогенного фактора на рукокрылых (Chiroptera: Vespertilionidae) Поволжья / В.Ю.Ильин, Д.Г.Смирнов, Н.М. Яняева // Экология. – 2003. – №2. – С. 134–139.

11. Клауснитцер Б. Экология городской фауны / Б. Клауснитцер. – М.: Мир, 1990. – 246 с.

12. Кучерук В. В. Синантропия – некоторые понятия / В. В. Кучерук // Животные в городе (Мат. науч. прак. конф.). – М, 2000. – С. 112 – 115.

13. Лихотоп Р. И. Новые находки рукокрылых занесенных в красную книгу УССР / Р. И. Лихотоп., Е. А. Сологор // Вестник зоологии. – 1991. – Т. 25. – №1. – с. 87.

14. Ружиленко Н. Фауна кажанів Канівського природного заповідника // Європейська ніч кажанів '98 в Україні / Н. Ружиленко, В. Грищенко, В. Межжерін, О. Цвєлих / Українське Теріологічне товариство НАН України (Праці Теріологічної школи. Вип. 1). – Київ, 1998. – С. 76–79.

15. Ружиленко Н. С. Находки редких видов рукокрылых в Каневском заповеднике / Н. С. Ружиленко, А. Н. Цвєлих // Вестник зоологии. – 1992. – № 1. – с. 57.

16. Сологор Е. А. Эколого-физиологические особенности рукокрылых Среднего Приднестровья: Дис. ... канд. биол. наук: 03.00.08. – Киев, 1973. – 160 с.

17. Сологор К. А. Нічниця війчаста в умовах Середнього Придніпров'я УРСР / К. А. Сологор, С. Л. Самарський // Охорона природи та раціональне використання природних ресурсів: Матеріали конференції і молодих вчених. – Київ: Наукова думка, 1970. – С. 218–219.

18. Jones G. Bimodal echolocation in pipistrelle bats are cryptic species present? / G/ Jones, S.M. Parys // Proc. Royal Society Land., Series B., Biol. Sci. – 1993. – V.251 – P. 119–125.

19. Mazurska K. Bats select buildings in clearing in Bielowieza Primeval Forest / K. Mazurska, I. Ruczynski // Acta Chiropterologica. – 2008. – Vol. 10, N 2. – P. 331–338.

Надійшла до редколегії 30.11.15

А. Билушенко, канд. биол. наук

Институт эволюционной экологии НАН Украины, Киев, Украина

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РУКОКРЫЛЫМИ УБЕЖИЩ В УСЛОВИЯХ ЦЕНТРАЛЬНОЙ ЛЕСОСТЕПИ УКРАИНЫ

В работе проанализированы литературные и оригинальные данные относительно 182 убежищ 12 видов рукокрылых в условиях Центральной Лесостепи Украины, из них оригинальные данные составляют 77 убежищ для семи видов. Показано, что все виды рукокрылых исследуемого региона в определенной мере склонны к синантропии, но большинство видов тяготеют к убежищам естественного происхождения. Для двух видов *P. kuhlii* и *E. serotinus*, не прослеживается связь с убежищами естественного происхождения.

Ключевые слова: рукокрылые, убежища, антропогенная трансформация, синантропы.

A. Bilushenko, PhD.

Institute for evolutionary ecology NAS Ukraine, Kyiv, Ukraine

USE OF SHELTERS BY BATS IN THE CENTRAL FOREST-STEPPE OF UKRAINE

In this paper we analyzed published and original dates about 182 shelters of 12 species of bats in the Central Forest-Steppe of Ukraine, of which the original date 77 shelters for seven species. Analysis of its own data showed that all bats species of studied region in creation extent are prone to sinanthropus, but most of the species are attracted shelters of natural origin. For two species *P. kuhlii* and *E. serotinus* there is no connection with shelters of natural origin.

Key words: bats, shelter, anthropogenic transformation, synanthropes.

УДК 598.288.5:591.555.1

А. Маркова, асп., В. Серебряков, д-р біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ**ПОВЕДІНКОВІ АКТИ ЧОРНОГО ТА СПІВОЧОГО ДРОЗДІВ НА МІСЦЯХ ВОДОПОЮ**

Агресія має важливі наслідки для екологічних процесів та еволюційних стратегій поведінки. Наводяться дані стосовно прояву агресії чорним та співочим дроздами в природних умовах та території з вираженням антропогенним впливом на водопої у гніздовий період, зв'язок з іншими поведінковими актами, їх динаміка зайнятості протягом доби та наявності поруч інших видів птахів. Розглянуто міжвидові та внутрішньовидові контакти дроздів. Досліджено співвідношення агресивних та не агресивних контактів видів.

Ключові слова: поведінка, дрізд чорний, дрізд співочий, міжвидова та внутрішньовидова агресія.

Вступ. В останні роки широко вивчаються в усьому світі питання причин та наслідків агресії серед птахів, їх відмінності на різних територіях, особливо в умовах міста, значення для відносин близьких або конкурентних видів птахів. Більшість таких досліджень базуються на вивченні вокалізації пісні, сигналах агресії, що впливають на успішність гніздового періоду та кормодобувної поведінки. За кордоном багато даних отримано на таких видах птахів як зяблики (*Fringilla coelebs*) [13], мухоловка білошия (*Ficedula albicollis*) [14], мексиканська чечевиця (*Haemorrhous mexicanus*) [18], синиця велика (*Parus major*) [14, 15] та інші. Результати цих досліджень зазвичай вираховуються опосередковано за результатом пошуку гнізд, вимірів особин та їх щільності на території. Ця тема отримала велику увагу у літературі присвяченій і внутрішньовидовій конкуренції [11], але й досі мало вивчена у міжвидовій [22, 19].

Відомо, що напруженість міжвидових відносин знаходиться у прямій залежності від внутрішньовидової агресії існуючих разом видів [3]. Також, міжвидові відносини є асиметричними: один вид частіше ініціює контакти із іншими. Найчастіше прикладом такої асиметрії слугує домінування у конфлікті (агресивному контакті). Подібні дослідження проводилися на прикладі деяких територіальних птахів ряду Passeriformes [6, 7, 8], де було встановлено, що кількість міжвидових контактів є значно більшою за внутрішньовидові [4].

Зрозуміло, що конкуренція серед особин одного виду є спільною через високе перекриття у використанні необхідних ресурсів [21] (кормових об'єктів, місця гнізділлі, схованок тощо). У природних умовах до цієї конкуренції долучаються особини інших видів, що безумовно, підвищує рівень конкуренції та агресивну поведінку, як один з методів конкурентної боротьби [20]. Відомо, що агресія має широке поширення серед тварин, але досі їй приділяється менше уваги ніж іншим формам міжвидової та внутрішньовидової конкуренції, механізми та наслідки її залишаються погано зрозумілими [16, 21].

Агресивні сигнали можуть полегшувати або зменшувати неспецифічну агресію. Тим не менш, вибір якоїсь агресивної взаємодії також буде впливати на агресивні сигнали. При чому сила та направленість цих двох джерел добору не є еквівалентними [23]. Ті самі сигнали можуть бути використані в одному вигляді, щоб вказати на низький рівень загрози, а в іншому на високий рівень загрози. При цьому особини різних видів відрізняються за характеристиками, що передбачають результат конкуренції [17] <http://beheco.oxfordjournals.org/content/25/3/520.full> – ref-34.

Безпосередньо направлених спостережень саме у природних умовах за відносинами та агресією лісових птахів, на відміну від птахів аридних біотопів, не втручаючись, ще мало. Хоча, наприклад, процес дослідження поведінкових реакцій птахів одночасно та разом значно полегшується у гніздовий період, оскільки водопій стає особливо часто необхідним місцем перебування для птахів [2].

Метою даної роботи було дослідити міжвидові (далі МВ) та внутрішньовидові (далі ВВ) реакції агресії дрозда співочого (*Turdus philomelos* C.L. Brehm, 1831) та дрозда чорного (*Turdus merula* L. 1758), не використовуючи звукове підкріплення, що підвищило б агресивність виду, а лише за результатом безпосередньої взаємодії особин у природних умовах, та, для порівняння, на антропогенно навантаженій території. Також автори спробували встановити наявність зв'язку агресії із фізіологічними потребами, що визначалися за результатом актів на водопої, наявністю та чисельністю інших видів та їх агресивністю, як безпосередній фактор агресії дроздів.

Матеріали та методи. Матеріалами для написання роботи слугували дані спостережень, що проводилися у Канівському природному заповіднику (далі КПЗ) Черкаської області 30.05-30.06 2010, 21.05-15.06 2012 та 1.06-24.06 2014 на місці водопою в яру Мокрий на території садиби. Місце було вибрано з урахуванням відсутності інших джерел водопою. Територія дослідження має природоохоронний статус і характеризується низьким антропогенним тиском. Для максимального зменшення фактору турбування дослідником птахів, було вжито наступні заходи: спостереження проводили з далекої відстані за допомогою бінокля, спостерігач був одягнений у маскувальний одяг, для місця розташування спостерігача було вибрано природне заглиблення на поверхні ґрунту, додатково замаскувавши його невеликим кущем. Загальна тривалість спостережень у КПЗ становила 324 години. За період дослідження зафіксовано 3898 міжвидових і внутрішньовидових контактів та проаналізовано 1166 появ дрозда співочого, та 529 МВ і ВВ контактів та проаналізовано 237 появ дрозда чорного.

Інше місце де проводилося спостереження – це дендрологічний парк "Олександрія" НАН України у м.Біла Церква, де спостереження проводилися 21.06-28.06 2012. Місце було вибрано з урахуванням наявності лісу, водопою та малої зустрічі людей. Загальна тривалість спостережень становила 54 години. За період дослідження було зафіксовано 271 МВ і ВВ контактів та 221 поява дрозда співочого а також 217 МВ і ВВ контактів та 158 появ дрозда чорного.

Спостереження проводилися з 5:00 до 21:00. Для вивчення міжвидової поведінки, використовувалися загально прийняті етологічні методи "тотального спостереження" та "суцільного протоколювання" [8] із модифікаціями автора для спостереження за птахами у природі. Вивчаючи динаміку активності на водопої, згідно загальноприйнятих етологічних методик [1] було розділено можливі варіанти поведінкових актів птахів на водопої: пиття води, пошук та споживання кормових об'єктів, купання та догляд за оперенням.

За прояв агресивної поведінки було прийнято вважати акт коли два птахи скорочували дистанцію, що їх розділяла, явно змінюючи свою поведінку у порівнянні з попереднім відривом часу, демонстрацію готовності до нападу та безпосередньо сутички [5]. Для розрахунку

критичної дистанції (відстані на якій птах проявляє агресію), територію водопою було поділено на квадрати $1 \times 1 \text{ м}^2$, кожен квадрат був позначений дерев'яною паличкою на відстані 1 м одна від одної вздовж напрямку руху джерела.

До аналізу було прийнято дані, зібрані з урахуванням однакових погодних умов. Статистична обробка матеріалу проведена математичними методами з використанням пакету програм Microsoft Excel та STATISTICA 7.0. Використовували методи перевірки на нормальність та наявність кореляції (лінійна кореляція Пірсона).

Результати та їх обговорення.

Дрізд співочий. На території КПЗ співочий дрізд реагує агресивно на 22 видів із 30, з котрими був у МВ контакті. До цих видів належать: вільшанка (*Erithacus rubecula*), дрізд співочий (*Turdus philomelos*), дрізд чорний (*Turdus merula*), синиця велика (*Parus major*), синиця блакитна (*Parus caeruleus*), гаїчка болотяна (*Parus palustris*), зяблик (*Fringilla coelebs*), костогриз (*Coccothraustes coccothraustes*), шпак (*Sturnus vulgaris*), берестянка звичайна (*Hippolais icterina*), кропив'янка чорноголова (*Sylvia atricapilla*), мухоловка білошия (*Ficedula albicollis*), мухоловка сіра (*Muscicapa striata*), щиглик (*Carduelis carduelis*), зеленяк (*Chloris chloris*), підкоришник звичайний (*Certhia familiaris*), повзик (*Sitta europaea*), дятел звичайний (*Dendrocopos major*), дятел малий (*Dendrocopos minor*), дятел середній (*Dendrocopos medius*), вивільга (*Oriolus oriolus*), кропив'янка садова (*Sylvia borin*), вівчарик жовтобровий (*Phylloscopus sibilatrix*), вівчарик-ковалик (*Phylloscopus collybita*), волове око (*Troglodytes troglodytes*), чиж (*Carduelis spinus*), рибалочка (*Alcedo atthis*), мухоловка мала (*Ficedula parva*), мухоловка строката (*Ficedula hypoleuca*).

Вважається, що частота МВ конфліктів у змішаних популяціях співмірна або перевищує частоту ВВ агресивних взаємин [3]. Дана закономірність була підтверджена для співочого дрозда. Загальна частка МВ контактів становила 82.51 % усіх взаємодій виду. Відносне число МВ конфліктів до ВВ – характеризує важливість МВ відносин. Співвідношення МВ та ВВ агресії становить 293 / 103 (73.99 % / 26.01 %). Заглиблюючись у питання безпосереднього прояву ВВ та МВ агресії, встановлено, що велике значення у гніздовий період співочий дрізд приділяє ВВ взаєминам, та імовірно, встановленню ВВ ієрархії. Так 26.55 % ВВ контактів виду становили агресивні взаємодії. В той же час, 16 % випадків агресії спостерігалися у МВ контактах. Співочий дрізд часто виступав ініціаторами агресивних контактів в досліджуваному лісовому угрупованні. При чому агресія була направлена на особин, що вже знаходилися на водопої, до часу прибуття дрозда у 1.44 рази частіше, ніж до птахів, що прилітали після нього.

На території дендрологічного парку "Олександрія" високий рівень агресії співочого дрозда також підтвердився. Так, серед 17 видів із якими контактував вид, на 9 була наявна реакція агресії. До цих видів належать: вільшанка, дрізд співочий, синиця велика, зяблик, костогриз, кропив'янка чорноголова, мухоловка білошия, щиглик, соловейко східний (*Luscinia luscinia*).

Співочий дрізд, приймає активну участь у МВ взаємодіях, що становлять 86,75% усіх контактів. Внутрішньовидові агресивні контакти складають лише 13.25 % усіх випадків агресії, що якраз вказує на набагато більше значення МВ взаємин, та більш лояльне відношення до особин свого виду в умовах антропогенного середовища. Заглиблюючись у питання про значення реакції агресії всередині виду та до інших птахів, ми помітили, що кількість випадків ВВ із агресією/ без агресії та МВ із агресією/ без агресії, превалює на бік відсутності агресії

(ВВ 19.95 % / 80.95 % та МВ 5.45 % / 94.55 % відповідно). Такі данні підтверджують та доповнюють же існуючу думку, про меншу агресивність птахів у містах, хоча не виключають підвищення агресивних сигналів при звуковій вокалізації птахів міста [13]. Але наявність МВ агресії, вказує на її значення у взаєминах популяції, навіть при умові її прояву внаслідок порушення індивідуальної критичної дистанції (на території дендропарку не досліджувалася). Співочі дрозди ініціювали більше агресивних контактів на птахів, що прилітали вже після них у 1.88 рази, ніж до особин, що вже знаходилися на водопої.

Зазвичай при визначенні критичної дистанції для лісових птахів, більше значення приділяється вивченню відстані до кормових об'єктів чи між розміщенням гнізд. Ми фіксували **критичну відстань** між масовими видами на водопої у КПЗ, на якій співочий дрізд виявляє агресію до свого та інших видів. Так, критична відстань у ВВ агресії для свого виду найчастіше була від 50 до 100 см. Найближча відстань становила 20 см, та передбачала присутність молодих особин поруч із статевозрілими. У МВ контактах вона варіювала: для кропив'янки чорноголової – 40 см, синиці великої – 20-80 см (відмічено кілька випадків на відстані 2 м), вільшанки – 2 м (кілька випадків – 20 см для молодих особин), зяблика – 40 см. **Зворотна критична відстань** на співочого дрозда у зяблика була – 40 см, кропив'янки чорноголової – 55 см, костогриза – 15-40 см, дрозда чорного – 30-50 см. Отримані дані вказують не лише на числові параметри критичних відстаней, а й на значущість кожного з видів, один відносно іншого, у гніздовий період на водопої при безпосередній близькості. Чим більша критична відстань між видами – тим вищий рівень даного виду, як потенціального конкурента за наявний ресурс.

Динаміка активності прильоту дрозда співочого на водопої. Серед поведінкових актів на водопої у гніздовий період основним виступає купання (рис.1.). Зафіксовано два денний піки купання о 12:00 та 14:00 та вечірній о 20:00. Максимум значення водопою для виду у якості джерела води для пиття припадає на 6:00 (ранковий пік), невеликий денний об 11:00 та два вечірні піки о 18: 00 та 20:00. Пошук кормових об'єктів на місці водопою спостерігали з 9:00 до 12:00 та у вечірні години – 19:00 та 20:00.

Порівнюючи загальну кількість птахів, що перебували на водопої протягом доби та кількість дрозда співочого серед них, встановлено значущий кореляційний зв'язок із випадками агресії ($r=0.583$; $p<0.05$). Із кількістю особин свого виду наявна висока кореляція ($r=0.896$; $p<0.01$), що знову ж вказує на високий рівень внутрішньовидової агресії у гніздовий період та наявну міжвидову агресію, що було представлено вище. Окрім цього, показник агресії корелює із загальним рівнем агресії усіх присутніх птахів на водопої ($r=0.676$; $p<0.05$). Також зафіксовано зв'язок із основними поведінковими актами на водопої: високий зв'язок із купанням ($r=0.870$; $p<0.01$) та значущий із пошуком корму ($r=0.604$; $p<0.05$). Показник агресивної поведінки не був пов'язаний із потребою в поповненні дефіциту води в організмі ($r=0.098$; $p>0.05$ – відсутній зв'язок).

Даний розподіл зв'язку агресії із потребами на водопої пояснюється їх біологічною значущістю із місцем дослідження: протягом доби основною метою прильоту на водопої є зволоження пір'яного покриву. Таким чином ми спостерігаємо явний зв'язок прояву агресії із потребою у купанні, що у свою чергу є основною причиною появи виду на водопої ($r=0.947$; $p<0.01$ – високий кореляційний зв'язок), та значущості піддослідної території, як місця із конкурентно важливим ресурсом.

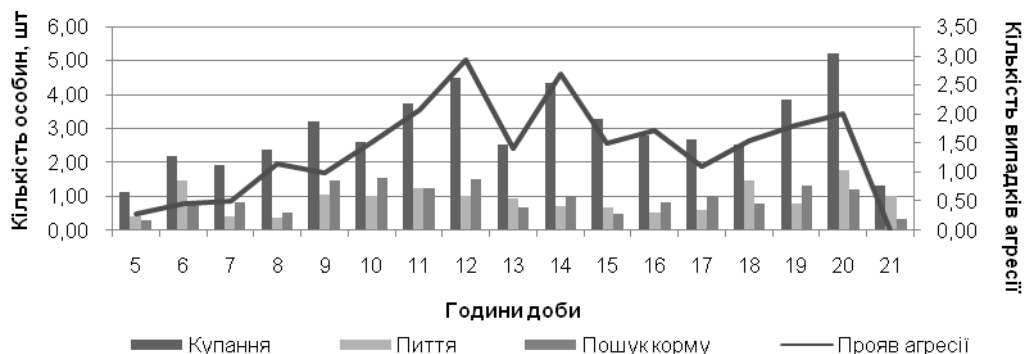


Рис. 1. Динаміка зайнятості дрозда співочого на місці водопою протягом доби у Канівському природному заповіднику

На території дендрологічного парку "Олександрія" серед поведінкових актів на водопой у гніздовий період основними є купання та пиття (рис.2.). Два ранкові піки купання виражені о 8:00 та 10:00 годинах ранку, денний о 13:00 та вечірній о 20:00 годинах. Ми спостерігали невеликий ранковий пік пиття води о 7:00, виражений

денний о 13:00 та максимальний за день вечірній пік о 20:00. Пошук кормових об'єктів на місці водопою поступово зростає починаючи із невеликого ранкового піку (7:00-8:00), більшого денного (13:00-14:00), та виражений вечірній о 20:00. Усі три поведінкові акти на водопой були тісно пов'язані між собою.



Рис. 2. Динаміка зайнятості дрозда співочого на місці водопою протягом доби у дендрологічному парку "Олександрія" НАН України

У дендропарку "Олександрія", як території із наявним антропогенним впливом, для співочих дроздів прояв агресії характеризується повністю достовірним сильним зв'язком із кількістю особин свого виду та основними поведінковими актами на водопой (табл.1). Крім того, пік агресії, що припадає на 20:00 вечора, може бути пов'язаний із зміною кількості людей у парку, що дає змогу птахам потрапити на водопій без ризику турбування лю-

дьми та безпосередньо зустрітися, рівнем звукового навантаження або іншими антропогенними факторами, котрі ми не фіксували під час свого дослідження. У то ж час, не встановлено жодного зв'язку із прив'язкою агресії до зміни кількості усіх птахів на території спостереження та загальною агресивністю цих птахів, на відміну від заповідної території, де цей зв'язок є.

Таблиця 1. Значення коефіцієнту кореляції між зафіксованими актами поведінки

Параметри, що перевіряються на зв'язок	Показник кореляції (r)	Достовірність
Кількість дрозда співочого та їх агресії	0.770	p<0.01
Агресія та купання	0.820	p<0.01
Агресія та пиття	0.759	p<0.01
Агресія та кормодобувна поведінка	0.711	p<0.01
Агресія дрозда співочого до загальної кількості птахів	0.074	p<0.05
Агресія дрозда співочого до загальної агресії птахів	0.014	p<0.05

Отже, зайнятість у купанні на території КПЗ характеризується поступовим зростанням аж до денного піку, в той час, як в умовах дендропарку дрозду співочому характерна наявність чітких ранкового та денного максимумів. Те саме стосується й пошуку корму. По-друге, на території дендропарку, на відміну від КПЗ, наявний зсув на пізніші години доби максимуми зайнятості питтям.

Вплив присутності масових видів території на агресивність. Ми зробили спробу встановити залежність прояву агресії співочим дроздом на присутність та чисельність інших масових видів з піддослідної терито-

рії а також їх проявом агресії. На території КПЗ до таких видів належали: зяблик, дрізд чорний, вільшанка, костогриз, кропив'янка чорноголова, синиця велика та блакитна, гаїчка болотяна. Зміна агресії співочого дрозда високо корелювала лише із присутністю та кількістю синиці великої ($r=0.797$; $p<0.01$) та дрозда чорного ($r=0.700$; $p<0.01$). Значущий зв'язок був зафіксований із гаїчкою болотяною ($r=0.525$; $p<0.05$), зябликом ($r=0.668$; $p<0.05$) та кропив'янкою чорноголовою ($r=0.574$; $p<0.05$). Крім того, прояв агресії інших видів, також впливає і на рівень агресії співочого дрозда: високий

зв'язок із синицею великою ($r=0.797$; $p<0.01$) та значущий із зябликом ($r=0.668$; $p<0.05$).

На території дендропарку "Олександрія" зафіксовано значний зв'язок агресії дрозда співочого лише із агресивністю великої синиці ($r=0.519$; $p<0.05$), в той час як її кількість мала виключно слабкий зворотній зв'язок. Кореляція з іншими видами була відсутня.

Дрізд чорний. На території КПЗ чорні дрозди реагували агресивно на 10 видів із 24, з котрими були у MB контакт. До цих видів належать: вільшанка, дрізд співочий, синиця велика, гаїчка болотяна, зяблик, костогриз, кропив'янка чорноголова, мухоловка білошия, мухоловка сіра, вівчарик-ковалик.

Загальна частка MB контактів займає 89.67 %. Співвідношення MB та BB агресії становить 78/27 (74.29 % / 25.71 %). Загальною тенденцією у питанні безпосереднього значення прояву BB та MB агресії, зафіксовано, що велике значення у гніздовий період даний вид приділяє BB взаєминам та встановленню BB ієрархії: 48.21 % BB контактів виду становили агресивні акти, 16.05% випадків агресії спостерігалися у MB взаємоді-

ях. Подібний розподіл агресії характерен і співочому дрозду у КПЗ, але для чорного BB сутички є набагато частішими. Чорні дрозди також часто виступали ініціаторами агресивних контактів в досліджуваному лісовому угрупованні. Агресія була направлена на особин, що вже знаходилися на водопої, до часу прибуття виду, у 1.42 рази частіше, ніж, до птахів, що прилітали вже після них. Наявність кількості MB і BB контактів чорного дрозда в дендропарку "Олександрія" була статистично недостатньою для розрахунку, тому ці дані ми не наводимо.

Динаміка активності прильоту чорного дрозда на водопій. Для території КПЗ серед поведінкових актів на водопої у гніздовий період основним виступає купання (рис.3.), і є високим протягом доби. Можна виділити ранкові піки о 6:00 та 10:00, денний о 14:00 та вечірній о 20:00. Пік ранкового пиття на водопої для чорного дрозда припадає на 5:00 та 9:00, невеликий денний о 13:00 (при цьому не спостерігалось ні купання, ні пошук корму) та вечірній пік о 20:00. Максимуми кормодобувної поведінки спостерігали о 10:00 та 19:00.



Рис. 3. Динаміка зайнятості чорного дрозда на місці водопою протягом доби у Канівському природному заповіднику

Не виявлено зв'язку між агресією чорного дрозда та поведінковими актами на водопої а також із загальною кількістю різних видів птахів та їх агресивністю. Відмічено значущу кореляцію із наявністю особин свого виду ($r=0.686$; $p<0.01$), що підтверджує важливість встановлення BB відносин у гніздовий період. Прояв реакції агресії чорним дроздом не був пов'язаним із кількістю чи агресивністю інших видів.

На території дендрологічного парку "Олександрія" чисельність особин, зайнятих у акті купання та турбо-

тою за оперенням є майже сталою з самого ранку та досягає максимуму о 12:00 та 14:00 (рис.4.), вечірній пік припадає на 20:00. Поява чорного дрозда на водопої протягом доби з потребою у поповненні втрат води шляхом пиття має дещо коливальний характер, з вираженим ранковим максимумом о 5:00 та 9:00, денним об 11:00 та 17:00 та вечірнім о 20:00. Максимум кормодобувної поведінки та пошуку матеріалу для гнізд відмічено о 10:00, 14:00 та 17:00.



Рис.4. Динаміка зайнятості чорного дрозда на місці водопою протягом доби у дендрологічному парку "Олександрія"

Таким чином, використання водопою чорним дроздом на обох піддослідних територія є майже сталою.

Виключенням є чітка відмінність у денній зайнятості питтям. Так, у КПЗ наявний чітко виражений денний пік

о 13-й годині, в той час, як на території з наявним антропогенним впливом, відмічено два піки на початку (11:00) та у кінці (17:00) денного періоду. Крім того, у заповіднику кормодобувна поведінка поступово зростає до 19-ї години, в той час як у дендропарку її максимум наявний о 17-й годині та поступово затухає.

Так само, як і для території КПЗ, у дендропарку "Олександрія" не виявлено зв'язку між агресією чорного дрозда та поведінковими актами на водопої чи із загальною кількістю різних видів птахів та їх агресивністю. Але зафіксована висока кореляція із наявністю особин свого виду ($r=0.781$; $p<0.01$), що підтверджує важливість встановлення ВВ відносин у гніздовий період в умовах міста.

Висновки.

Для чорного та співочого дроздів характерна відмінність потреби пиття у денний період на різних територіях. Також відмічено відмінності у кормодобувній поведінці. Для співочого дрозда у Канівському природному заповіднику характерний поступовий перехід ранкового періоду кормодобування у денний. В той же час, в дендрологічному парку "Олександрія" виражені чіткі ранковий та денний пік, що, ймовірно, пов'язано із фактором турбування людиною. Так само, для чорного дрозда, наявна відмінність у динаміці кормодобувної поведінки у вечірні години.

Досліджено відсоток міжвидової та внутрішньовидової агресії дроздів у відношеннях з іншими видами. В природних та антропогенно навантажених умовах більша кількість агресивних контактів припадає на внутрішньовидові відносини, хоча загальна кількість міжвидових контактів більша та вказує на значення цих відносин. Найчастіше агресія направлена на особин, що вже знаходяться на водопої, ніж до птахів, що прилітають після дроздів.

Головна відмінність у прояві агресивної поведінки зафіксована для співочого дрозда. Так показники агресії цього виду високо корелювали із наявністю та агресивністю інших видів у Канівському заповіднику, що не спостерігалось у дендропарку "Олександрія". Та навпаки, корелювали із потребою у питті у дендропарку, на відміну від заповідника.

Виявлена залежність агресивної поведінки дроздів із наявністю та чисельністю поруч масових видів, що виступають природними конкурентами. Для співочого дрозда у природних біотопах більше значення має не лише загальна кількість птахів, а саме наявність певних видів та їх агресивність, як основних конкурентів за ресурс. Прояв агресії в антропогенно навантажених місцевостях пов'язаний із конкуренцією за основний ресурс, та, на відміну від природних місцевостей, не пов'язаний із кількістю птахів іншого виду та їх агресивністю, за виключенням специфічного конкурента. У дендрологічному парку "Олександрія" таку реакцію викликала лише агресивність синиці великої. Дрозди чорні у гніздовий період надають перевагу встановленню внутрішньовидової ієрархії, та прояв ними агресії не пов'язаний ні з особинами інших видів, ні з поведінковими актами на водопої.

Подяки. Ми вдячні керівництву Канівського природного заповідника та дендрологічного парку "Олександрія" за надану можливість у проведенні спостережень.

Робота виконана у рамках наукової теми кафедри зоології Київського національного університету ім. Т. Шевченка "Збереження біорізноманіття та комплексне дослідження стратегій адаптації фіто-, зоо- та віробіоти України з використанням біоінформаційних технологій".

Список використаних джерел

1. Аманова М. А. К характеристике ритма прилета птиц на водопой в условиях пустыни // Мат-лы IV Всесоюз. орнитол. конф. – Алма-Ата. – 1965. – С. 9–10.
2. Горобець Л. В. Значення місць водопою для гніздових популяцій птахів лісових екосистем: автореф. дис. канд.біол.наук.03.00.16 / Горобець Л. В.; ННЦ "Інститут біології" КНУ ім. Тараса Шевченка. – Київ: Б.в., 2011. – 20 с.
3. Иваницкий В. В. Этологические аспекты взаимоотношений между близкими видами животных // Зоологический журнал. – 1982. – Т. 61, № 10. – С. 1461-1471.
4. Иваницкий В. В. Межвидовые отношения симпатрических видов каменок (*Oenanthe*, *Turdidae*, *Passeriformes*). Поведенческие аспекты сосуществования близких видов // Зоологический журнал. – 1980. – Том 59, № 5. – С. 739-749.
5. Панов Е. Н. Методологические проблемы в изучении коммуникации и социального поведения животных // Итоги науки и техники (ВИНИТИ). Зоология позвоночных. Проблемы этологии наземных позвоночных. – 1983. – Т. 12. – С. 5-70.
6. Панов Е. Н., Иваницкий В. В. Межвидовые территориальные отношения в смешанной популяции чернобокой каменки *Oenanthe finchi* и каменки-плешанки *O. pleschanka* на полуострове Мангышлак // Зоологический журнал. – 1975. – Т. 54, № 9. – С. 1357-1370.
7. Панов Е. Н., Иваницкий В. В. Пространственные взаимоотношения четырех видов сорокопудов в Южной Туркмении // Зоологический журнал. – 1979. – Т. 58, № 10. – С. 1518-1535.
8. Попов С. В., Ильченко О. Г. Методические рекомендации по этологическим наблюдениям за млекопитающими в неволе. – М.: Московский зоопарк, 1990. – 76 с.
9. Рябцев В. К. Результаты исследования межвидовых территориальных отношений птиц на Южном Ямале // Зоол. Журнал. – 1977. – Т. 56, № 2. – С. 232-242.
10. Фесенко Г. В., Бокотей А. А. Птахи фауни України: Польовий визначник. – К., 2002. – 208 с.
11. Arnott G., Elwood R. W. Assessment of fighting ability in animal contests. // *Animal Behaviour*. – 2009. – Vol. 77. – P.991-1004.
12. Brumm H., Ritschard M. Song amplitude affects territorial aggression of male receivers in chaffinches // *Journal Behavioral Ecology*. – 2010. – Vol. 22, Issue 2. – P. 310-316.
13. Foltz S.L. Get off my lawn: increased aggression in urban song sparrows is related to resource availability / S. L. Foltz, A. E. Ross, B. T. Laing // *Journal Behavioral Ecology*. – 2015. – Vol. 25. – P.871-884.
14. Forsman J. T., Thomson R. L., Seppänen J. T. Mechanisms and fitness effects of interspecific information use between migrant and resident birds // *Journal Behavioral Ecology*. – 2007. – Vol. 18, Issue 5. – P. 888-894.
15. Grabowska-Zhang A. M., Wilkin T. A., Sheldon B. C. Effects of neighbor familiarity on reproductive success in the great tit (*Parus major*) // *Journal Behavioral Ecology*. – 2011. – Vol. 23, Issue 2. – P. 322-333.
16. Grether G.F. The evolutionary consequences of interspecific aggression / G.F. Grether, C.N. Anderson, J.P. Drury [et al.] // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 2013. – Vol. 1289. – P.48-68.
17. Hammerstein P., Parker G.A. The asymmetric war of attrition // *J Theor Biol*. – 1982. – Vol. 96. – P.647-682.
18. Hasegawa M. Urban and colorful male house finches are less aggressive / M. Hasegawa, R. A. Ligon, M. Giraudeau [et al.] // *Journal Behavioral Ecology*. – 2014. – Vol. 25, Issue 3. – P. 641-649.
19. Lehtonen T.K., McCrary J.K., Meyer A. Territorial aggression can be sensitive to the status of heterospecific intruders. // *Behav Process*. – 2010. – Vol. 84. – P.598-601.
20. Mikami O.K., Kawata M. Does interspecific territoriality reflect the intensity of ecological interactions? A theoretical model for interspecific territoriality // *Evolutionary Ecology Research*. – 2004. – Vol. 6. – P.765-775.
21. Peiman K.S., Robinson B.W. Ecology and evolution of resource-related heterospecific aggression // *Quarterly Review of Biology*. – 2010. – Vol. 85. – P.133-158.
22. Tanner C.J., Adler F.R. To fight or not to fight: context-dependent interspecific aggression in competing ants // *Animal Behaviour*. – 2009. – Vol. 77. – P.297-305.
23. Tynkynen K., Rantala M.J., Suhonen J. Interspecific aggression and character displacement in the damselfly *Calopteryx splendens* // *Journal Evolutionary Biological*. – 2004. – Vol. 17. – P.759-767.

Надійшла до редколегії 30.09.15

А. Маркова, асп., В.Серебряков, д-р биол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ АКТЫ ПЕВЧЕГО И ЧЕРНОГО ДРОЗДОВ НА МЕСТАХ ВОДОПОЯ

Агрессия несет важные последствия для экологических процессов и эволюционных стратегий поведения. Приводятся данные, касающиеся агрессии черного и певчего дроздов на водопое в природных средах обитания и территории с выраженным антропогенным давлением в гніздовий період, их связь с другими поведенческими актами, а так же их динамiku занятости на протяжении дня, наличия рядом других видов птиц. Рассмотрены межвидовые и внутривидовые контакты дроздов. Исследовано соотношение агрес-

сивных и не агрессивных контактов, а так же симметричность межвидовых отношений – соотношение числа межвидовых контактов, инициаторами которых были особи другого вида.

Ключевые слова: поведение, дрозд черный, дрозд певчий, межвидовая и внутривидовая агрессия.

A. Markova, PhD stud., V. Serebryakov, SDc.

Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

BEHAVIORAL ACTS SONG AND BLACKBIRD THRUSH ON WATERING PLACE

Aggression has important implications for ecological processes and evolutionary behavior strategies. Below there are the data concerning the aggression of blackbird and song thrush in natural conditions and the territories with significant anthropogenic influence on watering places during the nesting period, their relations to other behavior acts, their occupation dynamics during the day and the presence of other species of birds nearby. The interspecific and intraspecific contacts of thrushes are considered. The ratio of aggressive and non-aggressive contacts and the symmetry of interspecific relations (i.e. the ratio of interspecific relation initiated by the individuals of another species) were studied.

Keywords: behavior, blackbird, song thrush, interspecific and intraspecific aggression.

УДК 616.34-002:613.25

О. Плиска, д-р мед. наук, О. Добростан асп.

Національний педагогічний університет імені Михайла Петровича Драгоманова, Київ,

В. Лазоришинець, д-р мед. наук

Національна академія медичних наук України, лікувально-організаційне управління, Київ,

О. Тивончук, д-р мед. наук

Національний інститут хірургії та трансплантології ім. О.О. Шалімова,

відділ хірургії стравоходу та реконструктивної гастроентерології, Київ,

Л. Таран, лікар-патолог

Національний інститут раку, патологоанатомічна лабораторія, Київ

ВЗАЄМОЗВ'ЯЗОК ПАТОЛОГІЧНОГО ОЖИРІННЯ І ХРОНІЧНОЇ ЗАПАЛЬНОЇ РЕАКЦІЇ ТОНКОЇ КИШКИ

Досліджені біоптати тонкої кишки людини в контролі (отриманих в результаті травм тонкої кишки) та в умовах хірургічного лікування патологічного ожиріння. При патологічному ожирінні, у порівнянні з нормальною масою, спостерігалось зменшення висоти ворсинок, збільшення їх товщини та деформація. Відмічалось збільшення кількості сполучної тканини, розширення та переповнення кров'ю судин, зміни м'язової оболонки; також встановлено зміну спектру лейкоцитів у власній пластинці слизової оболонки тонкої кишки: зростання відносної кількості Т-лімфоцитів і зменшення – В-лімфоцитів, суттєве зростання кількості клітин макрофагального ряду та кількості Т-хелперів, а також більше ніж у двічі зменшення кількості Т-супресорів. Отримані дані є морфологічним підтвердженням розвитку негативних змін при патологічному ожирінні. Тобто, загальна схильність до посилення запальних реакцій в організмі має свої прояви і в тонкій кишці. Таким чином, розвиток патологічного ожиріння супроводжується розвитком запальної інфільтрації і зміни стану сполучнотканинної основи та м'язових елементів в стінці тонкої кишки, що в свою чергу, імовірно, може викликати порушення регуляції процесів секреції, всмоктування та моторики тонкої кишки.

Ключові слова: патологічне ожиріння, тонка кишка.

Вступ. Патологічне ожиріння (ПО) в індустріально розвинутих країнах з кожним роком стає все більш актуальною проблемою так як все більша кількість населення страждає надлишком маси тіла [1]. При цьому, якщо спочатку прогресуюче зростання маси тіла на початку відбувається на фоні відносно здорового організму [2] то зі збільшенням маси тіла зростають потреби в енергії, що в свою чергу стимулює споживання їжі і т.д. Хибне коло замикається. Тривале ожиріння – додатковий фактор розвитку атеросклерозу, цукрового діабету (ЦД), гіпертонічної хвороби тощо, які набули епідемічного масштабу в усьому світі [4]. При цьому встановлено, що більше ніж 50% всіх летальних наслідків в цілому пов'язані з кардіальною патологією, серед причин якої названі синдроми займають провідне місце. В останні роки також показано нерозривну патогенетичну єдність метаболічних зрушень, що обумовлюють розвиток як цукрового діабету (ЦД) так і ішемічної хвороби серця (ІХС) та неодноразово показано, що в основі цих зрушень може лежати хронічне системне запалення, наслідком якого є як розвиток інсулінорезистентності (ІР) так і проатерогенні зміни вмісту та складу ліпідів і ліпопротеїнів (ЛП) крові. Усе це викликає посилену увагу до проблеми ПО.

Основними причинами розвитку початкового ожиріння можуть бути порушення скоротливої функції гладеньких м'язів тонкої кишки або порушення регуляції його моторної функції, що може викликати затримку хімуса в тонкій кишці з підвищенням коефіцієнту корисної дії щодо утилізації поживних речовин. Зміни в регу-

ляторних механізмах також можуть супроводжуватись підвищенням секреторної та всмоктувальної здатності тонкої кишки. Наслідком усього вище наведеного буде підвищення ефективності процесів гідролізу та всмоктування в тонкій кишці з розвитком ожиріння. З іншого боку, встановлено, що ці процеси є одним із найбільш значимих ускладнень накопичення в організмі жирової тканини, так як її клітини (адипоцити) мають високу фізіологічну активність та вивільнюють велику кількість біологічно активних речовин, перш за все – медіаторів системного запалення (фактору некрозу пухлин – ФНО- α , інтерлейкінів 1 та 6), та гуморальних регуляторів з ауто- та паракринним характером дії (лептин, адипонектин та ін.). Показано, що рівень в крові як маркерів, так і медіаторів запалення зростає пропорційно ступеню ожиріння, і це є передумовою патологічних змін метаболізму ліпідів та вуглеводів.

Необхідно також вказати, що ні одна експериментальна модель не може повністю відтворити зміни, які відбуваються в людському організмі при розвитку наведених вище патологічних синдромів. А такий процес, як атеросклероз, взагалі важко викликати у експериментальних тварин, що свідчить про значні фізіологічні відмінності між тканинами експериментальних тварин і людини. Тому зараз практично відсутні наукові дослідження з приводу вивчення функціональних властивостей клітин, зокрема нервових і м'язових, людини в нормі та при патології. І саме тому дослідження цих явищ на біоптатах тонкої кишки людини які за своїми властивостями близькі до здорових тканин та у випадку патології

чного ожиріння має значний науковий інтерес. Гістохімічні дослідження спроможні дати відповідь про стан секреторного, скоротливого та всмоктувального апарату тонкого кишечника.

Мета роботи: вивчення особливостей будови стінки тонкої кишки у нормі й при патологічному ожирінні.

Об'єкт і методи дослідження. Дослідження будови тонкої кишки проведено на біоптатах, отриманих від 11 пацієнтів, яким проводилось оперативне втручання в зв'язку з морбідним (патологічним) ожирінням. У всіх цих пацієнтів додатковими попередніми клінічними та біохімічними дослідженнями було виключено його розвиток внаслідок порушень гормональних систем організму. В якості контролю були використані біоптати отримані в межах здорових тканин від 12 пацієнтів при проведенні оперативних втручаннях на тонкій кишці внаслідок травматичних пошкоджень, видалення її ділянок в межах здорових частин внаслідок пухлин тощо. Тобто у цих випадках ділянка кишки висікалась в межах здорових тканин. В межах здорових тканин також виділяли кільце кишки шириною біля 0,5 см.

Отриманий матеріал фіксували в забуференому 10% формаліні з рН 7,4 та ущільнювали у парафін зі застосуванням гістіопроектора Histos-5 (Milestone, Italy). З парафінових блоків виготовлялися гістологічні зрізи товщиною 5 мкм за допомогою мікротома Microm HM325 (Thermo Scientific, Germany). Зрізи забарвлювали гематоксином та еозином, азур II-еозином, фосфорновольфрамовим гематоксином за Маллорі, за Новеллі.

Імуногістохімічні реакції проводили з антитілами (Dako, Denmark) проти CD3 (Polyclonal Rabbit Anti-Human CD3, загальний маркер Т-лімфоцитів), CD4 (Monoclonal Mouse Anti-Human CD4 Clone 4B12, маркер

Т-хелперів), CD8 (Monoclonal Mouse Anti-Human CD8 Clone C8/144B, маркер Т-супресорів), CD20 (Monoclonal Mouse Anti-Human CD20cy Clone L26, маркер В-лімфоцитів) та CD68 (Monoclonal Mouse Anti-Human CD68 Clone PG-M1, маркер клітин макрофагального ряду) у відповідності з протоколом виробника з використанням системи детекції EnVision™ FLEX (Dako, Denmark). Зрізи докрашували гематоксином Gill. У якості позитивного контролю використані тканинні зразки з визначеною позитивною реактивністю, а для негативного контролю проводили процедуру без застосування первинних антитіл.

Отримані препарати вивчали та фотографували за допомогою мікроскопа Nikon Eclipse 80i з камерою DS-5SMc/L2. У власній пластинці слизової оболонки тонкої кишки визначали кількість еозинофілів у полі зору мікроскопу 40х, відносну кількість (%) різних типів лімфоцитів та клітин макрофагального ряду. Результати досліджень оброблені статистично за допомогою програми Excel-2010 з використанням t-критерія Стюдента.

Результати та їх обговорення: Стінка тонкої кишки за звичайних умов (рис. 1), в контролі, або умовах близьких до контрольних мала чітко виразні слизову, м'язову та серозну оболонки. Власна пластинка слизової оболонки утворювала ворсинки вкриті одношаровим циліндричним епітелієм. Їх товщина незначно варіювала на довжині біоптату. У сполучнотканинній основі ворсинки проходили гемокапіляри, виявляли поодинокі гладкі міоцити і присутня помірна кількість клітин лейкоцитарного ряду. На рисунку видні чіткі, рівномірні обриси ворсинок, добре видно ентероцити, наявна невелика кількість прозапальних клітин.

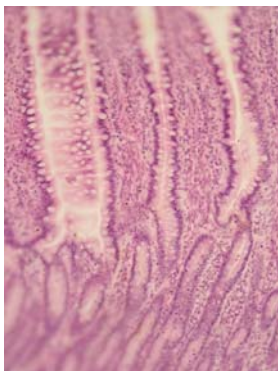


Рис. 1. Слизова оболонка тонкої кишки здорової людини. Забарвлення гематоксином і еозином. Мікрофотографія, об. 20, ок. 10

Дослідженнями встановлено, що будова стінки тонкої кишки в пацієнтів хворих на ожиріння мала ряд відмінностей у порівнянні з відносно здоровими пацієнтами. При ожирінні спостерігалось зменшення висоти ворсинок, збільшення їх товщини та деформація. У складі сполучнотканинної основи ворсинок збільшена кількість клітинних елементів за рахунок лейкоцитів та макрофагів (мал. 2). Особливо слід відмітити зростання в складі власної пластинки тонкої кишки при патологічному ожирінні кількості еозинофілів, яка становила $4,2 \pm 1,8\%$ у полі зору 40х мікроскопу, тоді як у пацієнтів з нормальною масою вона становила $1,1 \pm 0,4\%$. Також в стінці тонкої кишки в пацієнтів хворих на ожиріння встановлено відносно зменшену кількість гладенько-

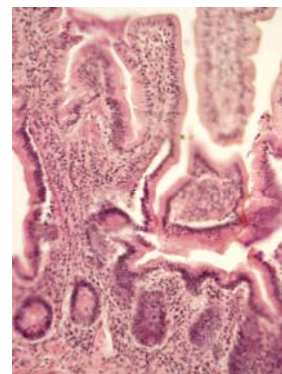


Рис. 2. Слизова оболонка тонкої кишки людини при морбідному ожирінні. Зменшення висоти ворсинок, збільшення їх товщини та деформація, помірна лейкоцитарно-макрофагальна інфільтрація. Забарвлення гематоксином і еозином. Мікрофотографія, об. 20, ок. 10

м'язових клітин в порівнянні з нормою. Місцями спостерігалось збільшення кількості сполучнотканинних волокон. Кількість келихоподібних клітин у складі епітелію ворсинок в одних випадках зменшена, в інших – навпаки збільшена. Таким чином, виділення захисного слизу могло бути як збільшеним так зменшеним. Одночасно виявлено вкорочення крипт та збільшення між ними прошарків сполучної тканини. Порівняно часто у власній пластинці слизової оболонки зустрічалися переповнені кров'ю судини. Частіше, ніж звичайно, зустрічалися фолікули у власній пластинці слизової оболонки безпосередньо у основі ворсинок. У частині випадків виявлено потовщення м'язової пластинки слизової оболонки та м'язової оболонки тонкої кишки, а також розширення та

ущільнення прошарків сполучної тканини між шарами м'язової оболонки. Таким чином, отримані дані свідчили про порушення нормальної будови стінки тонкої кишки з ознаками запального процесу та очагового фіброзу.

Вплив загальної запальної системної реакції і, зокрема, її локалізація в стінці тонкої кишки буде спричиняти першочергові впливи на мембрани клітин. У такому випадку першими в процес будуть втягнуті нейрони сплетіння. Відповідно ці зміни будуть стосуватись їх рецепторного апарату та зміни біофізичних властивостей мембран з зміною трансмембранних струмів. У свою чергу останнє буде супроводжуватись зміною каскаду внутрішньоклітинних реакцій та зміною їх функції. Та-

ким чином, ураження нейронів міжм'язового сплетіння буде супроводжуватись порушеннями регуляції скоротливої функції гладеньких м'язів [4], підслизового – секреторної функції слизової оболонки. Зміняться і всмоктувальні властивості стінки тонкої кишки.

Разом з тим, проведені імуногістохімічні дослідження показали, що при патологічному ожирінні змінюється спектр лейкоцитів у власній пластинці слизової оболонки тонкої кишки (табл). При цьому спостерігається зростання відносної кількості Т-лімфоцитів і зменшення – В-лімфоцитів (рис. 3). Крім того спостерігається суттєве зростання кількості клітин макрофагального ряду (рис. 3).

Таблиця 1. Відносна кількість (%) лімфоїдних та макрофагальних елементів у складі власної пластинки слизової оболонки тонкої кишки при метаболічному синдромі та при нормальній масі тіла

Показник	Нормальна маса тіла	Патологічне ожиріння
CD3	42,42 ± 1,4	50 ± 1,82 ^{***}
CD4	1,57 ± 0,13	7 ± 0,36 ^{***}
CD8	10 ± 0,84	4,5 ± 0,34 ^{***}
CD20	35 ± 1,09	18 ± 1 ^{***}
CD68	12,28 ± 0,714286	20,16667 ± 1,04 ^{***}

Примітка: вірогідність відмінностей між показниками: – групи з нормальною масою тіла і групою з патологічним ожирінням на рівні похибки: ^{***} – p<0,001. M±m

Оцінка спектру різних типів Т-лімфоцитів показала при патологічному ожирінні суттєве зростання, у порівнянні з пацієнтами з нормальною масою, кількості

Т-хелперів, а також більше ніж у двічі зменшення кількості Т-супресорів (табл 1, рис. 3.).

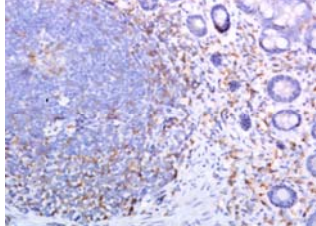
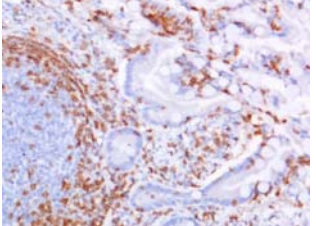
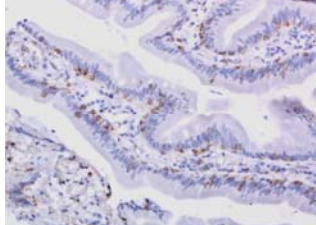
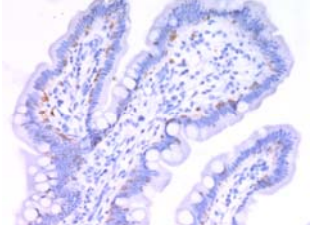
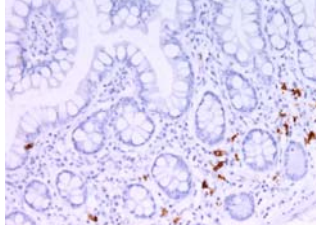
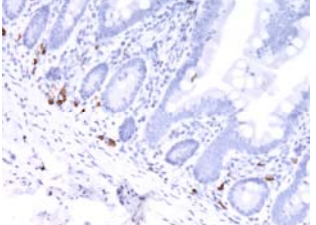
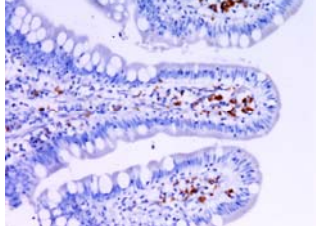
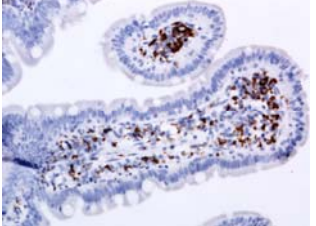
Маркер	Нормальна маса тіла	Ожиріння
CD3		
CD8		
CD20		
CD68		

Рис. 3. Експресія маркерів різних функціональних типів лімфоцитів у власній пластинці слизової оболонки тонкої кишки пацієнтів з морбідним ожирінням та з нормальною масою тіла. Імуногістохімічні реакції. Мікрофото, об. 20, ок. 10.

Таким чином, отримані дані є морфологічним підтвердженням розвитку негативних змін при морбідному ожирінні. Тобто, загальна схильність до посилення запальних реакцій в організмі має свої прояви і в тонкій кишці. Внаслідок такої загальної запальної реакції організму запалення охоплює і тонку кишку.

Значне ожиріння, як показують сучасні наукові дані, є додатковим фактором розвитку атеросклерозу – системного захворювання організму [3]. При цьому необхідно вказати, що останні наукові дані свідчать про розвиток системної реакції запалення в організмі при розвитку цього серйозного захворювання. У результаті спостерігається не тільки порушення обміну ліпідів і ЛП та зміни в кількості і співвідношенні холестерину, тригліцеридів, фосфоліпідів та ненасичених жирних кислот, але і значна активація прозапальних клітин крові. Загальні патогенетичні механізми інсулінонезалежного ЦД та атеросклерозу (подібні за характером порушення обміну ліпідів, що поєднуються з вираженою активацією запальних клітин крові) зараз встановлені, що свідчить про єдність або взаємопов'язаність етіологічних факторів та процесів розвитку цих захворювань.

Висновки. Вивчення особливостей будови стінки тонкої кишки в пацієнтів хворих на ожиріння і відносно здорових пацієнтів виявило відмінності будови. При патологічному ожирінні у порівнянні з пацієнтами з нормальною масою тіла встановлено зміну спектру лейкоцитів у власній пластинці слизової оболонки тонкої кишки: зростання відносної кількості Т-лімфоцитів і зменшення – В-лімфоцитів, суттєве збільшення кількості

клітин макрофагального ряду, а також суттєве зростання кількості Т-хелперів та більше ніж у двічі зменшення кількості Т-супресорів. Отримані дані свідчать, що розвиток патологічного ожиріння супроводжується розвитком запальної інфільтрації та викликає зміни стану сполучнотканинної основи й м'язових елементів в стінці тонкої кишки, що в свою чергу, імовірно, може викликати порушення регуляції процесів секреції, всмоктування та моторики тонкої кишки.

Список використаних джерел

1. Лаврик А. С. Шунтирование желудка в хирургическом лечении патологического ожирения / Лаврик А. С., Саенко В. Ф., Тивончук А. С., и др. // Клиническая хирургия. – 2003. – №3. – С. 14-17.
2. Саенко В. Ф. Аспекти хірургічного лікування морбідного ожиріння / Саенко В. Ф., Лаврик А. Г., Тивончук О. С., Бубало О. Ф. // Матеріали 3'їзду ендокринологів України. – Ендокринологія. – 2001. – 6 (Додаток). – С. 163.
3. Талаева Т. В. Атерогенная модификация липопротеинов крови и гиперхолестеринемия как следствия острого воспалительного процесса / Талаева Т. В., Корниенко О. В., Братусь А. В. и др. // Журнал АМН Украины. – 1997. – Т.3, N 3. – С. 463-471.
4. Ashby D. Lack of effect of serum amyloid A (SAA) on the ability of high-density lipoproteins to inhibit endothelial cell adhesion molecule expression / Ashby D., Gamble J., Vadas M. et al. // Atherosclerosis. – 2001. – Vol. 154, N 1. – P. 113-121.
5. Rugiero F. Analysis of whole-cell currents by patch clamp of guinea-pig myenteric neurones in intact ganglia / Rugiero F., Gola M., Kunze W. A. et al. // Journal Physiology. – 2002. – 538. – P. 447-463.
6. Ожиріння – епідемія ХХІ століття: сучасний погляд на проблему. Прага. / В.В.Таранчук. // Лікаря-практику. – 2009. – №4(16).
7. Heymsfield S. Does body mass index adequately convey a patients mortality risk? / S. Heymsfield, W. Cefalu // Journal of the American Medical Association – 2013 – T. 309. – С. 87-88.

Надійшла до редколегії 08.12.15

А. Плиска, д-р мед. наук, О. Добростан, асп.

Национальный педагогический университет имени Михаила Петровича Драгоманова, Киев, Украина,

В. Лазоришинец, д-р мед. наук

Национальная академия медицинских наук Украины, лечебно-организационное управление, Киев, Украина,

А. Тивончук, д-р мед. наук

Национальный институт хирургии и трансплантологии имени А.А. Шалимова,

отдел хирургии пищевода и реконструктивной гастроэнтерологии, Киев, Украина,

Л. Таран, врач-патолог

Национальный институт рака, патологоанатомическая лаборатория, Киев, Украина

ВЗАИМОСВЯЗЬ ПАТОЛОГИЧЕСКОГО ОЖИРЕНИЯ И ХРОНИЧЕСКОЙ ВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ РЕАКЦИИ ТОНКОЙ КИШКИ

Исследованы биоптаты тонкой кишки человека в контроле (полученные в результате травм тонкой кишки) и в условиях хирургического лечения патологического ожирения. При патологическом ожирении, по сравнению с нормальной массой, наблюдается уменьшение высоты ворсинок, увеличение их толщины и деформация. Отмечалось увеличение количества соединительной ткани, расширение и переполнение кровью сосудов, изменения мышечной оболочки; также установлено изменение спектра лейкоцитов в собственной пластинке слизистой оболочки тонкой кишки: рост относительного количества Т-лимфоцитов и уменьшение – В-лимфоцитов, существенный рост количества клеток макрофагального ряда и количества Т-хелперов, а также более чем в два раза уменьшение количества Т-супрессоров. Полученные данные являются морфологическим подтверждением развития негативных изменений при патологическом ожирении. То есть, общая склонность к усилению воспалительных реакций в организме имеет свои проявления и в тонкой кишке. Таким образом, развитие патологического ожирения сопровождается развитием воспалительной инфильтрации и изменения состояния соединительнотканной основы и мышечных элементов в стенке тонкой кишки, что в свою очередь, вероятно, может вызвать нарушение регуляции процессов секреции, всасывания и моторики тонкой кишки.

Ключевые слова: патологическое ожирение, тонкая кишка.

A. Pluska, DMs, O. Dobrostan, PhD stud

National Pedagogical University named after Mikhail Petrovich Drahomanova Department of anatomy, Kyiv, Ukraine,

V. Lazoryshynets, DMs

The National Academy of Medical Sciences of Ukraine, medical and organizational management, Kyiv, Ukraine,

A. Tivonchuk, DMs

Natsional'nyy institut khirurgii i transplantologii im. A.A.Shalimova, otdel khirurgii pishchevoda i rekonstruktivnoy gastroenterologii, Kyiv, Ukraine,

L. Taran, doctor-patolog

Natsional'nyy institut raka, patologoanatomicheskaya laboratoriya, Kyiv, Ukraine

THE RELATIONSHIP OF OBESITY AND CHRONIC INFLAMMATORY INTESTINAL REACTIONS

Researched biopsy of the small intestine in control person (derived from the injuries of the small intestine) and in the conditions of surgical treatment of morbid obesity. In pathological obesity, compared with normal weight, a decrease in villus height, increasing their thickness and deformation. Was noted increase in connective tissue, expand and overflow blood vessels, changes in muscle membrane; also found changing spectrum of white blood cells in the lamina propria of the mucous membrane of the small intestine, increase the relative number of T-lymphocytes and reduction – B-lymphocytes, a significant increase in the number of cells macrophage number and the number of T-helper cells, and more than twice the reduction in the number of T-suppressors. The data is morphological confirmation of negative changes in morbid obesity. That is, the general tendency to enhance inflammatory responses in the body has its manifestations in the small intestine. Thus, the development of pathological obesity accompanied by the development of inflammatory infiltration and connective tissue changes in the state framework and muscular elements in the wall of the small intestine, which in turn is likely to cause breach of the regulation of secretion, absorption and motility of the small intestine.

Key words: morbid obesity, small intestine.

УДК 582.28 : [665.52+661.163.2]

Т. Кондратюк, канд. біол. наук, А. Калініченко, студ.
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ**СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНА РЕОРГАНІЗАЦІЯ ДИМОРФНИХ ЧОРНИХ ДРІЖДЖІВ
EXOPHIALA ALCALOPHILA ПІД ВПЛИВОМ РОСЛИННИХ ЕФІРНИХ ОЛІЙ**

Досліджено антифунгальний вплив рослинних ефірних олій *Cariophyllus aromaticus* L., *Foeniculum vulgare* Mill., *Lavandula angustifolia* Mill., *Mentha piperita* L., *Melaleuca alternifolia* Maid., *Origanum vulgare* L., *Pelargonium roseum* Wild., *Thymus vulgaris* L. та біоциду бензалконію хлориду на чорні дріжджі *Exophiala alcalophila* Goto et Sugiy. З використанням диско-дифузійного методу встановлено високий рівень антифунгальної активності *O. vulgare*, *Th. vulgaris*, *P. roseum* та *C. aromaticus*. За ступенем антифунгальної дії вказані ефірні олії (без розведення та у концентрації 75%) подібні до впливу 3%-ого бензалконію хлориду. Показано, що під впливом бензалконію хлориду та ефірних олій *O. vulgare*, *Th. vulgaris*, *P. roseum*, *C. aromaticus* відбувається структурно-функціональна реорганізація *E. alcalophila*: зміни морфометричних показників клітин, морфології колоній, інтенсивності брунькування, диморфний перехід *E. alcalophila* "дріжджі – міцелій". Зазначені зміни є проявом широких адаптаційних властивостей дослідженої культури чорних дріжджів.

Ключові слова: чорні дріжджоподібні гриби, рослинні ефірні олії, антифунгальний вплив, адаптаційні зміни.

Вступ. Термін "чорні дріжджоподібні гриби" (ЧДГ), або "чорні дріжджі", застосовують для опису таксономічно та філогенетично гетерогенної групи мікроскопічних грибів, загальною особливістю яких є меланізація клітинної стінки та утворення дочірніх клітин шляхом полярного або багатобічного брунькування [1]. Рід ЧДГ *Exophiala* J.M. Carmich. належить до групи анаморфних, має філогенетичну приналежність до порядку *Chaetothyriales* (відділ *Ascomycota*). За інформацією, що міститься у базі даних Міжнародного Мікологічного інституту CABI "Index Fungorum", до роду *Exophiala* сьогодні включено 40 видів [2]. Види роду *Exophiala* утворюють клітини, що брунькуються, та характеризуються диморфізмом, тобто здатністю формувати в різних умовах такі два різні морфологічні типи (форми), як "дріжджі" та "гіфи" [3]. Перехід від однієї форми росту ЧДГ до іншої – складний процес, який залежить від багатьох факторів оточуючого середовища. Еколого-біологічна роль такого адаптивного пристосування достатньо очевидна – це дозволяє виду успішно взаємодіяти із середовищем існування та адекватно реагувати на його зміни. Для літобіотних угруповань мікроміцетів і зокрема для ЧДГ, яким властивий міцеліально-дріжджовий диморфізм, було введено поняття адаптивного морфологічного потенціалу – сукупності форм росту, до утворення яких здатен кожен конкретний вид [4]. Багатьом меланізованим стрес-толерантним грибам притаманний широкий спектр адаптаційних механізмів, що робить їх здатними до розвитку на різноманітних антропогенно-змінених субстратах. Так, небезпечні для здоров'я людини ЧДГ роду *Exophiala* (*E. dermatitidis*, *E. phaeomuriformis*) виявлено в угрупованнях мікроскопічних грибів, що спричиняють пошкодження різних поверхонь у вологих приміщеннях (стіни ванних, душових кімнат тощо), побутових приладів (полімерні та гумові матеріали пральних та посудомийних машин, холодильників та ін.). Показано, що за несприятливих для існування умов (зміни терморегімів, кислотності тощо) вказані чорні дріжджі здатні утворювати екстремотолерантні екотипи, які морфологічно представлені меристематичними, сильно меланізованими клітинами, зібраними у кластери, які подібні до муральних конідій. З

урахуванням здатності ЧДГ роду *Exophiala* зберігати життєздатність та утворювати різні морфологічні типи за умов спільного впливу широкого діапазону температур, рН та вмісту солей їх віднесено до групи поліекстремотолерантних грибів [5-7]. До складу роду *Exophiala* входять численні представники опортуністичних та патогенних видів, здатних викликати тяжкі захворювання у людей та представників тваринного світу, зокрема риб на рибних фермах [3, 8-11].

Враховуючи здатність грибів роду *Exophiala* виживати за різних умов середовища, їх високі адаптаційні властивості та збільшення кількості ізолюваних представників даного роду з різноманітних антропогенних субстратів в оточенні людини актуальною задачею сьогодні є пошук та дослідження сполук з антифунгальною дією. Природні сполуки, що володіють широким спектром біоцидної дії, зокрема ефірні олії, заслуговують на особливу увагу [12-16].

Метою роботи було охарактеризувати характер впливу рослинних ефірних олій *Cariophyllus aromaticus* L., *Foeniculum vulgare* Mill., *Lavandula angustifolia* Mill., *Mentha piperita* L., *Melaleuca alternifolia* Maid., *Origanum vulgare* L., *Pelargonium roseum* Wild., *Thymus vulgaris* L. та біоциду бензалконію хлориду на чорні дріжджі *Exophiala alcalophila* Goto et Sugiy.

Матеріали та методи. Матеріалом для досліджень слугувала чиста культура чорних дріжджів *Exophiala alcalophila* FCKU 304 з колекції мікроскопічних грибів-деструкторів Київського національного університету імені Тараса Шевченка (міжнародний акронім колекції – FCKU). Дана культура ЧДГ була ізолювана нами з пошкодженого акрилового герметика у умовах високої вологості приміщення [17, 18]. Видову приналежність вказаних ЧДГ було встановлено нами за результатами проведених молекулярно-генетичних досліджень [19]. Як і при проведенні попередніх досліджень [20] при виборі ефірних олій (ЕО) ми керувалися даними про відомі фунгіцидний та/або бактерицидний ефекти ЕО, зазначеними у літературі [21] (таблиця).

Таблиця. Перелік рослин, ефірні олії яких використані у дослідженнях

Українська назва	Латинська назва	Хімічний склад ефірної олії*
Герань рожева	<i>Pelargonium roseum</i> Wild.	Переважаю терпеноїди, терпенові спирти: цитронеллол, гераніол, нерол, ліналоол, альфа-терпінеол, альфа-пінен, лимонен тощо.
Гвоздичне дерево	<i>Cariophyllus aromaticus</i> L.	70 – 85 % евгенолу, до 13% ацетатевгенолу, карфілен, сексвітерпени, α- та β-пінени та ін.
Лаванда вузьколиста	<i>Lavandula angustifolia</i> Mill.	Ліналілацетат (35 – 55%), ліналоол (30 – 35%), терпинен-4-ол (до 5%), лавандулілацетат та ін.
Материнка звичайна	<i>Origanum vulgare</i> L.	Карвакрол, тимол (5-15%), бета-каріофіллен, гемакрен альфа-пінен, камфен, мирцен, альфа-фелландрен, карен, лімонен та ін.

Продовження табл.

Українська назва	Латинська назва	Хімічний склад ефірної олії*
М'ята перцева	<i>Mentha piperita</i> L.	Ментол у вільному вигляді (40 – 60 %) і у вигляді оцтового та ізовалеріанового ефірів (4 – 15 %), ментон (3 – 12 %), оцтовий і ізовалеріановий альдегіди, пінен, тощо.
Фенхель звичайний	<i>Foeniculum vulgare</i> Mill.	Метиліові ефіри анетолу, метілхавікол (3-15 %), кетон фенхон (2-22 %), лімонен (1,4-17 %), гамма-терпинен (10,5 %), альфа-пінен (1,4-10 %) тощо.
Чайне дерево	<i>Melaleuca alternifolia</i> Maid.	Сесквітерпенових сполук близько 4%, терпинен-4-ол, альфа-туйен, альфа-і бета-пінен, сабінен, мирцен, альфа-фелландрен, альфа-і гамма-терпинен, цимен, лімонен, 1,8-цинеол та ін.
Чебрець звичайний	<i>Thymus vulgaris</i> L.	Тимол (до 60%), карваккол (2-10%), бета-каріофіллен (2-10%), гамма-терпинен (до 12%), пара-цимол (до 20%), пара-цимен, 1,8-цинеол, ліналоол, камфора, борнеол, терпинен-4-ол тощо.

*Примітка: склад ефірних олій вказаний за даними виробника.

При визначенні антифунгального впливу ЕО (придбаних в аптечній мережі), біоциду бензалконію хлориду на культуру дріжджів *E. alcalophila* використовували диско-дифузійний метод та методики оцінювання ступеню антифунгального впливу ЕО, що застосовані нами в попередніх дослідженнях [20]. Окрім нерозведених ЕО досліджували також низку розведень ЕО у стерильній воді в концентраціях 75, 50 та 25% у вигляді емульсій із додаванням 0,01% Твін-80. Дію досліджуваних ЕО порівнювали із дією біоциду бензалконію хлориду (Катаміну АБ) в концентраціях 0,5, 1,5, 2,0 та 3,0 %. Контролем слугувала культура досліджуваних ЧДГ без внесення ефірних олій та біоцидів. Фотографування препаратів грибів здійснювали за допомогою мікроскопу Primo Star компанії Carl Zeiss (Німеччина) та камери Scope Tek, м. Etrek DCM-510, при збільшенні $\times 400$. Довжину та ширину клітин вимірювали за допомогою морфометричної комп'ютерної програми AxioVision 4.8 (Carl Zeiss). Для здійснення аналізу морфометричних показників (довжини та ширини клітин), інтенсивності брунькування, а також діаметру зон затримки росту, вираховували середнє арифметичне та стандартне відхилення за допомогою програми Statistica 12.

Результати та обговорення. За результатами проведених досліджень встановлено, що високий рівень

фунгіцидної дії характерний для ефірних олій *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris*, *Pelargonium roseum* та *Cariophyllus aromaticus*: протягом 30 діб культивування ознаки росту *E. alcalophila* на чашках Петрі були відсутні (на противагу наявності росту в контролі).

Решта досліджених ефірних олій проявили фунгістатичний ефект щодо *E. alcalophila*, (рис. 1). Антифунгальний вплив ЕО *Melaleuca alternifolia* оцінений нами як помірний (діаметр зон затримки росту наприкінці культивування становив $9,7 \pm 2,2$ мм), олії *Mentha piperita* та *Foeniculum vulgare* – як слабкий (діаметр зон затримки росту < 10 мм). Найслабший вплив на досліджувані гриби встановлено для ЕО *Lavandula angustifolia*.

В результаті досліджень впливу ЕО *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris*, *Cariophyllus aromaticus*, *Pelargonium roseum* на досліджувану культуру ЧДГ у концентраціях 25, 50 та 75 % було виявлено, що вони проявляють високу антифунгальну дію у концентраціях 75 %, олії *Cariophyllus aromaticus* та *Thymus vulgaris* – за 50 %-ї концентрації (росту *E. alcalophila* на чашках Петрі не спостерігали протягом усього періоду культивування) (рис. 2).

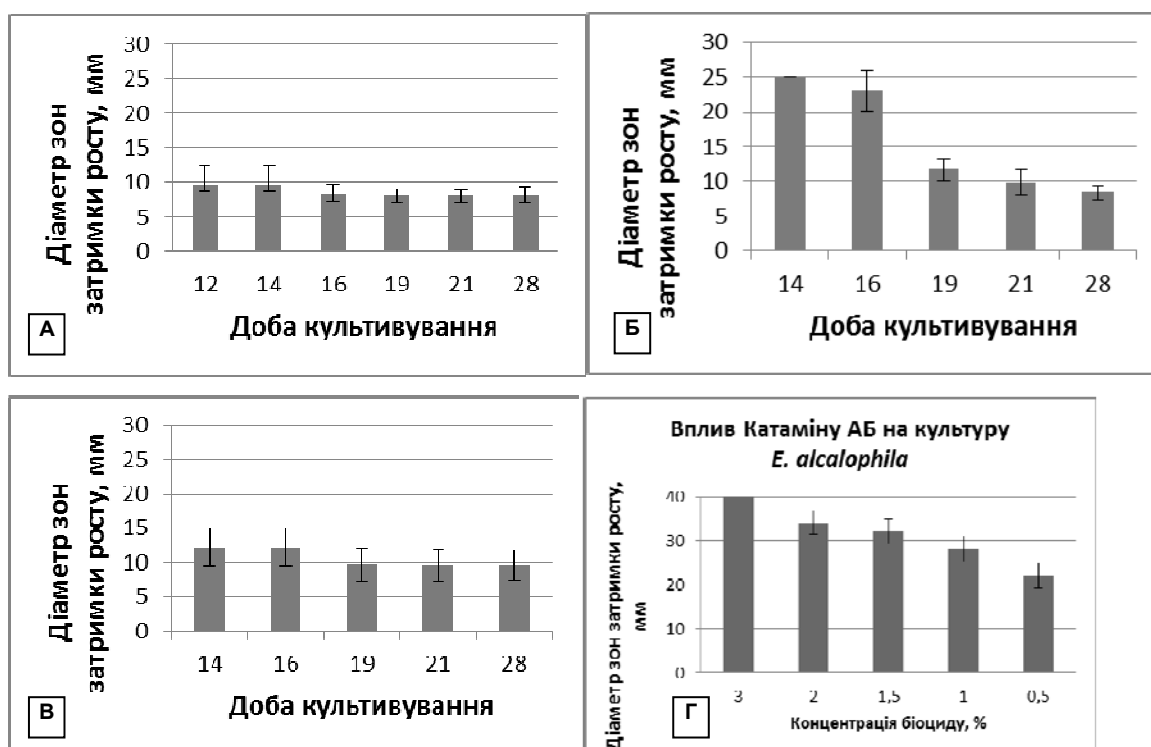


Рис. 1. Фунгістатичний вплив ефірних олій (А – *Foeniculum vulgare*, Б – *Mentha piperita*, В – *Melaleuca alternifolia*) та біоцидного впливу бензалконію хлориду (Катаміну АБ) за різних концентрацій (Г) на *E. alcalophila* (20-а доба культивування)

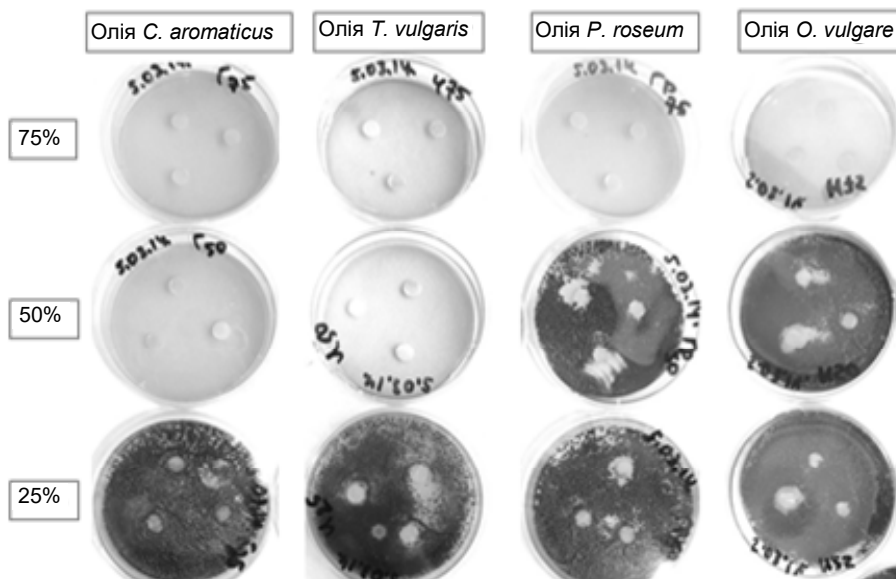


Рис. 2. Вплив ефірних олій *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris*, *Cariophyllus aromaticus*, *Pelargonium roseum* у різних концентраціях на культуру *E. alcalophila*

Встановлено, що за концентрації 3% бензалконію хлориду ріст культури *E. alcalophila* був відсутній. За умов впливу Катаміну АБ у концентраціях 2, 1.5, 1 та 0.5 %, спостерігали утворення зон затримки росту, діаметр яких не змінювався протягом усього періоду культивування, що свідчило про стійкий фунгіцидний ефект (рис. 1).

Отже, ЕО *Thymus vulgaris*, *Pelargonium roseum* (без розведення та у концентраціях 75 та 50 %), *Origanum vulgare* та *Cariophyllus aromaticus* (без розведення та у концентрації 75 %) за рівнем антифунгальної дії подібні до впливу біоциду бензалконію хлориду у концентрації 3%.

Результати низки досліджень свідчать про фунгіцидний ефект ефірної олії *Origanum vulgare* щодо грибів роду *Candida* [22, 23]. В значній кількості публікацій охарактеризовано антифунгальний вплив ЕО чайного

дерева (*Melaleuca alternifolia*) на гриби різних видів, у тому числі і дріжджові, стійкі до азолів [23-25]. Зазначається сильний фунгіцидний ефект ЕО з рослин роду *Thymus*, а також синергізм дії за умов поєднання даної ефірної олії з клотримазолом [26, 27].

В результаті проведених нами досліджень встановлено утворення міцеліальних структур та псевдоміцелію тест-культурою *E. alcalophila* під впливом ЕО *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris*, *Pelargonium roseum* та *Cariophyllus aromaticus* та бензалконію хлориду, що свідчить про здатність *E. alcalophila* до структурно-функціональної реорганізації в умовах впливу антифунгальних препаратів. У той же час в контролі було виявлено лише поодинокі міцеліальні структури (рис. 3).

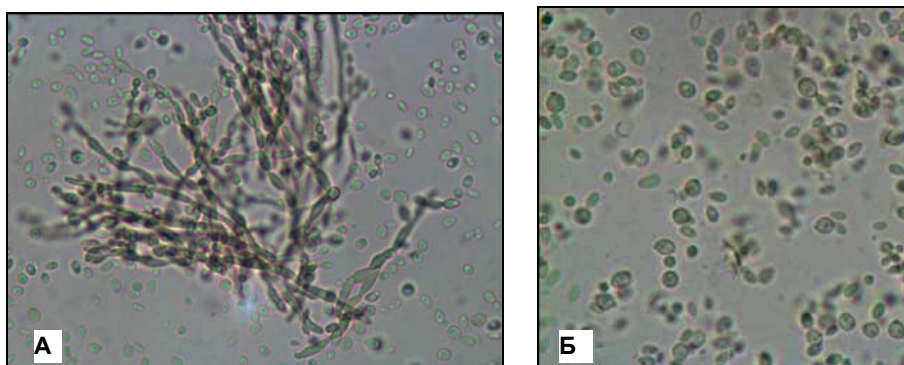


Рис. 3. Дріжджові клітини та псевдоміцелії *Exophiala alcalophila* під впливом ефірної олії *Pelargonium roseum* 50% (А), Б – контроль, $\times 400$

В попередніх дослідженнях нами було показано, що подібні диморфні переходи "міцелій-дріжджі", зміни морфометричних показників клітин, морфології колоній та інтенсивності брунькування були характерні для *E. alcalophila* ЕО як адаптивні реакції-відповіді в умовах антифунгального впливу ЕО *Rosmarinum officinalis* та біоциду полігексаметиленгуанідін-фосфату [20].

Здатність до структурно-функціональної реорганізації за даними літератури, є одним із проявів адаптивних реакцій мікроскопічних грибів в умовах дії стресових факторів або несприятливих умов середовища [28].

Дослідження індукованого переходу "міцелій→дріжджі" під дією ряду морфогенів на прикладі *Phaeoascus myceliophorus exophialae* de Hoog дозволив показати авторам можливість передачі сигналу з оточуючого середовища через аденілат циклазну систему (сAMP) та фосфоінозитидний шлях (за участі Ca) та довести, що саме ці посередники відіграють головну роль швидких динамічних змінних у клітинах чорного диморфного гриба *Ph. exophialae* [28, 29]. У науковій літературі є також нечисленні дослідження, що свідчать про вплив ефірних олій на структурно-функціональну реорганізацію диморф-

них грибів. Так, за даними, Rajkowska [30] ефірна олія *Thymus vulgaris* здатна стимулювати утворення псевдоміцелію у *Candida albicans*.

Адаптація живих об'єктів до змін умов існування є прикладом самоорганізації, так як супроводжується такими процесами як збільшення та ускладнення елементів, що складають систему, зміна режимів її функціонування. Диморфізм широко розповсюджений серед грибів, що викликають системні мікози у людини та тварин (*Exophiala dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Histoplasma capsulatum*, *Candida albicans*, *Sporothrix schenckii*) і визначений як умова існування дріжджової паразитичної та міцеліальної сапротрофної фаз [28, 29]. Оскільки певна відповідна форма клітини може бути поєднана із вірулентністю, встановлення індукуючих факторів диморфних переходів має важливе практичне значення для медицини.

Висновки. Отримані результати дають підстави розглядати рослинні ефірні олії, а також біоцид бензалконіум хлорид як перспективні речовини для створення різноманітних препаратів антифунгальної дії щодо чорних дріжджоподібних грибів. Здатність *E. alcalophila* під впливом ефірних олій та біоциду до структурно-функціональної реорганізації (фазового переходу "дріжджі→міцелій") є проявом адаптивної реакції-відповіді ЧДГ в умовах дії такого стресового фактору як фунгіциди. Ефірні олії *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris*, *Pelargonium roseum* та *Cariophyllus aromaticus* є найперспективнішими для подальших досліджень.

Список використаних джерел

1. Sterflinger K. Black Yeasts and Meristematic Fungi: Ecology, Diversity and Identification / K. Sterflinger // Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. The Yeast Handbook. – 2006. – P. 501–514. Available from: http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F3-540-30985-3_20
2. <http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>
3. De Hoog G.S. Waterborne *Exophiala* species causing disease in cold-blooded animals / G.S. de Hoog, V.A. Vicente, M.J. Najafzadeh, M.J. Harrak, H. Badali, S. Seyedmousavi // Persoonia. – 2011. – 27. – P. 46–72. doi: 10.3767/003158511X614258
4. Богомолова Е.В. Морфометрическое сравнение сери штаммов диморфных черных дрожжей *Phaeococcomyces exophialae* / Е.В. Богомолова, Д.Ю. Власов, Л.К. Панина // Микология и фитопатология. – 2000. – Т.34, Вып. 2. – С. 40–47.
5. Hamada N. Comparison of fungi found in bathrooms and sinks / N.Hamada, N. Abe // Biocontrol Science. – 2010. – V. 15. – P. 51–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20616432>
6. Zalar P. Dishwashers – a man-made ecological niche accommodating human opportunistic fungal pathogens / P. Zalar, M. Novak, G.S. de Hoog, N. Gunde-Cimerman // Fungal Biol. – 2011. – Oct; 115(10). – P. 997–1007. doi:10.1016/j.funbio.2011.04.007
7. Döğen Aylin Dishwashers are a major source of human opportunistic yeast-like fungi in indoor environments in Mersin, Turkey / Aylin Döğen, Engin Kaplan, Zehra Öksüz, Mehmet Sami Serin, Macit İlkit, G. Sybren de Hoog // Med. Mycol. – 2013. – 51 (5). – P. 493–498. doi:10.3109/13693786.2012.738313
8. Саттон Д. Определитель патогенных и условно-патогенных грибов. / Д. Саттон, А. Фотергилл, М. Ринальди / Под ред. д-ра мед. наук И.П. Дорожковой. – М., 2001. – 468 с.
9. Озерская С.М. Патогенные грибы: категоризация биологического риска и разнообразие / С.М. Озерская, Н.Е. Иванушкина, Г.А. Кочкина / В кн.: Успехи мед. микол./Под ред. Ю.В. Сергеева – М., 2007. – Т. 1. – С. 268–282.
10. Matos T. High prevalence of the neurotrope *Exophiala dermatitidis* and related oligotrophic black yeasts in sauna facilities / T. Matos, G.S. de Hoog, A.G. de Boer, I. de Crom, G. Haase // Mycoses. – 2002. – V. 45. – P. 373–377. doi: 10.1046/j.1439-0507.2002.00779.x
11. Lian X., de Hoog G.S. Indoor wet cells harbour melanized agents of cutaneous infection / X. Lian, G.S. de Hoog // Med. Mycol. – 2010. – 48, N 4. – P. 622–628. doi: 10.3109/13693780903405774.
12. Бадалян С.М. Исследование природных противогрибковых средств растительного происхождения / С.М. Бадалян, А.В. Топчян // Успехи мед. микологии. – М., 2003. – С. 88–90.
13. Ермакова Т.С. Антимикотическое действие эфирных масел на дрожжеподобные и плесневые грибы / Т.С. Ермакова, Л.П. Титов // Успехи мед. микологии. – М., 2003. – С. 95–96.
14. Быкова Л.П. Противогрибковая активность некоторых эфирных масел / Л.П. Быкова, О.А. Седельникова, Ю.В. Корначева, А.П. Годовалов // Проблемы мед. микологии. – 2011, Т.13. – № 2. – С. 66–67.
15. Cox S.D. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil) / S.D. Cox, C.M. Mann, J.L. Markham, H.C. Bell, J.E. Gustafson, J.R. Warrington, S.G. Wyllie // J. Appl. Microbiol. – 2000. – V. 88. – P. 170–175. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10735256>
16. Giordani R. Action anticandidosique des huiles essentielles : leur utilisation concomitante avec des médicaments antifongiques / R. Giordani, J. Kaloustian // Phytothérapie. – August 2006. – V. 4, Issue 3. – P. 121–124. Available from: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10298-006-0165-7>
17. Кондратюк Т.А. Биопленка на синтетических полимерных материалах в условиях повышенной влажности помещений / Т.А. Кондратюк // Иммунология, алергология, інфектологія – 2010, Т. 1. – С. 65–66.
18. Кондратюк Т. Чорні дріжджоподібні гриби *Exophiala alcalophila* Goto et Sugly із пошкодженого герметика в умовах високої вологості приміщень / Т. Кондратюк // Modern Phytomorphology – 2013. – Т.3. – С. 225–229.
19. Кондратюк Т.О., Джеонг М.-Х., Хо Дж.-С., Кондратюк С.Я. Філогенетичний аналіз мікроскопічних грибів родів *Cladosporium* та *Exophiala* за ядерною ДНК / Т.О. Кондратюк, М.-Х. Джеонг, Дж.-С. Хо, С.Я. Кондратюк // Молекулярна філогенія і сучасна таксономія наземних спорівих рослин. – Київ, 2013. – С. 80–95.
20. Кондратюк Т. Вплив ефірних олій та полігексаметиленгуанідину на чорні дріжджоподібні гриби *Exophiala alcalophila* / Т. Кондратюк, А. Калиніченко // Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка, серія "Біологія". – 2014. – Т. 3(68). – С. 75–79.
21. Фитонциды в медицине / Отв. ред. А.М. Гродзинский. – Киев, 1990. – 216 с.
22. Manohar Vijaya Antifungal activities of origanum oil against *Candida albicans* / Vijaya Manohar, Cass Ingram, Judy Gray, Nadeem A. Talpur, Bobby W. Echard, Debasis Bagchi, Aray G. Preuss // Molecular and Cellular Biochemistry. – December 2001. – V. 228, Issue 1–2. – P. 111–117. doi: 10.1023/A:1013311632207
23. Bakkali F. Biological effects of essential oils – A review / F. Bakkali, S. Averbeck, D. Averbeck, M. Idaomar // Food and Chemical Toxicology. – February 2008. – V.46, Issue 2. – P. 446–475. doi:10.1016/j.fct.2007.09.106
24. Nenoff P. Antifungal Activity of the Essential Oil of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree Oil) against Pathogenic Fungi in vitro / P. Nenoff U.F. Haustein, W. Brandt // Skin Pharmacol. – 1996. – V.9. – P. 388–394. doi:10.1159/000211450
25. Mondello F. In vivo activity of terpinen-4-ol, the main bioactive component of *Melaleuca alternifolia* Cheel (tea tree) oil against azole-susceptible and -resistant human pathogenic *Candida* species / F. Mondello, Flavia de Bernardis, Antonietta Girolamo, Antonio Cassone, Giuseppe Salvatore // BMC Infectious Diseases – 2006. – V. 6. – P. 158. doi:10.1186/1471-2334-6-158
26. Kim Ji-Hyun In vivo anti-fungal activity of the essential oil fraction from *Thymus* species and in vitro synergism with Clotrimazole / Ji-Hyun Kim, Seungwon Shin // Natural Product Sciences. – 2007. – V. 13, № 3. – P. 258–262. Available from: http://210.101.116.28/W_files/kiss2/05004329_pv.pdf
27. Abe S. Anti- *Candida albicans* activity of essential oils including Lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil and its component, citral / S. Abe, Y. Sato, S. Inoue, H. Ishibashi, N. Maruyama, T. Takizawa, H. Oshima, H. Yamaguchi // Japanese J. of Medical Mycology. – 2003. – V.44(4). – P. 285–291. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14615795>
28. Панина Л.К. Структурно-функциональная реорганизация микроорганизмов в процессах формообразования и роста на труднодоступных субстратах / Л.К. Панина [диссертация] Санкт-Петербург: СПб-й Гос. университет; 2000. – Россия.
29. Bogomolova E.V. On the nature of the microcolonial morphology of epilithic black yeasts *Phaeococcomyces* de Hoog / E.V. Bogomolova, D.Yu. Vlasov, L.K. Pанина // Doklady of Russian Academy of Sciences. – 1998. – V. 363, № 5. – P. 707–709.
30. Rajkowska K. The effect of thyme and tea tree oils on morphology and metabolism of *Candida albicans* / Rajkowska K., A. Kunicka-Styczyńska, M. Maroszyńska, M. Dąbrowska // Acta Biochimica Polonica. – 2014. – Vol. 61, No 2/2014 – P. 305–310. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24918492>

Надійшла до редколегії 09.12.15

Т. Кондратюк, канд. биол. наук, А. Калиніченко, студ.
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ РЕОРГАНИЗАЦИЯ ДИМОРФНЫХ ЧОРНЫХ ДРОЖЖЕЙ *EXOPHIALA ALCALOPHILA* ПОД ВЛИЯНИЕМ РАСТИТЕЛЬНЫХ ЭФИРНЫХ МАСЕЛ

Исследовано антифунгальное влияние растительных эфирных масел *Cariophyllus aromaticus* L., *Foeniculum vulgare* Mill., *Lavandula angustifolia* Mill., *Mentha piperita* L., *Melaleuca alternifolia* Maid., *Origanum vulgare* L., *Pelargonium roseum* Wild., *Thymus vulgaris* L. у биоцида бензалкония хлорида на черные дрожжи *Exophiala alcalophila* Goto et Sugiy. С использованием диско-диффузионного метода установлено

высокий уровень антифунгальной активности *O. vulgare*, *Th. vulgaris*, *P. roseum* и *C. aromaticus*. По степени антифунгального действия на *E. alcalophila* указанные эфирные масла (без разведения и в концентрации 75%) подобны влиянию 3%-ого бензалкония хлорида. Показано, что под влиянием бензалкония хлорида и эфирных масел *O. vulgare*, *Th. vulgaris*, *P. roseum*, *C. aromaticus* происходит структурно-функциональная реорганизация *E. alcalophila*: меняются морфометрические показатели клеток, морфология колоний, интенсивность почкования, происходит диморфный переход *E. alcalophila* "дрожжи – мицелий". Указанные изменения являются проявлением широких адаптационных свойств исследованной культуры черных дрожжей.

Ключевые слова: черные дрожжеподобные грибы, растительные эфирные масла, антифунгальное влияние, адаптационные изменения.

T. Kondratiuk, PhD, A. Kalinichenko, stud.

Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

STRUCTURAL-FUNCTIONAL REORGANIZATION OF DIMORPHOUS BLACK YEAST-LIKE FUNGI *EXOPHIALA ALCALOPHILA* UNDER INFLUENCE OF PLANT ESSENTIAL OILS

Antifungal influence of essential oils of the following plants *Cariophyllus aromaticus* L., *Foeniculum vulgare* Mill., *Lavandula angustifolia* Mill., *Mentha piperita* L., *Melaleuca alternifolia* Maid., *Origanum vulgare* L., *Pelargonium roseum* Wild., *Thymus vulgaris* L., and benzalconium chloride on black yeast-like fungi *Exophiala alcalophila* Goto et Sugiy was investigated. High level of the antifungal influence of plant oils of *O. vulgare*, *Th. vulgaris*, *P. roseum* and *C. aromaticus* was found with the usage of disc-diffusion method. The influence of plant essential oils mentioned is similar to influence of 3% benzalconium chloride. The following structural-functional reorganization of *Exophiala alcalophila*, i.e.: exchange of morphometric indices of cells, colony morphology, intensity of budding, dimorphous transition 'yeast-mycelium' were observed under influence of benzalconium chloride and plant essential oils of *O. vulgare*, *Th. vulgaris*, *P. roseum* and *C. aromaticus*. These exchanges illustrate wide adaptation possibilities of black yeast culture investigated.

Key words: black yeast fungi, plant essential oils, antifungal influence, adaptation exchanges.

УДК 001.8:539.5:591.85:591.3

О. Яценко, старший викладач
Національний технічний університет "КПІ", Київ

ЕРИТРОМЕТРИЯ У ВИВЧЕННІ АДАПТИВНИХ ТА РЕАКТИВНИХ СТАНІВ СПОРТСМЕНІВ ВПРОДОВЖ ТРЕНУВАЛЬНОГО ПРОЦЕСУ

Проведено аналіз індивідуальних особливостей змін показника мінливості еритроцитів (ПМЕ) та співвідношення різних типів клітин еритроциту у обстежених баскетболістів впродовж тренувального процесу. Всього було обстежено 7 спортсменів впродовж 13-16 тижнів тренувального процесу. В отриманих незабарвлених мазках крові розраховували показник мінливості еритроцитів (ПМЕ) шляхом підрахунку 15 груп еритроцитів, систематизованих у групи. На основі групування для кожного спортсмена впродовж зазначених періодів тренування будувались графіки відсоткового вмісту різних видів еритроцитів (ВВРВЕ) в еритроциті. При вивченні особливостей стану дефінітивних компонентів еритроциту у спортсменів-баскетболістів виявлені очевидні індивідуальні особливості змін як ПМЕ, так й розподілу складових компонентів еритроциту. У обстежених спортсменів клубної команди НТУУ "КПІ" на основі обраних морфометричних засобів вивчення еритроциту встановлені індивідуальні особливості прояву реактивних, адаптивних та пристосувальних змін цілісного організму впродовж різних часових періодів тренувального процесу.

Ключові слова: еритроцит, еритрометрія, адаптація, спортсмени, тренувальний процес.

Вступ. В сучасних наукових дослідженнях цитологічні підходи з метою вивчення адаптивних та реактивних станів людини набувають все зростаючого використання. Цей підхід в повній мірі відноситься до еритрометрії, яка завдяки саме українській науковій школі за останні двадцять років широко використовується в різних експериментальних та клінічних дослідженнях (пренатальний та постнатальний онтогенез, космічна та спортивна медицина, медицина надзвичайних ситуацій та екстремальних професій) [1-7].

В даному повідомленні приведений аналіз індивідуальних особливостей змін показника мінливості еритроцитів (ПМЕ) та співвідношення різних груп клітин еритроциту у обстежених баскетболістів впродовж тренувального процесу.

Об'єкт дослідження. Незабарвлені мазки крові спортсменів баскетбольної команди НТУУ "КПІ".

Матеріал та методи дослідження. Всього було обстежено 7 спортсменів впродовж 13-16 тижнів тренувального процесу. Перед кожним тренуванням у спортсменів брали аналіз крові. З незабарвлених мазків крові ми мали можливість отримати зображення еритроцитів та застосувати методику еритрометрії, яка була розроблена автором. Її основу складає розрахунок показника мінливості еритроцитів (ПМЕ) шляхом підрахунку 15 груп еритроцитів, систематизованих в такі групи: **a** – зовні незмінні еритроцити (нормоцити), **b₁** – помірно змінні еритроцити (ехіноцит₁, ехіноцит₂), **b₂** – помірно змінні еритроцити (стоматоцит₁, стоматоцит₂, стомато-

цит₃), **b_{2'}** – помірно змінні еритроцити (мішенеподібні), **b₃** – помірно змінні еритроцити (овалоцити), **c** – група виражених змін еритроцитів (ехіноцит₃, ехіноцит₄, стоматоцит₄, сфероцит), **d** – значні зміни еритроцитів (мішенеподібні₂, дрепаноцити, акантоцити). На основі такого групування для кожного спортсмена впродовж зазначених періодів тренування будувались графіки відсоткового вмісту різних видів еритроцитів (ВВРВЕ) в еритроциті. Загальна оцінка ПМЕ здійснювалась за шкалою: "норма" – 0 < ПМЕ < 0,5; "незначні зміни" – 0,51 < ПМЕ < 1,5; "помірні зміни" – 1,51 < ПМЕ < 2,5; "виражені зміни" – 2,51 < ПМЕ < 5,0; "значні зміни" – ПМЕ > 5,0.

Отримані результати. При вивченні особливостей стану дефінітивних компонентів еритроциту у спортсменів-баскетболістів виявлені очевидні індивідуальні особливості змін як ПМЕ, так й розподілу складових компонентів еритроциту. У цьому аспекті обстежені баскетболісти були поділені на три групи (I, II, III), детальний аналіз яких приведений в раніше виконаних дослідженнях [6].

Для I групи (приклад – Баскетболіст № 2) було характерним високе стартове (на момент першого забору крові) значення ПМЕ – на рівні "виражені зміни" еритроциту, що виключає допуск спортсмена до напружених навантажень і він потребує реабілітаційних заходів. В конкретному випадку є можливим констатувати, що лише з четвертого тижня помірних тренувань (ПМЕ = 0.75) спортсмен може залучатись до інтенсивних тренувань перед змаганнями (рис. 1).

Баскетболіст № 2, 18 років



Рис. 1. Динаміка зміни PME у Баскетболіста № 2 протягом 16 тижнів спостереження (І група)

Між тим, звертає на себе увагу той факт, що у цього баскетболіста динаміка відсоткового вмісту різних форм еритрону (ВВРВЕ) мала наступні особливості: стартовий високий рівень клітин типу b_2 в перший тиждень тренування, з послідовним зменшенням його до друго-

го тижня тренувань, в той час як рівень нормоцитів в цей період інтенсивно підвищувався фактично на протязі всього періоду тренування, досягаючи максимуму саме з четвертого тижня тренувань (рис. 2).

Відсотковий вміст різних форм еритроцитів у спортсмена Баскетболіста № 2

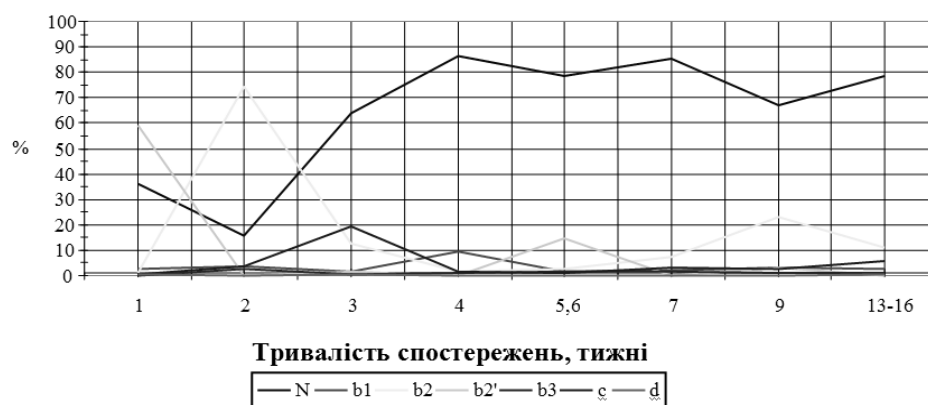


Рис. 2. Динаміка зміни ВВРВЕ у спортсмена Баскетболіста № 2 протягом 16 тижнів спостереження (І група)

Подальші порівняльні дослідження надали можливість виявити помітні індивідуальні особливості в динаміці показників, які вивчались, у інших спортсменів. Так, у баскетболіста №3 динаміка змін PME в цілому

практично співпадала з такою ж у Баскетболіста № 2 (див. рис 1 та рис.3). Насамперед це стосується рівня PME обох спортсменів впродовж 1-4 тижнів тренувального процесу.

Баскетболіст № 3, 19 років



Рис. 3. Динаміка зміни PME у Баскетболіста № 3 на протязі 16 тижнів спостереження (І група)

Але, на відміну від останнього у баскетболіста № 3 незвичайною проявилась динаміка ВВРВЕ з боку показника групи b_2 (рис. 4). Практично з першого до шостого тижня цей показник знижувався ритмічно чотирма фазами: перша фаза – 1-й – 2-й тиждень; друга фаза – 2-й – 3-й тиждень; третя фаза – 3-й – 4-й тиждень мало місце помірне його підвищення; четверта фаза – 4-й –

6 тиждень – остаточне зниження цього показника. Якщо врахувати, що ця група цілком представлена клітинами різного типу стоматоцитів (стоматоцит₁, стоматоцит₂, стоматоцит₃), то слід вважати, що ця реакція пов'язана з водним дисбалансом у спортсмена. На користь такого висновку свідчить також динаміка змін ВВРВЕ групи b_1 – помірно змінені еритроцити (ехіноцит₁, ехіноцит₂).

Відсотковий вміст різних форм еритроцитів у спортсмена Баскетболіста № 3



Рис. 4. Динаміка ВВРВЕ у Баскетболіста № 3 протягом 16 тижнів спостереження (I група)

На відміну від попередніх спостережень у баскетболіста № 5 були встановлені наступні особливості в динаміці показників, що вивчались, з урахуванням того факту, що цей спортсмен за динамікою змін ПМЕ теж

був віднесений до другої групи (рис. 5). Помітно, що динаміка змін ПМЕ у даного спортсмена в середньому коливається в межах "помірні зміни" – $1,51 < \text{ПМЕ} < 2,5$.

Баскетболіст № 5, 19 років



Рис. 5. Динаміка зміни ПМЕ у Баскетболіста № 5 протягом 16 тижнів спостереження (II група)

Поряд з цим у даного спортсмена показник ВВРВЕ демонструє повністю інший "калейдоскоп" в динаміці змін кількості еритроцитів всіх вивчених груп клітин

еритрону (a , b_1 , b_2 , b_2' , b_3 , c та d), в чому читач може з легкістю переконатись, розглянувши рис. 6, що автор пропонує йому зробити у самостійному режимі.

Відсотковий вміст різних форм еритроцитів у спортсмена Баскетболіста № 5

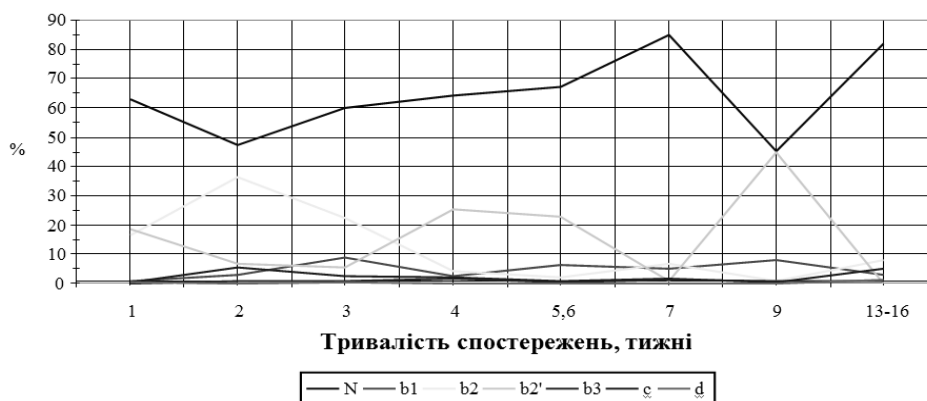


Рис. 6. Динаміка ВВРВЕ у Баскетболіста № 5 на протязі 16 тижнів спостереження (II група)

Таким чином, представлені матеріали свідчать про те, що цитологічний підхід до системного дослідження динаміки змін НМЕ та ВВРВЕ суттєво розширює представлення як лікаря, так і тренера щодо стану реактивних та пристосувальних резервів спортсмена на різних етапах тренувального процесу.

З урахуванням того факту, що результати проведених аналізів доводились до відома тренера – наставника за добу до наступного періоду тренувального періоду, то це давало йому можливість змінювати навантаження даному спортсмену або в бік підвищення навантаження, або цей спортсмен більшу частину тренувального процесу знаходився в "ролі" запасного гравця.

Особливий інтерес набувають дані відносно індивідуальних для кожного спортсмена динаміки показника ВВРВЕ. Окрім наведених в статті прикладів, загальна картина цих змін у інших обстежених спортсменів виглядає наступним чином. Так, у спортсмена № 1 стартові значення ВВРВЕ характеризувались наявністю еритроцитів групи b_2 (помірно змінені еритроцити (мішенеподібні). Одже вже на третьому тижні тренування у цього спортсмена в показнику ВВРВЕ було відмічено підвищення кількості еритроцитів групи b_2 (стоматоцит₁, стоматоцит₂, стоматоцит₃). Такий реактивний стан організму цього та інших спортсменів пояснювався як наслідок зневоднення організму у зв'язку зі зростанням навантаження на тренуванні.

Висновки.

1. Автором розроблені та запропоновані цитологічні підходи до вивчення закономірностей змін кількісних параметрів еритроциту (ПМЕ та ВВРВЕ) з метою вивчення реактивних та пристосувальних властивостей спортсменів баскетболістів впродовж тренувального процесу.

2. У обстежених спортсменів клубної команди НТУУ "КПІ" на основі обраних морфометричних засобів вивчення еритроциту встановлені індивідуальні особливості прояву реактивних, адаптивних та пристосувальних змін цілісного організму на протязі різних часових періодів тренувального процесу.

3. Для кожного спортсмена встановлені особливості в розподілі запропонованих групових ознак еритроциту (a , b_1 , b_2 , b_3 , c та d) на різних етапах тренувального процесу та на цих засадах розроблені рекомендації для тренерів та лікарів клубної команди щодо рівня навантаження кожного спортсмена на протязі тренувального процесу.

Перспективи подальших досліджень.

Проведені автором дослідження є перспективними з точки зору можливості впровадження запропонованих методів в практику роботи спортивних команд різного

профілю у вищих навчальних закладах України та особливо для студентської молоді, яка обирає заняття спортом не лише задля покращення здоров'я, але й з метою досягнення певних спортивних результатів.

Поряд з цим заслуговує на увагу можливість використання отриманих автором даних серед чисельних юнацьких клубних команд з метою вдосконалення моніторингу здоров'я спортсменів як під час тренувального процесу, так й під час змагань. Відомо, що лише в м. Києві працює 29 баскетбольних юнацьких клубів (<http://www.7sport.com.ua/>), а загальна кількість клубів та секцій з інших видів спорту перевищує за 500.

Крім того, з огляду на значну тривогу практично всіх країн світу щодо раптової смерті спортсменів [8-9], отримані автором дані дозволяють прогнозувати можливість проведення наукових досліджень й в цьому напрямку.

Список використаної літератури

1. Яценко О.В., Яценко В.П. Морфометрический метод оценки состояния красной крови на основе программно – аппаратных средств обработки видеоизображений неокрашенных эритроцитов: міжн. наук.-техн. конф. ["ABIA-2001"]. – К. : 36-39 с.
2. Яценко О. В. Морфометричне дослідження модифікованих зображень еритроцитів – новий підхід до оцінки реактивних та адаптивних змін організму: матеріали IV науково-практичної конф. "Актуальні проблеми експериментальної медицини, (Київ, 27-28 травня 2002 р.). / В. І. Варус, О. В. Яценко, О. В. Буднік // М-во охор. здоров'я, Нац. мед. ун-т ім. О. О. Богомольця. – К.: Нац. мед. ун-т ім. О. О. Богомольця, 2002. – С. 81.
3. Яценко О. В. Морфофункціональне обґрунтування алгоритму розрахунку показника мішливості еритроцитів / О. В. Яценко // Тези 58 науково-практичної конференції студентів та молодих вчених Національного медичного університету імені О. О. Богомольця з міжнародною участю "Актуальні проблеми сучасної медицини, м. Київ, Україна, 28-31 жовтня 2003 р., Київ, -2003. – С. 67-68.
4. Яценко В.П., Чекман І.С. Інформатика в лікознавстві: Стан та перспективи розвитку// IV-Міжнародний медико – фармацевтичний конгрес "Ліки та життя", Київ, 6-9 лютого 2007. – С. 119.
5. Яценко В.П., Яценко О.В. Информационные технологии в оценке адаптивных свойств специалистов экстремальных профессий. // XIV Міжнародна конференція "Інформотерапія: теоретичні аспекти та практичне застосування" м. Київ 17-19 жовтня 2008р. С.23 – 24.
6. Яценко О. В. Гісто-ембріогенетичні та інформаційні аспекти поняття дефінітивного компонента еритроциту в оцінці особливостей деформабільності еритроцитів. / В.П. Яценко, Ю. Б. Чайковський, О. В. Яценко // – Полтава : "Світ медицини та біології", номер 1, 2013. – С. 83-85.
7. Яценко О. В. Морфофункціональне обґрунтування алгоритму розрахунку показника мішливості еритроцитів. / Тези 58 науково-практичної конференції студентів та молодих вчених Національного медичного університету імені О. О. Богомольця з міжнародною участю "Актуальні проблеми сучасної медицини, м. Київ, Україна, 28-31 жовтня 2003 р., Київ. – 2003. – С. 67-68.
8. Криворученко Е.В., Красницкая О.В. Внезапная смерть в спорте. <http://lib.sportedu.ru/press/fvs/2011N1/p81-84.htm>
9. Пшеничная Е.В. Внезапная сердечная смерть у детей. <http://www.mif-ua.com/education/symposium/vnezapnaya-serdechnaya-smert-u-detej#prettyPhoto>

Надійшла до редколегії 15.12.15

Е. Яценко, старший преподаватель
Национальный технический университет "КПИ", Киев, Украина

ЭРИТРОМЕТРИЯ В ИЗУЧЕНИИ АДАПТИВНЫХ И РЕАКТИВНЫХ СОСТОЯНИЙ СПОРТСМЕНОВ НА ПРОТЯЖЕНИИ ТРЕНИРОВОЧНОГО ПРОЦЕССА

Приведено анализ индивидуальных особенностей изменений показателя изменчивости эритроцитов (ПИЭ) и соотношение различных типов клеток эритроцита у обследованных баскетболистов в течение тренировочного процесса. Всего было обследовано 7 спортсменов в течение 13-16 недель тренировочного процесса. В полученных неокрашенных мазках крови рассчитывали показатель изменчивости эритроцитов (ПИЭ) путем подсчета 15 групп эритроцитов, систематизированных в группы. На основе группировки для каждого спортсмена на протяжении указанных периодов тренировки строились графики процентного содержания различных видов эритроцитов в эритроците. При изучении особенностей состояния дефинитивных компонентов эритроцита у спортсменов-баскетболистов обнаружены очевидные индивидуальные особенности изменений как ПИЭ, так и распределения составляющих компонентов эритроцита. У обследованных спортсменов клубной команды НТУУ "КПИ" на основе выбранных морфометрических средств изучения эритроцита установлены индивидуальные особенности проявления реактивных, адаптивных и приспособительных изменений целостного организма на протяжении различных временных периодов тренировочного процесса.

Ключевые слова: эритроцит, эритрометрия, адаптация, спортсмены, тренировочный процесс.

O. Yatsenko, Senior Lecturer
National Technical University "KPI", Kiev, Ukraine

ERITROMETRIYA IN THE STUDY ADAPTIVE AND REACTIVE STATUS ATHLETES DURING TRAINING PROCESS

Bring the analysis of the individual characteristics of changes in the index variation of erythrocytes (IVE) and the ratio of different types of cells in the examined erythrocyte of the basketball players during training. A total of 7 athletes surveyed during weeks 13-16 of the training process. The

obtained unstained blood smears calculates the variability of erythrocytes (IVE) by counting the 15 types of red blood cells, classified in the group. On the basis of types for each athlete during these periods of training plotted the percentage of different types of erythrocytes in erythron. In the study of specific features of the definitive components erythron athletes-basketball players found the obvious individual characteristics change as a IVE, and the distribution of the eritron components. In the surveyed athletes club team NTU "KPI" on the basis of selected morphometric study of the eritron funds set individual characteristics manifestations of reactive, adaptive changes of the whole organism during different time periods of the training process.

Keywords: erythrocyte, eritrometriya, adaptation, athletes, the training process.

УДК 577.156:577.15.072

Г. Лабунець, пошукач
Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, Одеса

СУБСТРАТНА СПЕЦИФІЧНІСТЬ КАТЕПСИНУ *H* НЕТРАНСФОРМОВАНОЇ ТКАНИНИ ТА ТКАНИНИ ПОМІРНО ДИФЕРЕНЦІЙОВАНОЇ ФОРМИ ІНФІЛЬТРУЮЧОГО ДОЛЬКОВОГО РАКУ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ

Досліджено субстратну специфічність катепсину *H* нетрансформованої тканини та тканини помірно диференційованої форми інфільтруючого долькового раку молочної залози. Катепсин *H* нетрансформованої тканини молочної залози гідролізував синтетичні субстрати в ряду: $Bz-Gly-Phe \rightarrow Z-Phe-Ala \rightarrow Z-Glu-Tyr \rightarrow$ окситоцин на відміну від ферменту злоякісного новоутворення, який не гідролізував синтетичний дипептид $Z-Glu-Tyr$ та проявляв субстратну специфічність в ряду: $Z-Phe-Ala \rightarrow Bz-Gly-Phe \rightarrow$ окситоцин. Катепсин *H* володіє ендопептидазною протеолітичною активністю по відношенню до субстрату казеїну, більш виражену для ферменту нетрансформованої тканини молочної залози.

Ключові слова: катепсин *H*, пухлина, молочна залоза, субстратна специфічність.

Вступ. У даний час до числа найбільш актуальних напрямків сучасної медичної патології та патофізіології відносяться дослідження активності цистеїнових катепсинів за пухлинного росту. Катепсин *H* (ЕС 3.4.22.16) належить до групи цистеїнових лізосомальних протеїназ, що беруть участь у регуляції внутрішньоклітинного метаболізму протеїнів, посттрансляційній модифікації білків, диференціюванні клітин, процесах росту та старіння, активації та інактивації гормонів і нейропептидів, процесі імунної відповіді та інші [1, 2]. Катепсин *H* є амінопептидазою, однак проявляє також й ендопептидазну активність [2, 3, 4]. В екзопептидаз доступ до субстрат-зв'язуючої ділянки обмежений додатковими структурами: "заступаючими" петлями в катепсинах В [3, 5] та Х [6] або пептидними ділянками в амінопептидазах – катепсинах *H* [7]. Крім того, катепсини здійснюють процесинг різних пробілок та прогормонів таких, як наприклад, проренін [8], тиреоглобулін [9, 10] та, як припускають, залучені в утворення ендостатину під час ангиогенезу [11].

Як було показано, високий вміст катепсину *H* характерний для ряду пухлинних тканин, таких як гліобlastома та анапластична астроцитома [12], колоректальна карцинома [13] і рак молочної залози [14].

Мета роботи полягала у дослідженні субстратної специфічності катепсину *H*, який був виділений з нетрансформованої тканини та тканини помірно диференційованої форми інфільтруючого долькового раку молочної залози.

Матеріали та методи. Матеріалом для дослідження служили зразки нетрансформованої тканини та помірно диференційованої форми інфільтруючого долькового раку молочної залози.

Патоморфологічну та гістологічну верифікацію діагнозів за міжнародною класифікацією ВООЗ (Женева, 2003) з визначенням морфологічного стану та ступеню диференціювання трансформованих клітин пухлинної тканини здійснювали спеціалісти сертифікованої та ліцензійованої патоморфологічної лабораторії обласного онкологічного диспансеру м. Одеси [15]. Збереження етичних та правових норм згідно: Хельсінської декларації (1964 р), Конвенції про захист прав та достоїнств людини в зв'язку з використанням досягнень біології та медицини (Конвенція про права людини та біомедицини 1996 р.), закону України "Про трансплантацію органів та інших анатомічних матеріалів людини (1999 р.) забез-

печувалося медичним закладом, згідно договору про сумісні дослідження. Зразки тканин заморожували при -18°C безпосередньо після взяття їх при оперативному втручанні. Зразки гомогенізували у 0,9% розчині NaCl (у співвідношенні 1 : 10) та центрифугували при 9000g за хв (при $+4^{\circ}\text{C}$) протягом 30 хв.

Розчини білків, що були отримані з гомогенатів досліджуваних тканин, після діалізу (проти 10-кратного об'єму дистильованої води) піддавали поетапному фракціонуванню сульфатом амонію, при зростаючій концентрації $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ від 20% до 40%, 60% і 80% насичення. Для очищення від надлишку $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, фракції, що були отримані за 20%, 40%, 60% і 80% насичення сульфатом амонію, піддавали повторному діалізу проти 10-кратного об'єму дистильованої води.

Хроматографічний розподіл білкових розчинів нетрансформованої тканини молочної залози та тканини злоякісного новоутворення, отриманих при 80,0% насиченні сульфатом амонію, що володів максимальною активністю катепсину *H* проводили методом гел'єхроматографії з використанням сефадексу – G 75.

Субстратну специфічність катепсину *H* визначали по гідролізу: 1,0 % альбуміну, 1,0 % нативного гемоглобіну [16], 2,0 % казеїну [17, 18, 19], 0,04 мМ окситоцину та 2,0 мМ розчинів синтетичних субстратів: $Bz-Gly-Phe$, $Z-Phe-Ala$, $Z-Glu-Tyr$. Кількість відщеплюваної амінокислоти визначали за допомогою нігидричного реактиву [20, 21].

Статистичну обробку результатів досліджень проводили у відповідності з *t*-критерієм Стюдента [22]. За статистично достовірну різницю приймали рівень достовірності більше 95% ($p < 0,05$).

Результати та їх обговорення.

Субстратна специфічність є унікальною властивістю ферментів, що відрізняє їх від інших каталізаторів. Катепсин *H*, будучи типовою ендопептидазою та амінопептидазою, гідролізує пептидні зв'язки, відщеплюючи один *N*-термінальний залишок від поліпептидного ланцюга [7]. Відомо, що специфічність протеолітичних ферментів може значно змінюватися в залежності від природи досліджуваного субстрату [23].

У дослідженнях субстратної специфічності (табл. 1) було виявлено, що катепсин *H* нетрансформованої тканини та злоякісного новоутворення молочної залози гідролізує низькомолекулярні субстрати, деякі нативні білки та окситоцин ($Gly-Leu-Pro-Cys-Cys-Asn-Gln-Ile-Tyr$ [24]).

Було показано, що фермент злоякісного новоутворення володіє незначно більшою ферментативною активністю до окситоцину, ніж фермент нетрансформованої тканини молочної залози.

З літературних джерел відомо, що катепсин H переважно гідролізує пептидні зв'язки основних та гідрофобних амінокислот та не розщеплює зв'язки дикарбонових амінокислот [25]. Катепсин H нетрансформованої тканини молочної залози гідролізував синтетичні субстрати у ряду:

Bz-Gly-Phe---> Z-Phe-Ala--->Z-Glu-Tyr--->окситоцин.

На відміну від ферменту нетрансформованої тканини, фермент злоякісного новоутворення не гідролізував

синтетичний дипептид Z-Glu-Tyr та проявляв субстратну специфічність у ряду:

Z-Phe-Ala--->Bz-Gly-Phe--->окситоцин.

Отримані результати свідчать про те, що катепсин H нетрансформованої тканини молочної залози та фермент злоякісного новоутворення володіє дипептидилпептидазною активністю, що частково співпадає з результатами інших дослідників [26]. Отримані нами результати дослідження співпадають з літературними даними, в яких вказано, що катепсин H відщеплює гідрофобні N-термінальні амінокислоти [25].

Таблиця 1. Субстратна специфічність катепсину H нетрансформованої тканини та злоякісного новоутворення молочної залози (n=3)

Субстрат	Оптична щільність продуктів гідролізу субстратів, ΔЕ	
	нетрансформована тканина	*злоякісне новоутворення
Окситоцин	0,023 ± 0,0001	0,024 ± 0,0001
Bz-Gly-Phe (2,0 мМ розчин)	0,005 ± 0,0007	0,007 ± 0,0005
Z-Phe-Ala (2,0 мМ розчин)	0,007 ± 0,0005	0,008 ± 0,0007
Z-Glu-Tyr (2,0 мМ розчин)	0,013 ± 0,002	0,008 ± 0,0007
альбумін (1,0% розчин), 4 год інкубації	0	0
альбумін (1,0% розчин), 20 год інкубації	0,012 ± 0,002	0,017 ± 0,005
казеїн (2,0% розчин), 4 год інкубації	0,242 ± 0,020	0,207 ± 0,018
казеїн (2,0% розчин), 20 год інкубації	0,272 ± 0,024	0,370 ± 0,040
гемоглобін неденатурований (2,0% розчин), 4 год інкубації	0,012 ± 0,002	0,006 ± 0,0005
гемоглобін неденатурований (2,0% розчин), 20 год інкубації	0,007 ± 0,0005	0,005 ± 0,0003

Примітка:

* – помірно диференційована форма інфільтруючого долькового раку молочної залози.

Продукти гідролізу казеїну, гемоглобіну та альбуміну визначали при довжині хвилі 750 нм.

Продукти гідролізу окситоцину та синтетичних субстратів визначали за нінгидриновим методом при довжині хвилі 570 нм.

Було встановлено, що білки з великою молекулярною масою гідролізуються катепсином H нетрансформованої тканини молочної залози та злоякісного новоутворення вибірково, що співпадає з результатами інших авторів [25].

Фермент нетрансформованої тканини молочної залози і злоякісного новоутворення не гідролізував альбумін сироватки крові на протязі 4 год інкубації при 37 °С (за рН інкубаційного середовища 6,5), а збільшення терміну інкубації до 20 год призводило до прояву активності ферменту. Отримані результати частково співпадають з результатами інших дослідників, в яких було встановлено, що катепсин H не розщеплює фібронектин сироватки бика та курей [25].

За результатами дослідження було встановлено, що досліджуваний фермент володіє ендopeптидазною загальною протеолітичною активністю по відношенню до субстрату казеїну (за рН інкубаційного середовища 6,5), більш виражену для ферменту нетрансформованої тканини молочної залози.

Фермент як нетрансформованої тканини молочної залози, так і злоякісного новоутворення незначно гідролізував неденатурований гемоглобін (за рН інкубаційного середовища 6,5), а збільшення часу інкубації до 20 год призводило до 50% втрати активності ферменту нетрансформованої тканини. Отримані результати частково співпадають з результатами досліджень інших авторів, які свідчать про те, що катепсин H слабо розщеплює азоказеїн, колаген та ламінін [26].

Висновки

1. Катепсин H нетрансформованої тканини молочної залози та фермент злоякісного новоутворення володіє дипептидилпептидазною активністю.

2. Катепсин H нетрансформованої тканини молочної залози гідролізує синтетичні субстрати у ряду:

Bz-Gly-Phe---> Z-Phe-Ala--->Z-Glu-Tyr--->окситоцин,

3. Катепсин H злоякісного новоутворення не гідролізує синтетичний дипептид Z-Glu-Tyr та проявляє субстратну специфічність у ряду: Z-Phe-Ala--->Bz-Gly-Phe--->окситоцин.

4. Досліджуваний фермент володіє ендопептидазною загальною протеолітичною активністю по відношенню до субстрату казеїну, більш виражену для ферменту нетрансформованої тканини молочної залози.

Список використаних джерел

1. Васильева О. С. Изучение механизма аутокаталитической активации прокатепсина H in vitro / О. С. Васильева, В. Ю. Серебров, Б. Турк, В. Турк // Исследовано в России. – 2002. – С. 1092 – 1102.
2. Turk B. Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers / B. Turk, D. Turk, V. Turk. // Biochimica et Biophysica Acta. – 2000. – Vol. 1477. – P. 98 – 111.
3. Дилакян Э. А. Лизосомные цистеиновые протеиназы при неопластической трансформации / Э. А. Дилакян, И. В. Цветкова // Биомедицинская химия. – 2005. – №5. – С. 485 – 500.
4. Otto H. H. Cysteine Proteases and Their Inhibitors / H. H. Otto, T. Schirmeister // Chemical Reviews. – 1997. – Vol. 97, №1. – P. 133 – 172.
5. Musil D. The refined 2.15 Å X-ray crystal structure of human liver cathepsin B: the structural basis for its specificity / D. Musil, D. Zucic, D. Turk, R. Engh, I. Mayr, R. Huber, T. Popovic, V. Turk, T. Towatari, N. Katunuma, et al. // Embo Journal. – 1991. – Vol. 10, №9. – P. 2321 – 30.
6. Klemencic I. Biochemical characterization of human cathepsin X revealed that the enzyme is an exopeptidase, acting as carboxymonopeptidase or carboxydipeptidase / I. Klemencic, A. K. Carmona, M. N. Cezari et al. // European Journal of Biochemistry. – 2000. – Vol. 267. – P. 5404 – 5412.
7. Guncar G. Crystal structure of porcine cathepsin H determined at 2.1 Å resolution: location of the mini-chain C-terminal carboxyl group defines cathepsin H aminopeptidase function / G. Guncar, M. Podobnik, J. Pungercar, B. Strukelj, V. Turk, D. Turk // Structure. – 1998. – Vol. 6. – P. 51 – 61.
8. Jutras I. Prorenin processing by cathepsin B in vitro and in transfected cells / I. Jutras, T. L. Reudelhuber // FEBS Letters. – 1999. – Vol. 443 – P. 48 – 52.
9. Dunn A. D. Thyroglobulin processing by thyroidal proteases. Major sites of cleavage by cathepsin B, D and L / A. D. Dunn, H. E. Crutchfield, J. T. Dunn // Journal of Biological Chemistry. – 1991. – Vol. 266. – P. 20198 – 20204.
10. Tepel C. Cathepsin K in thyroid epithelial cells: sequence, localization and possible function in extracellular proteolysis of thyroglobulin / C. Tepel, D. Bromme, V. Herzog, K. Brix // Journal of Cell Science. – 2000. – P. 4487 – 4498.
11. Felbor U. Secreted cathepsin L generates endostatin from collagen XVIII / U. Felbor, L. Dreier, R. A. Bryant et al. // Embo Journal. – 2000. – V. 19, №6. – P. 1187 – 1194.

12. Sivaparthi M. Expression and the role of cathepsin H in human glioma progression and invasion / M. Sivaparthi, R. Sawaya, Z. Gokaslan, S. K. Chintala, J. S. Rao, K. S. Chintala // Cancer Letters. – 1996. – Vol. 104. – P. 121 – 126.
13. Del Re E. C. Alterations in cathepsin H activity and protein patterns in human colorectal carcinomas / E. C. del Re, S. Shuja, J. Cai, M. J. Murnane // The British Journal of Cancer. – 2000. – Vol. 82. – P. 1317 – 1326.
14. Gabrijelčič D. Cathepsins B, H and L in human breast carcinoma / D. Gabrijelčič, B. Svetic, D. Spaič et al. // European Journal of Clinical Chemistry and Biochemistry. – 1992. – Vol. 30. – P. 69 – 74.
15. Всемирная Организация Здравоохранения / Материалы ежегодных отчетов. Санкт-Петербург. 1981. – 286 с.
16. Anson M. L. The estimation of pepsin with hemoglobin / M. L. Anson, A. E. Mirsky // The Journal of General Physiology. – 1932. – Vol. 16, № 1. – P. 59 – 67.
17. Веремеенко К. Н. Протеолитические ферменты и их ингибиторы в клинической диагностике / К. Н. Веремеенко // Ферменты в лабораторной диагностике. – М. – 1973. – Т. 1. – С. 37 – 39.
18. Веремеенко К. Н. Протеолитические ферменты и их ингибиторы в медицине / К. Н. Веремеенко // Биохимия животных и человека. – Киев: Здоровье. – 1981. – 216 с.
19. Kunitz M. I. The determination of kaseine in the blood and urine / M. I. Kunitz // Biological Chemistry. – 1946. – Vol. 164. – P. 563 – 571.
20. Чиждова Х. Значение аминокислот в пивоварении и новые методы их определения / Х. Чиждова, П. Хофта, И. Колоухова, П. Досталек // Пиво и жизнь. – 2005. – № 2. – С. 22 – 27.
21. Олешко Г. И. Разработка унифицированной методики количественного определения суммы свободных аминокислот в лекарственном растительном сырье и экстракционных препаратах / Г. И. Олешко, Т. И. Ярыгина, Е. В. Зорина, М. Д. Решетникова // Фармация. – 2011. – № 3. – С. 14 – 17.
22. Лапач С. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / С. Н. Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич // К.: Морион. – 2000. – 320 с.
23. Виноградова Р. П. Молекулярные основы действия ферментов / Р. П. Виноградова. – Київ: Вища школа. – 1978. – 279 с.
24. Панков Ю. А. Биохимия гормонов и гормональной регуляции. М. – 1976. – С. 44 – 93.
25. Локшина Л. А. Изучение свойств и специфичности катепсина H из селезенки быка / Л. А. Локшина, О. Н. Лубкова, Т. А. Гуреева, В. Н. Орехович // Вопросы медицинской химии. – 1985. – Т. 31, № 5. – С. 125 – 130.
26. Jevnikar Zala. CTSH (cathepsin H) / Zala Jevnikar, Janko Kos // Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology. – 2008. – Vol. 12, № 2, P. 130 – 133.

Надійшла до редколегії 22.12.15

Г. Лабунец, соискатель

Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова, Одесса, Украина

СУБСТРАТНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ КАТЕПСИНА H НЕТРАНСФОРМИРОВАННОЙ ТКАНИ И ТКАНИ УМЕРЕННО ДИФФЕРЕНЦИРОВАННОЙ ФОРМЫ ИНФИЛЬТРАТИВНОГО ДОЛЬКОВОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Исследована субстратная специфичность катепсина H нетрансформированной ткани и ткани умеренно дифференцированной формы инфильтративного долькового рака молочной железы. Катепсин H нетрансформированной ткани молочной железы гидролизировал синтетические субстраты в ряде: Bz-Gly-Phe--->Z-Phe-Ala--->Z-Glu-Tyr--->окситоцин в отличие от фермента злокачественного новообразования, который не гидролизировал синтетический дипептид Z-Glu-Tyr и проявлял субстратную специфичность в ряде: Z-Phe-Ala--->Bz-Gly-Phe--->окситоцин. Катепсин H обладает эндопептидазной протеолитической активностью по отношению к субстрату казеину, более выраженной для фермента нетрансформированной ткани молочной железы.

Ключевые слова: катепсин H, опухоль, молочная железа, субстратная специфичность.

G. Labunets, applicant

Odessa National Mechnikov University, Odessa, Ukraine

SUBSTRATE SPECIFICITY OF CATHEPSIN H IN UNTRANSFORMED TISSUES OF MAMMARY GLAND AND IN TISSUES OF MODERATELY DIFFERENTIATED FORM OF LOBULAR INFILTRATING BREAST CANCER

The substrate specificity of cathepsin H in untransformed tissues of mammary gland and in tissues of moderately differentiated form of lobular infiltrating breast cancer has been investigated.

Cathepsin H from untransformed tissues of mammary gland hydrolyzed synthetic substrates in a row: Bz-Gly-Phe--->Z-Phe-Ala--->Z-Glu-Tyr--->oxytocin unlike enzyme from malignant tumor that did not hydrolyze the synthetic dipeptide Z-Glu-Tyr and revealed the substrate specificity in a row: Z-Phe-Ala--->Bz-Gly-Phe--->oxytocin. Cathepsin H has proteolytic endopeptidase activity to the substrate casein more pronounced for enzyme from untransformed tissue of mammary gland.

Key words: cathepsin H, tumor, mammary gland, substrate specificity.

УДК 517.25

К. Дворщенко, д-р біол. наук, М. Ашпін, асп.,
А. Воєйков, асп., О. Короткий, канд. біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

ДІЯ ХОНДРОЇТИНУ СУЛЬФАТУ НАТРІЮ НА ОКИСНО-АНТИОКСИДАНТНИЙ БАЛАНС У СИРОВАТЦІ КРОВІ ЩУРІВ З КАРРАГІНАН-ІНДУКОВАНИМ ЗАПАЛЕННЯМ ЗАДНЬОЇ КІНЦІВКИ

Встановлено суттєве порушення окисно-антиоксидантного балансу у сироватці крові щурів за умов каррагінанового набряку кінцівки. При цьому спостерігалось значне підвищення вмісту пероксиду водню та продуктів ліпідної пероксидації, зниження супероксиддисмутази та зростання каталазної активності. Показано, що при сумісному введенні препарату "Драстоп" та каррагінану щурам вищевказані показники суттєво відновлювались до контрольних значень.

Ключові слова: каррагінан-індуковане запалення, хондропротектор, сироватка, окисно-антиоксидантний баланс.

Вступ. Згідно даних медичної статистики третина населення світу має порушення опорно-рухового апарату, серед яких провідне місце займають хвороби суглобів. Патології кістково-суглобового апарату супроводжуються больовим синдромом, локальною гіпотрофією м'язової тканини, порушенням функціональної активності, втратою вільного руху, що знижує якість життя та може призвести до втрати працездатності та розвитку інвалідності. В зв'язку з цим вивчення патогенетичних механізмів захворювань опорно-рухового апарату та розробка методів їх лікування і профілактики є актуальним питанням сучасної біомедичної науки [1].

Патогенез ряду захворювань суглобів (ревматоїдний артрит, реактивний артрит, інфекційний артрит, ідіопатичний анкілозуючий спондилоартрит, подагричний артрит, деформуючий остеоартроз) пов'язаний з розвитком запалення. Невід'ємним компонентом запальної реакції є порушення окисно-антиоксидантної рівноваги клітин у прооксидантний бік, що призводить до розвитку окисного стресу в організмі [2, 3, 4]. Тривалі запальні процеси у суглобі здатні призводити до дегенеративних змін хрящової тканини та формуванню артрозів. В зв'язку з цим важливим є пошук препаратів, які б володіли регенераційними та протизапальними властивостями. На сьогоднішній день встановлено, що дистрофічні зміни хрящової тканини пов'язані зі зниженням вмісту специфічного компоненту хряща – хондроїтин сульфату, який забезпечує його пружність та щільність [5]. Тому дослідження властивостей засобів, основу яких складає хондроїтин сульфат, є перспективним у профілактиці та лікуванні захворювань суглобів. До таких медикаментів належить препарат "Драстоп", основною складовою частиною якого є хондроїтин сульфат.

В зв'язку з цим метою роботи було дослідити дію хондроїтину сульфату натрію (препарату "Драстоп") на окисно-антиоксидантний баланс у сироватці крові при гострому локальному запаленні задньої кінцівки щурів.

Об'єкт та методи досліджень. Дослідження проведені на білих нелінійних статевозрілих щурах-самцях масою 180-240 г з дотриманням загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (вересень 2001 року), інших міжнародних угод та національного законодавства у цій галузі. За добу до проведення експерименту тварин піддавали харчовій депривації з вільним доступом до води.

Усіх тварин розділяли на три експериментальні групи. Моделювання набряку лапи щурів викликали субплантарним введенням 0,1 мл 1% розчину каррагінану у задню праву кінцівку тварини [6]. Третій групі тварин за одну годину до введення каррагінану внутрішньом'язово вводили у терапевтичній дозі 3 мг/кг препарат "Драстоп" (об'єм речовини складав 1 мл/кг). Контрольна група щурів отримувала еквівалентну кількість фізіологічного розчину.

Вміст пероксиду водню вимірювали у системі сорбції-тол-ксилеол оранж [7]. Вміст дієнових кон'югатів визначали в гептан-ізопропанольному екстракті спектрофотометричним методом, шиффових основ – флуориметричним методом [8, 9]. Вміст ТБК-активних сполук визначали по реакції з тіобарбітуровою кислотою [10]. Оцінку активності супероксиддисмутази проводили з використанням нітросинього тетразолію [11], каталази – за зменшенням кількості H_2O_2 у розчині після інкубації за оптимальних умов [12]. Статистичну обробку результатів дослідження проводили загальноприйнятими методами варіаційної статистики [13]. Вірогідність різниці між контрольними та дослідними вимірами оцінювали за t-критерієм Ст'юдента.

Результати та їх обговорення. Запалення є основним фактором прогресування захворювань суглобів. Однією з найбільш важливих еферентних ланок запального процесу є активація вільнорадикальних процесів. Ступінь інтенсивності окисного стресу значною мірою визначає важкість перебігу та в цілому результат патології запального генезу [14, 15]. Тому нами була проведена оцінка дії препарату "Драстоп" на рівень пероксиду водню, продуктів переокисного окиснення ліпідів (ПОЛ) та активність антирадикальних ферментів у сироватці крові при гострому запаленні задньої кінцівки щурів.

Процеси ПОЛ у сироватці крові щурів оцінювали за вмістом первинних продуктів ліпідної пероксидації – дієнових кон'югатів, проміжних продуктів ПОЛ – ТБК-активних сполук та кінцевих продуктів ПОЛ – шиффових основ. Вміст дієнових кон'югатів є біохімічним показником кількості первинних продуктів ПОЛ, утворюваних за участі активних форм кисню (АФК) та вільних радикалів $L^{\cdot}$, $LO^{\cdot}$ та $LOO^{\cdot}$. Вторинні продукти ліпідної пероксидації, утворювані у ході реакції ланцюгового переокиснення, також проявляють високу реакційну здатність. Так, ТБК-активні сполуки (малоновий діальдегід та його похідні) викликають модифікацію білків та зміни у ліпідному шарі мембрани. Внаслідок окисної полімеризації модифікованих ліпідів і білків та їх зшивок утворюються кінцеві продукти ПОЛ – шиффові основи, які проявляють флюорисцентні властивості. Таким чином, за накопиченням дієнових кон'югатів можна оцінювати первинні ефекти окисного стресу, тоді як вміст шиффових основ відбиває ефективність нейтралізації продуктів вільнорадикального переокиснення у ліпідах [16].

Встановлено, що у щурів при експериментальному гострому запаленні задньої кінцівки у сироватці крові вміст пероксиду водню збільшується в 1,2 раза відносно контролю. За даних експериментальних умов, у щурів у сироватці крові вміст продуктів пероксидації ліпідів зростає: дієнових кон'югатів – в 1,6 раза, ТБК-активних сполук – в 1,4 раза та шиффових основ – в 1,3 раза порівняно з показниками контрольних тварин (табл. 1).

Таблиця 1. Вміст пероксиду водню та продуктів перекисного окиснення ліпідів у сироватці крові щурів при гострому запаленні задньої кінцівки та при введенні хондропротектора ($M \pm m$, $n = 4$)

Показник \ Групи тварин	Контроль	Карраганан	Карраганан + хондропротектор
Пероксид водню, $\mu\text{моль} \times \text{мг білка}^{-1}$	$0,344 \pm 0,026$	$0,413 \pm 0,042^*$	$0,327 \pm 0,031^\#$
Дієнові кон'югати, $\text{нмоль} \times \text{мг білка}^{-1}$	$43,78 \pm 4,16$	$71,03 \pm 7,24^*$	$55,04 \pm 5,49^{*\#}$
ТБК-активні сполуки, $\text{нмоль} \times \text{мг білка}^{-1}$	$17,75 \pm 1,71$	$25,18 \pm 2,46^*$	$18,23 \pm 1,85^\#$
Шиффові основи, $\text{ум. од.} \times \text{мг білка}^{-1}$	$3,71 \pm 0,34$	$4,81 \pm 0,48^*$	$3,52 \pm 0,36^\#$

* – $p < 0,05$ відносно контролю; # – $p < 0,05$ відносно групи тварин, яким вводили хондропротектор

При введенні препарату "Драстоп" щурам з експериментальною моделлю гострого локального запалення в сироватці крові спостерігається відновлення до контрольних значень досліджуваних показників: знижується вміст пероксиду водню та дієнових кон'югатів – в 1,3 раза, ТБК-активних сполук та шиффових основ – в 1,4 раза відносно групи тварин з карраганан-індукованим локальним запаленням (табл. 1).

Встановлене надмірне утворення продуктів ПОЛ свідчить про зниження роботи антиоксидантної системи. Першою лінією антиоксидантного захисту є кооператив-

на робота антирадикальних ферментів – супероксиддисмутази та каталази, які функціонують сумісно, забезпечуючи підтримку стаціонарного рівня концентрації вільних радикалів. Супероксиддисмутаза каталізує дисмутацію аніон-радикалу кисню в пероксид водню, а каталаза здійснює розщеплення пероксиду водню до води.

При оцінці антиоксидантної системи у сироватці крові щурів при експериментальному гострому запаленні задньої кінцівки показано зниження супероксиддисмутазної активності – в 1,2 раза та зростання каталазної активності – в 3,4 раза відносно групи контрольних щурів (табл. 2).

Таблиця 2. Активність антирадикальних ферментів у сироватці крові щурів при гострому запаленні задньої кінцівки та при введенні хондропротектора ($M \pm m$, $n = 4$)

Показник \ Групи тварин	Контроль	Карраганан	Карраганан + хондропротектор
Супероксиддисмутазна активність, $\text{ум. од.} \times \text{хв}^{-1} \times \text{мг білка}^{-1}$	$0,083 \pm 0,008$	$0,067 \pm 0,006^*$	$0,072 \pm 0,007$
Каталазна активність, $\text{нмоль} \times \text{хв}^{-1} \times \text{мг білка}^{-1}$	$2,09 \pm 0,23$	$7,15 \pm 0,74^*$	$4,08 \pm 0,39^{*\#}$

* – $p < 0,05$ відносно контролю; # – $p < 0,05$ відносно групи тварин, яким вводили хондропротектор

Виявлено, що у групі щурів, яким вводили хондропротектор, у сироватці крові активність досліджуваних ферментів відновлюється: супероксиддисмутазна активність – в межах контрольних значень, а каталазна активність знижується в 1,8 раза порівняно з групою тварин з експериментальною моделлю гострого локального запалення (табл. 2).

Згідно отриманих результатів експериментальних досліджень показано, що при гострому запальному процесі у сироватці крові щурів спостерігається зсув окисно-антиоксидантної рівноваги у прооксидантний бік, що призводить до розвитку окисного стресу, який в свою чергу сприяє пошкодженню тканин організму. Оскільки відомо, що продукти ПОЛ є маркерами екссудативно-деструктивного запалення, які з одного боку, виконують роль регуляторів запального процесу, а з іншого – цитотоксичних факторів, що роблять внесок у розвиток гнійно-запальних ускладнень.

Висновки. Таким чином, за результатами досліджень розвиток гострого локального запалення задньої кінцівки, індукованого введенням флогогену каррагану, у сироватці крові супроводжується активацією процесів вільнорадикального окиснення, про що свідчить посилення утворення АФК (пероксиду водню) та накопичення продуктів ліпідної пероксидації на фоні змін супероксиддисмутазної і каталазної активностей.

Виявлено, що введення хондропротектора "Драстоп" щурам з експериментальною моделлю гострого локального запалення сприяє відновленню окисно-антиоксидантної рівноваги в сироватці крові, що вказує на антизапальні та антиоксидантні властивості досліджуваного препарату. Протекторна ефективність пре-

парату "Драстоп" потребує подальших досліджень, для встановлення молекулярних механізмів його дії на організм в умовах розвитку запальних процесів опорно-рухового апарату.

Список використаної літератури

1. Poole A.R. Osteoarthritis as a whole joint disease // Hospital for Special Surgery Journal. – 2012. – Vol. 8, №1. – P. 4–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
2. Goldring M.B. Inflammation in osteoarthritis / Goldring M.B., Otero M. // Current Opinion Rheumatology – 2011. – Vol. 23, №5. – P. 471–478. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
3. Moon S.J. Rebamipide attenuates pain severity and cartilage degeneration in a rat model of osteoarthritis by downregulating oxidative damage and catabolic activity in chondrocytes / Moon S.J., Woo Y.J., Jeong J.H. et al // Osteoarthritis Cartilage. – 2012. – Vol. 20, №11. – P. 1426–1438. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
4. Orlowsky E.W. The role of innate immunity in osteoarthritis: when our first line of defense goes on the offensive / Orlowsky E.W., Kraus V.B. // Journal Rheumatology. – 2015. – Vol. 42, №3. – P. 363–371. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
5. Ishimaru D. Alterations in the chondroitin sulfate chain in human osteoarthritic cartilage of the knee / Ishimaru D., Sugiura N., Akiyama H. et al. // Osteoarthritis Cartilage. – 2014. – Vol. 22, №2. – P. 250–258. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
6. Morris C.J. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse / Morris C.J. // Methods Molecular Biology – 2003. – Vol. 225. – P. 115–121. Available from: <http://link.springer.com/protocol/10.1385/1-59259-374-7%3A115>
7. Nourooz-Zadeh J. Measurement of plasma hydroperoxide concentrations by the ferrous oxidation – Xylenol Orange assay / J. Nourooz-Zadeh, J. Tajaddini-Sarmadi, S.P. Wolff // Analytical Biochemistry – 1994. – Vol. 220. – P. 403–409. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003269784713571>
8. Гаврилов В.Б. Измерение диеновых конъюгатов в плазме крови по УФ-поглощению гептановых и изопропанольных экстрактов / Гаврилов В.Б., Гаврилова А.Р., Хмара Н.Ф. // Лабораторное дело. – 1988. – № 2. – С. 60–63.
9. Колесова О.Е. Перекисное окисление липидов и методы определения продуктов липопероксидации в биологических средах / Ко-

сова О.Е., Маркин А.А., Федорова Т.Н. // Лабораторное дело. – 1984. – № 9. – С. 540-546.

10. Стальная И.Д. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты / И.Д. Стальная, Т.Г. Гаришвили // Современные методы в биохимии. – М.: Медицина, 1977. – С. 66–68. Available from: <http://www.twirpx.com/file/254926/>

11. Чевари С. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах / С. Чевари, И. Чаба, И. Секей // Лабораторное дело. – 1985. – № 11. – С. 678–681.

12. Королюк М.А. Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы/ Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. // Лабораторное дело. – 1988. – Вып 1. – С. 16-18.

13. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. – М.: Информполиграф, 2002. – 305 с. Available from: <http://www.twirpx.com/file/1440496/>

14. Меньщикова Е.Б. и др. Окислительный стресс. Патологические состояния и заболевания. – М.: Directmedia, 2013. – 215 с.

15. Lugin J. et al. The role of oxidative stress during inflammatory processes/ Lugin J. et al. // Biological chemistry. – 2014. – Т. 395. – №2. – С. 203-230. Available from: <http://www.ff.uil.pt/FCT/PTDC/BIM-MET/3262/2014/7.pdf>

16. Higdon A. Cell signalling by reactive lipid species: new concepts and molecular mechanisms/ Higdon A., Diers A.R., Oh J.Y. et al. // Biochemistry Journal. – 2012. – Vol. 442, Pt. 3. – P. 453–464. Available from: <http://www.biochemj.org/content/442/3/453.long>

Надійшла до редколегії 16.09.15

Е. Дворщенко, д-р биол. наук, Н. Ашпин, асп., А. Воейков, асп., А. Короткий, канд. биол. наук
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

ДЕЙСТВИЕ ХОНДРОИТИНА СУЛЬФАТА НАТРИЯ НА ОКИСЛИТЕЛЬНО-АНТИОКСИДАНТНЫЙ БАЛАНС В СЫВОРОТКЕ КРОВИ КРЫС С КАРРАГИНАН-ИНДУЦИРОВАННЫМ ВОСПАЛЕНИЕМ ЗАДНЕЙ КОНЕЧНОСТИ

Установлено существенное нарушение окислительно-антиокислительного равновесия в сыворотке крови крыс при каррагинановом отеке лапы. При этом наблюдалось значительное повышение содержания перекиси водорода и продуктов липидной перекисидации, понижение супероксиддисмутазной активности, а также возрастание каталазной активности. Показано, что при одновременном введении препарата "Драстоп" и каррагинана крысам вышеуказанные показатели существенно восстанавливались до контрольных значений.

Ключевые слова: каррагинан-индуцированное воспаление, хондропротектор, сыворотка, окислительно-антиокислительный баланс.

K. Dvorshchenko, DSc., M. Ashpin, PhD stud., A. Voeikov, PhD stud., O. Korotkyi, PhD.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

THE EFFECT CHONDROITIN SODIUM SULFATE ON OXIDATION-ANTIOXIDANT BALANCE IN THE BLOOD SERUM OF CARRAGEENAN-INDUCED INFLAMMATION IN THE RAT HINDPAW

The significant violation of pro-/antioxidative balance in serum of carrageenan-induced inflammation in the rat paw was established. It was associated with increased levels of hydrogen peroxide and lipid peroxidation products, as well as with elevated catalase and decreased superoxide dismutase activity. All above mentioned indices was closer to control values in animals treated simultaneously with carrageenan and drug "Drastop".

Keywords: carrageenan-induced inflammation, chondroprotector, serum, oxidative-antioxidant balance.

УДК 575.17

О. Утевская, канд. биол. наук, Л. Атраментова, д-р биол. наук
Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина, Харьков,
Е. Балановская, д-р биол. наук
ФГБНУ "Медико-генетический научный центр", Москва, Россия,
О. Балановский, д-р биол. наук
Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН, Москва, Россия

ИЗМЕНЧИВОСТЬ STR ЛОКУСОВ Y-ХРОМОСОМЫ В ПОПУЛЯЦИЯХ УКРАИНЦЕВ

Получены частоты гаплотипов по 17 STR локусам Y-хромосомы для 1151 образца ДНК коренных украинцев из 13 областных популяций, представляющих основные территориальные подразделения Украины. Межпопуляционные различия по совокупности исследованных Y-STR маркеров незначительны. Внутриукраинская дифференциация наиболее выражена между группами популяций, представляющих Полесье, левобережную и правобережную лесостепь. Наиболее высокая дисперсия микросателлитных повторов наблюдается по краям этнического украинского ареала – на Закарпатье, Буковине, Слобожанщине, наиболее низкая – в Полесье. Значения гаплотипического разнообразия в среднем выше в степной и лесостепной зонах, чем в Полесье или Карпатах. Общее гаплотипическое разнообразие $HD = 0,998855$, вероятность совпадения гаплотипов у двух случайно взятых из популяции неродственных мужчин $MP = 0,00114508$, мощность дискриминации $DC = 0,89400521$.

Ключевые слова: украинцы, Y-хромосома, STR маркеры, гаплотипическое разнообразие.

Введение. Микросателлитные ДНК маркеры изучаются как для решения фундаментальных процессов эволюции, так и прикладных вопросов, находя практическое применение в медицине, криминалистике и генеалогии. В популяционной и эволюционной генетике человека широко используются STR маркеры (Short Tandem Repeats), локализованные на Y-хромосоме. Благодаря наследованию по мужской линии, отсутствию рекомбинаций и высокой вариабельности они находят применение для прослеживания миграций и других демографических событий в истории популяций, для изучения популяционной структуры, для филогенетического анализа Y-хромосомы [1-7]. Y-STR профили используются также в генеалогическом анализе для выявления родословных, поиска родственников, изучении древних образцов ДНК [8, 9]. В криминалистической генетике Y-STR маркеры являются дополнительным источником доказательств при обнаружении биологических следов преступников, поиске пропавших

людей, идентификации биологических останков, тестировании отцовства [10].

В данном исследовании была поставлена цель проанализировать структуру украинского генофонда по Y-STR маркерам, протестировав большую выборку из населения Украины по стандартной 17-локусной STR панели Y-filer. Выполненное нами ранее изучение структуры украинских популяций, не выявившее географической подразделенности в пределах Украины [11], проводилось по однонуклеотидным SNP маркерам (Single Nucleotide Polymorphism). Настоящее исследование опирается на факт, что, обладая более высокой мутационной скоростью по сравнению с однонуклеотидными SNP маркерами [12], микросателлитные STR маркеры за то же время накапливают большую изменчивость, что в ряде случаев позволяет с их помощью более тонко разграничить структуру популяций.

Y-хромосомные STR маркеры в украинских популяциях изучались и ранее, но в меньшем масштабе. В

одной из более ранних работ [13] были изучены Y-STR локусы среди населения трех восточнославянских стран – Беларуси, России и Украины; проведен сравнительный анализ выборок друг с другом и европейскими популяциями; украинская выборка состояла из нескольких десятков человек и была сформирована из тотального населения (без использования стандартных критериев этнической принадлежности), анализ был проведен на небольшом количестве маркеров (5 локусов). В работе [14] в целях изучения генофонда населения юга Центральной России был проведен анализ 10 Y-STR маркеров для русских и украинцев из нескольких районов Белгородской области; данная выборка украинцев использована и в настоящем исследовании. В работе [15] исследована выборка из 154 индивидов, проживающих в Львовской области – все образцы генотипированы на 17 маркерах панели Y-filer. В работе [16] по 17 маркерам Y-filer генотипированы 53 украинца из восточной Молдовы. Отдельные исследования Y-STR профилей украинцев выполнены не в рамках изучения целых популяций, а при филогеографическом анализе отдельных гаплогрупп Y хромосомы. В частности, 14 гаплотипов украинцев приведено в работе по структуре гаплогруппы G [17]; 18 гаплотипов R1a-M198 и 2 гаплотипа R1a1a-M458 генотипированы по 12 Y-STR локусам в работе [18]. В целом предыдущие работы содержат фрагментарные сведения о полиморфизме указанных микросателлитных локусов среди украинцев, некоторые включают анализ украинцев, проживающих за пределами Украины или анализ этнически неоднородного населения. В данной работе мы представляем большую выборку этнических украинцев из различных географических областей страны, протестированных по единой панели Y-STR маркеров.

Материалы и методы. Сбор биологических образцов проводился в 13 областных популяциях, представляющих основные исторические территориальные подразделения Украины – Волынь, Галичину, Закарпатье, Буковину, Полесье, Слобожанщину, Запорожье, Поднепровье, Подолье. Пунктами сбора, как правило, были медучреждения в районных центрах. В качестве доноров привлекались неродственные мужчины, коренные жители данного района (области), предки которых до третьего колена были украинцами и проживали в пределах исследуемого района (области). Участие в исследовании было добровольным. Каждый донор подтвердил добровольность своего участия, подписав информированное согласие на проведение исследования. Выделение ДНК проводилось фенол-хлороформным методом. Сформированная коллекция состояла из 1201 образца ДНК, размер областных выборок

варьировал от 50 до 136 человек. Анализ полных STR-профилей был выполнен для 1151 образца.

Генотипирование STR маркеров Y-хромосомы проведено с использованием набора Y-filer PCR Amplification Kit (Applied Biosystems) [19] на секвенаторе ABI 3130xl (Applied Biosystems). Исследованы 17 STR-локусов Y-хромосомы: DYS19, DYS385a, DYS385b, DYS389a, DYS389b, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393, DYS437, DYS438, DYS439, DYS448, DYS456, DYS458, DYS635, GATAH4. Номенклатура микросателлитных локусов дана в соответствии с сертификацией Национального Института Стандартов и Технологий США (U. S. National Institute of Standards and Technology – NIST) для Y-STR маркеров, используемых в генетической генеалогии [20]. Значения аллеля DYS389II представлены как разница между общим числом повторов в DYS389II и числом повторов в DYS389I.

Генетические характеристики микросателлитного разнообразия оценивались по ряду показателей. Генное разнообразие (GD) для отдельных локусов рассчиты-

вано по формуле: $GD = \frac{n}{n-1} (1 - \sum p_i^2)$, где n – размер

выборки, p – частота аллеля [21]. Микросателлитная изменчивость оценивалась по двум показателям – гаплотипическому разнообразию и дисперсии микросателлитных повторов. Дисперсия (s^2) рассчитывалась по каждому локусу, а затем как средняя арифметическая для всех 17-ти локусов. Гаплотипическое разнообразие (HD) рассчитано по формуле, аналогичной формуле расчета генного разнообразия, где p – частота гаплотипа. Вероятность совпадения гаплотипов у двух случайно взятых из популяции неродственных индивидов (MP) рассчитывалась как сумма квадратов частот гаплотипов. Мощност дискриминации (DC) определена как отношение между количеством разных гаплотипов и общим количеством гаплотипов.

Подразделенность генетической структуры популяций была оценена с помощью анализа молекулярной вариации (AMOVA). Для оценки генетических расстояний между популяциями использовался индекс F_{ST} . AMOVA и расчет F_{ST} выполнены с помощью программного пакета Arlequin 3.1 [22]. График многомерного шкалирования построен в программе Statistica 8.0 по матрице парных межпопуляционных расстояний F_{ST} .

Результаты и обсуждение. Для 1151 украинского образца ДНК получены профили по 17 STR-локусам. В 17 исследованных локусах выявлено 139 аллелей – от 5 до 15 на локус (табл. 1). Для каждого локуса составлены профили частот аллелей, определены преобладающие аллельные варианты (табл. 2).

Таблица 1. Характеристики изменчивости 17 STR локусов Y-хромосомы в популяциях украинцев

Локус	Минимальное число повторов*	Максимальное число повторов	Медиана числа повторов*	Число аллелей	Дисперсия*	Генное разнообразие	Локус	Минимальное число повторов*	Максимальное число повторов	Медиана числа повторов*	Число аллелей	Дисперсия*	Генное разнообразие
DYS389I	11	15	13	5	0,2876	0,4262	DYS438	8	13	11	6	0,5253	0,6120
DYS389II	13	22	17	10	0,9973	0,7101	DYS448	0	23	20	8	1,0210	0,4404
DYS390	19	27	24	9	0,9143	0,6834	GATA_H4	9	15	12	7	0,6334	0,6483
DYS456	12	19	15	8	1,2683	0,7216	DYS391	9	13	10	5	0,2961	0,5189
DYS19	12	19	16	9	1,2701	0,7389	DYS392	10	16	11	8	0,8078	0,2869
DYS385	8	18	11	12	3,3361	0,7283	DYS393	11	15	13	5	0,2127	0,3370
DYS385-2	10	21	14	15	1,9299	0,7022	DYS439	8	15	11	9	1,3031	0,7533
DYS458	13	20	16	11	1,2422	0,7451	DYS635	20	26	23	7	0,9715	0,6432
DYS437	12	16	14	5	0,4501	0,5514							

Примечание. * – без учета нулевых аллелей.

Таблица 2. Профили аллельных частот 17 STR локусов Y хромосомы в популяциях украинцев

DYS389I		DYS389II		DYS390		DYS456		DYS19			
аллели	частоты	аллели	частоты	аллели	частоты	аллели	частоты	аллели	частоты		
11	0,00348	13	0,00087	19	0,00087	12	0,00610	12	0,00087		
12	0,11237	15	0,01481	20	0,00087	13	0,04617	13	0,07056		
13	0,73519	16	0,30836	21	0,00436	14	0,08798	14	0,16289		
14	0,14460	17	0,38676	22	0,05488	15	0,42596	15	0,24390		
15	0,00436	18	0,19861	23	0,14808	16	0,25174	16	0,39547		
		19	0,07753	24	0,39286	17	0,15331	17	0,11934		
		20	0,00784	25	0,37021	18	0,02613	18	0,00348		
		21	0,00087	26	0,02613	19	0,00261	19	0,00174		
		22	0,00087	27	0,00174			0	0,00174		
		0	0,00348								
DYS385		DYS385-2		DYS458		DYS437		DYS438		DYS448	
аллели	частоты	аллели	частоты	аллели	частоты	аллели	частоты	аллели	частоты	аллели	частоты
8	0,00087	10	0,00174	13	0,00436	12	0,00087	8	0,00261	17	0,00174
9	0,00523	11	0,01307	14	0,02439	13	0,00174	9	0,04443	18	0,01220
10	0,07753	12	0,00871	15	0,28049	14	0,57927	10	0,44512	19	0,19686
11	0,42944	13	0,06794	16	0,31010	15	0,32317	11	0,42683	20	0,71951
12	0,04617	14	0,43380	17	0,27003	16	0,09495	12	0,07840	21	0,05662
13	0,07753	15	0,31359	18	0,08188			13	0,00261	22	0,00784
14	0,26568	16	0,06359	19	0,01742					23	0,00087
15	0,03920	17	0,03397	20	0,00348					0	0,00436
16	0,03310	18	0,03484	17,2	0,00348						
17	0,01916	19	0,02091	18,2	0,00087						
18	0,00436	20	0,00261	19,2	0,00348						
15,3	0,00174	21	0,00174								
		0	0,00087								
		13,2	0,00087								
		17,2	0,00174								
GATA_H4		DYS391		DYS392		DYS393		DYS439		DYS635	
аллели	частоты	аллели	частоты	аллели	частоты	аллели	частоты	аллели	частоты	аллели	частоты
9	0,00087	9	0,00958	10	0,00436	11	0,00087	8	0,00261	20	0,01829
10	0,01916	10	0,52613	11	0,83972	12	0,07317	9	0,00261	21	0,13153
11	0,38850	11	0,45209	12	0,02091	13	0,80226	10	0,28310	22	0,15244
12	0,41899	12	0,01132	13	0,07491	14	0,11934	11	0,29181	23	0,54617
13	0,15854	13	0,00087	14	0,04443	15	0,00436	12	0,22909	24	0,13328
14	0,01307			15	0,01132			13	0,17073	25	0,01742
15	0,00087			16	0,00087			14	0,01742	26	0,00087
				0	0,00348			15	0,00174		
								0	0,00087		

Наряду с обычными аллелями, встречались и нетипичные варианты, к которым относились нулевые аллели, возникающие вследствие делеций или мутаций в сайте праймера, а также промежуточные аллели, включающие частичные STR-мотивы [23-26]. Нулевые аллели были обнаружены в 6 локусах и встречались у 17 образцов из 1151 изученных. Все образцы были проверены повторным генотипированием. Нулевые аллели в локусе DYS448 встретились у 2-х образцов из Львовской и Черкасской областей, относящихся к Y-хромосомной гаплогруппе С (по другим изученным локусам отделены друг от друга 4-мя мутационными шагами), а также у 3-х образцов с гаплогруппой R1a-M198(x458) из Черниговской и Харьковской областей (2 мутационных шага). Два образца из Черниговской области, относящиеся к Y-хромосомной гаплогруппе R1a-M458, имели нулевые аллели одновременно в двух локусах – DYS19 и DYS392, а по остальным локусам отличались на 5 мутационных шагов. Шесть промежуточных аллелей, включающих частичные повторы, были обнаружены в 3 локусах у 14 человек. В локусе DYS385а аллель 15,3 встречался в образцах, относя-

щихся к гаплогруппам E-M35 и T-M70 (Сумская и Харьковская области). В локусе 385b аллель 13,2 (Львовская) относился к гаплогруппе R1b-M269, аллель 17,2 (Черновицкая, Житомирская) – к гаплогруппам I-P37.2 и I*-M170. В локусе DYS458 было три промежуточных аллеля, встреченных в пределах гаплогруппы J1: аллели 17,2 и 18,2 – среди 5 образцов J1-P58, аллель 19,2 – среди 4 образцов J*-M267(xP58).

Наиболее вариabельными оказались локусы DYS385а, DYS456, DYS19, DYS385b, DYS458, DYS439; число аллелей в них варьировало от 8 до 15, дисперсия составила 1,2-3,3. Наименее вариabельными были локусы DYS389I, DYS391, DYS393; число аллелей в них составляло 5 до 9, дисперсия варьировала от 0,2 до 0,3. Значение генного разнообразия (GD) составляло более 0,7 для 7 локусов, варьировало от 0,5 до 0,7 для 6 локусов, было ниже 0,5 для 4 локусов (табл. 1). Данные характеристики локусов в целом совпадают с аналогичными показателями в европейских и восточнославянских популяциях [3, 5, 14, 15].

Поскольку Y-хромосома представляет собой нерекombинирующую систему, аллели ее локусов, в том

числе и микросателлитных, не сочетаются случайным образом, а передаются в составе гаплотипов, разнообразие которых отражает определенную филогенетическую историю. Среди 1151 индивидуальных 17-локусных STR-профилей украинских образцов было выявлено 1029 гаплотипов, из которых 943 оказались уникальными, остальные 86 встречались от 2 до 6 раз: 66 представлены дважды, 11 – трижды, 4 – четырежды, 3 – по пять раз, 2 – по шесть раз. Таким образом, 82% украинских образцов имели уникальные 17-локусные гаплотипы; очень близкий показатель для тех же 17-ти локусов был получен для хорватов (84,5 %) [27] и более высокий – для русских популяций (91 %) [5]; среди украинцев Львовской области в работе [15] данный показатель достигал 95 %. По 12-ти локусным тестам уникальные гаплотипы составляли 78,2 % польских, 82,8 % чешских и 93,8 % словацких образцов [6]. Закономерно, что уменьшением числа локусов уменьшатся и доля уникальных гаплотипов – в работе [13] с использованием 5 маркеров только 23 % украинских гаплотипов оказались уникальными.

Общее гаплотипическое разнообразие HD по Украине в целом составило 0,998855, вероятность совпадения гаплотипов у двух случайно взятых из популяции неродственных мужчин $MP = 0,00114508$, мощность дискриминации этого молекулярного маркера $DC = 0,89400521$. Показатели гаплотипического разнообразия HD для других славянских популяций были сопоставимы – 0,9994 для русских [5], 0,99728 для хорватов [27], 0,9927 для северных поляков, 0,9963 для чехов, 0,9978 для словаков [6].

Характер распределения Y-STR маркеров был практически одинаковым в различных украинских областях. Анализ молекулярной вариации (AMOVA) выявил, что внутривнутрипопуляционная вариация микросателлитных повторов намного превышает вариацию между популяциями (табл. 3, первая строка). Почти 99,9 % наблюдающейся по изученным маркерам изменчивости обусловлено вариацией внутри отдельных популяций. На этом фоне изменчивость между популяциями (0,1 %) является крайне незначительной. Примерно такое же соотношение внутри- и межпопуляционной изменчивости показано для других славянских народов [6]. Показатель генетической дифференциации для украинских популяций имел низкое значение – $F_{ST} = 0,00109$. Полученный результат указывает на то, что по данному типу маркеров украинские популяции крайне слабо дифференцированы, между ними нет значительных различий. Для сравнения, аналогичный показатель только для

Белгородской области России, рассчитанный для русского и украинского населения по 10-ти маркерам, оказался почти в 7 раз выше: $F_{ST} = 0,0066$ [14]. Еще более высокий показатель $F_{ST} = 0,0084$ был получен для белорусских популяций [4].

Для того, чтобы выявить области, которые проявляют наибольшее генетическое сходство между собой и обособлены от других аналогичных регионов, анализ AMOVA был выполнен для нескольких вариантов группировки популяций (табл. 3, вторая, третья и четвертая строки). Популяции объединялись по принципу запад-восток или север-юг, а также по природным зонам. По-прежнему, самая высокая вариация (более 99,8 %) соответствовала различиям между индивидуумами внутри отдельных популяций. При этом наибольшие значения межгрупповой вариации (0,22 %) были характерны для варианта, выделяющего Полесье, правобережную и левобережную лесостепи. Группировка популяций по этому принципу отражает их наиболее реальную генетическую дифференциацию. Стоит отметить, однако, что выявленная дифференциация является очень незначительной.

Слабая внутренняя подразделенность украинского Y-STR генофонда отражена также на графике многомерного шкалирования (рис. 1). График построен на основании парных индексов генетических расстояний F_{ST} и группирует популяции в зависимости от их генетического сходства. Положение популяций на графике не соответствует их географическому взаиморасположению и физическому расстоянию друг от друга. Большая часть популяций образует центральную группу, от которой заметно удалена популяция украинцев из Белгородской области России; своеобразие последней, вероятно, обусловлено притоком генов из окружающих русских популяций [28]. Несколько удаленные от центра позиции занимают украинцы Закарпатья, Черновцов, Львова и Чернигова – большинство из перечисленных популяций локализованы по краям украинского ареала, в зонах контакта с соседними этносами. Похожий результат – отсутствие корреляции между генетическими и географическими расстояниями – был получен нами ранее на тех же популяциях при использовании SNP маркеров Y-хромосомы [11]; в то же время, в пределах меньшей по масштабам Белгородской области степень генетического сходства тесно коррелировала с генетическими расстояниями между популяциями [14]. В масштабах Европы сходство популяций по Y-STR маркерам определяется как географическими, так и лингвистическими факторами [6].

Таблица 3. Результаты анализа молекулярной вариации AMOVA

Вариация	Внутри популяций	Между популяциями в группе	Между группами
13 областных популяций без группировки (Белгородская, Житомирская, Закарпатская, Запорожская, Ивано-Франковская, Львовская, Ровенская, Сумская, Харьковская, Хмельницкая, Черкасская, Черниговская, Черновицкая)	99,89	0,11	-
2 группы: Правобережье (Житомирская, Ивано-Франковская, Львовская, Ровенская, Хмельницкая, Черкасская) Левобережье (Белгородская, Запорожская, Сумская, Харьковская, Черниговская)	99,98	0,11	-0,09
2 группы: Полесье (Житомирская, Ровенская, Черниговская) Лесостепь (Белгородская, Житомирская, Запорожская, Ивано-Франковская, Львовская, Ровенская, Сумская, Харьковская, Хмельницкая, Черкасская, Черниговская)	99,89	0,02	0,09
3 группы: Полесье (Житомирская, Ровенская, Черниговская) Правобережная лесостепь (Ивано-Франковская, Львовская, Хмельницкая, Черкасская) Левобережная лесостепь (Белгородская, Запорожская, Сумская, Харьковская)	99,88	-0,10	0,22

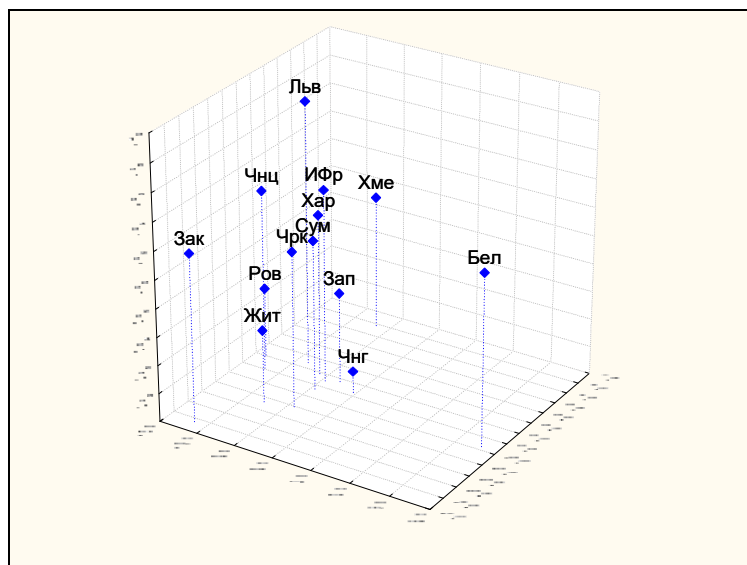


Рис. 1. Генетическое сходство популяций украинцев по Y-STR маркерам (на основании парных расстояний F_{ST} , $t_{ress} = 0,0890$). Сокращенные названий областей: Бел – Белгородская, Жит – Житомирская, Зак – Закарпатская, Зап – Запорожская, ИФр – Ивано-Франковская, Льв – Львовская, Ров – Ровенская, Сум – Сумская, Хар – Харьковская, Хме – Хмельницкая, Чрк – Черкасская, Чнг – Черниговская, Чнц – Черновицкая

Распределение показателей микросателлитного разнообразия по областям Украины представлено в таблице 4. Максимально возможное гаплотипическое разнообразие, равное 1, наблюдалось в Харьковской, Сумской и Ивано-Франковской областях (все изученные в данных областях гаплотипы уникальны в пределах каждой конкретной области). Наименьшие показатели гаплотипического разнообразия характерны для Белгородской, Закарпатской, Хмельницкой областей (в них бо-

льше всего носителей одинаковых гаплотипов). Дисперсия микросателлитных повторов высокая в Сумской, Харьковской, Белгородской, Черновицкой, Закарпатской областях (указывает на давние генетические линии, большой размер популяции либо интенсивные миграции), относительно низкая в Житомирской, Ровенской и Хмельницкой областях (недавние генетические линии, малый размер популяции, изоляция).

Таблица 4. Показатели микросателлитного разнообразия по областям Украины

Область	Число образцов	Число гаплотипов	Число гаплотипов / Число образцов	Гаплотипическое разнообразие	Дисперсия
Харьковская	60	60	1.0000	1.0000***	1.0503 ^{^^}
Сумская	101	101	1.0000	1.0000***	1.0489 ^{^^}
Ивано-Франковская	57	57	1.0000	1.0000***	0.9913 ^{^^}
Черкасская	111	109	0.9820	0.9997**	0.9620 ^{^^}
Запорожская	88	86	0.9773	0.9995**	0.9715 ^{^^}
Черновицкая	100	98	0.9800	0.9994**	1.0650 ^{^^}
Житомирская	100	96	0.9600	0.9992**	0.9127 [^]
Львовская	98	95	0.9694	0.9992**	0.9756 ^{^^}
Ровенская	100	96	0.9600	0.9990**	0.9449 [^]
Черниговская	96	91	0.9479	0.9989*	0.9760 ^{^^}
Хмельницкая	136	127	0.9338	0.9987*	0.9319 [^]
Закарпатская	50	48	0.9600	0.9984*	1.0276 ^{^^}
Белгородская	54	50	0.9259	0.9972*	1.0536 ^{^^}
УКРАИНА вся	1151	1029	0.8940	0.9988	0.9868

Примечание. Список упорядочен по убыванию гаплотипического разнообразия.

Гаплотипическое разнообразие: *** $HD=1$; ** $0.999 \leq HD < 1$; * $HD < 0.9990$.

Дисперсия: ^{^^} $s^2 > 1$; ^{^^} $0.95 < s^2 < 1$; [^] $0.90 < s^2 < 0.95$.

В целом в украинских популяциях показатели микросателлитного разнообразия очень высоки, что указывает на долгую историю существующих популяций и отсутствие изолированности отдельных регионов. По совокупности всех показателей, самое высокое микросателлитное разнообразие наблюдается в популяциях Слобожанщины (Харьковская и Сумская области). Этот регион характеризуется высоким гаплотипическим разнообразием и высокой дисперсией, что может быть результатом смешения разных миграционных потоков на данной территории. Полученный результат корре-

лирует с известной историей заселения Слободской Украины [29] и ее приграничным положением.

Полесье (Ровенская и Житомирская области) характеризуется самой низкой дисперсией и средними показателями гаплотипического разнообразия. Такое сочетание показателей может свидетельствовать об отголосках эффекта основателя на фоне относительной изолированности локальных популяций [30].

Для Буковины (Черновицкая область) характерны высокая дисперсия и среднее гаплотипическое разнообразие. Высокая дисперсия, отражающая накопленное со временем разнообразие микросателлитов, говорит в

пользу большого эффективного размера популяции. Возможно также, что высокое разнообразие является результатом смешения разных миграционных потоков. В другой части Карпатского региона, на Закарпатье (Закарпатская область), высокая дисперсия сочетается со сравнительно низким гаплотипическим разнообразием. То есть, на фоне давних разнообразных генетических линий выявляются отдельные блоки родственных гаплотипов, возникшие, возможно, вследствие локальных эффектов основателя.

Выводы

1. Получены профили аллельных частот по 17 STR локусам Y-хромосомы для 1151 образца ДНК коренных украинцев, представляющих основные территориальные подразделения Украины. Общее гаплотипическое разнообразие HD по Украине в целом составило 0,998855, вероятность совпадения гаплотипов у двух случайно взятых из популяции неродственных мужчин $MP = 0,00114508$, мощность дискриминации $DC = 0,89400521$.

2. Для исследованных популяций характерна высокая внутрипопуляционная (более 99,8 %) и низкая межпопуляционная изменчивость по Y-STR маркерам. Внутриукраинская дифференциация наиболее выражена между группами популяций, представляющих Полесье, левобережную и правобережную лесостепь.

3. Высокая дисперсия микросателлитных повторов наблюдается по краям этнического украинского ареала – на Закарпатье, Слобожанщине, Буковине, отражая изменчивость, привнесенную миграциями и приграничными взаимодействиями. Несколько сниженная дисперсия в Полесье косвенно подтверждает относительную изолированность этого региона.

4. Значения гаплотипического разнообразия в среднем оказываются выше в степной и лесостепной зонах, чем в Полесье или Карпатах. Серии одинаковых гаплотипов в Полесье и Закарпатье указывают на присутствие изолированных локальных поселений и небольшие размеры популяций.

Список литературных источников

1. Roewer L. Signature of recent historical events in the European Y-chromosomal STR haplotype distribution. / Roewer L., Croucher P.J., Willuweit S. [et al.] // *Hum Genet.* – 2005. – Vol. 116, N 4. – P. 279-291. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
2. Shi W. A Worldwide Survey of Human Male Demographic History Based on Y-SNP and Y-STR Data from the HGDP-CEPH Populations / Shi W., Ayub Q., Vermeulen M. [et al.] // *Molecular Biology Evolution.* 2010 Feb; 27(2): 385–393. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
3. Purps J. A global analysis of Y-chromosomal haplotype diversity for 23 STR loci. / Purps J., Siegert S., Willuweit S. [et al.] // *Forensic Science International Genetics.* – 2014. – N 12. – P. 12-23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
4. Rebała K. Y-STR variation among Slavs: evidence for the Slavic homeland in the middle Dnieper basin. / Rebała K., Mikulich A.I., Tsybovsky I.S. [et al.] // *Journal Human Genetics.* – 2007. – V. 52, N 5. – P. 406-414. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
5. Roewer L. Analysis of Y chromosome STR haplotypes in the European part of Russia reveals high diversities but non-significant genetic distances between populations / Roewer L., Willuweit S., Krüger C. [et al.] // *International Journal Legal Medicine.* – 2008. – V.122, N 3. – P. 219–223. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
6. Wozniak M. Similarities and Distinctions in Y Chromosome Gene Pool of Western Slavs / Wozniak M., Malyarchuk B., Derenko M. [et al.] // *American Journal Physical Anthropology* – 2010. – N 142. – P. 540–548. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
7. Forster P. A Short Tandem Repeat–Based Phylogeny for the Human Y Chromosome / Forster P., Röhl A., Lünemann P. [et al.] // *American Journal Human Genetics.* – 2000. – Vol. 67, N 1. – P. 182–196. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
8. Hammer M.F. Extended Y chromosome haplotypes resolve multiple and unique lineages of the Jewish priesthood / Hammer M.F., Behar D.M., Karafet T.M. [et al.] // *Human Genetics.* – 2009. – Vol. 126, N 5. – P. 707–717. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
9. Kayser M. Relating two deep-rooted pedigrees from Central Germany by high-resolution Y-STR haplotyping. / Kayser M., Vermeulen M.,

Knoblauch H. [et al.] // *Forensic Science International Genetics.* – 2007. – Vol. 1, N 2. – P. 125-128. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

10. Roewer L. DNA fingerprinting in forensics: past, present, future. / Roewer L. // *Investig Genetics.* – 2013. – Vol. 4, N 22. – doi: 10.1186/2041-2223-4-22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

11. Утевская О. М. Сходство украинских популяций из различных территориальных подразделений по маркерам Y-хромосомы / Утевская О. М., Агджоян А. Т., Пшеничнов А. С. [и др.] // Факторы экспериментальной эволюции организмов: сб.наук.прац. К.: Логос, 2013. – С. 338-341.

12. Ballantyne K.N. Mutability of Y-Chromosomal Microsatellites: Rates, Characteristics, Molecular Bases, and Forensic Implications. / Ballantyne K.N., Goedbloed M., Fang R. [et al.] // *American Journal Human Genetics.* 2010 Sep 10; 87(3): 341–353. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

13. Kravchenko S. A. Polymorphism of STR Loci of the Y Chromosome in Three Populations of Eastern Slavs from Belarus, Russia, and Ukraine / S. A. Kravchenko, P. A. Slominsky, L. A. Bet [et al.] // *Russian Journal of Genetics.* – 2002. – V. 38, N 1. – P. 80–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

14. Лепендина И.Н. Микросателлитный полиморфизм Y-хромосомы и его анализ среди населения. / Лепендина И.Н., Цапкова Л.А., Балановская Е.В., Чурносков М.И. // Научные ведомости. Сер. Медицина. Фармация. – 2010. – Вып.11, N 16(87). – С. 38–45.

15. Mielnik-Sikorska M. Genetic data from Y chromosome STR and SNP loci in Ukrainian population / M. Mielnik-Sikorska, P. Dacia, M. Wozniak [et al.] // *Forensic Science International Genetics.* – 2013. – Vol. 7, N 1. – P. 200–203. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

16. Varzari A. Paleo-Balkan and Slavic contributions to the genetic pool of Moldavians: insights from the Y chromosome. / A. Varzari, V. Kharkov, K. Simonova [et al.] // *PLoS ONE.* – 2013. – Vol. 8, N 1. – P. e53731. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

17. Rootsi S. Distinguishing the co-ancestries of haplogroup G Y-chromosomes in the populations of Europe and the Caucasus / Rootsi S., Myres N.M., Lin A.A. [et al.] // *European Journal Human Genetics.* – 2012. – Vol. 20, N 12. – P. 1275–1282. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

18. Underhill P.A. Separating the post-Glacial coancestry of European and Asian Y chromosomes within haplogroup R1a / Underhill P.A., Myres N.M., Rootsi S. [et al.] // *European Journal Human Genetics.* – 2010. Vol. 18, N 4. – P. 479–484. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

19. Goedbloed M. Comprehensive mutation analysis of 17 Y-chromosomal short tandem repeat polymorphisms included in the AmpFSTR® Yfiler® PCR amplification kit / Goedbloed M., Vermeulen M., Fang R.N. [et al.] // *International Journal Legal Medicine.* – 2009. – Vol. 123, N 6. – P. 471–482. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

20. U.S. National Institute of Standards and Technology <http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/multiplx.htm>

21. Nei M. Genetic distance between populations // *Molecular Evolution and Phylogenetics.* – 1972. – 106. – P. 283–292.

22. Excoffier L. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis / Excoffier L., Laval G., Schneider S. // *Evolution Bioinformatics Online.* – 2005. – N 1. – P. 47–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

23. Balaesque P. Dynamic nature of the proximal AZFc region of the human Y chromosome: multiple independent deletion and duplication events revealed by microsatellite analysis. / Balaesque P., Bowden G.R., Parkin E.J. [et al.] // *Human Mutation.* – 2008. – N 29. – P. 1171–1180. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

24. Budowle B. Null allele sequence structure at the DYS448 locus and implications for profile interpretation. / Budowle B., Aranda X., Lagace R. [et al.] // *International Journal Legal Medicine.* – 2008. – N 122. – P. 421–427.

25. Myres N.M. Y-chromosome Short Tandem Repeat DYS458.2 Non-consensus Alleles Occur Independently in Both Binary Haplogroups J1-M267 and R1b3-M405 / Myres N.M., Ekins J.E., Lin A.A. [et al.] // *Croat Medical Journal.* – 2007. – Vol. 18, N 4. – P. 450–459. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

26. Myres N.M. Y-chromosome Short Tandem Repeat Intermediate Variant Alleles DYS392.2, DYS449.2, and DYS385.2 Delineate New Phylogenetic Substructure in Human Y-chromosome Haplogroup Tree / Myres N.M., Ritchie K.H., Lin A.A. [et al.] // *Croat Medical Journal.* 2009 Jun; 50(3): 239–249. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

27. Ljubkovic J. Y-chromosomal Short Tandem Repeat Haplotypes in Southern Croatian Male Population / Jelena Ljubkovic J., Stipisic A., Sutlovic D. [et al.] // *Croat Medical Journal.* – 2008. – V. 49, N 2. – P. 201–206. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

28. Утевская О. М. Сходство и различия генофондов украинских и русских популяций Слобожанщины по маркерам Y-хромосомы / О. М. Утевская, А. С. Пшеничнов, Х. Д. Дибирова [и др.] // *Цитология и генетика.* – 2015. – 49, № 4. – С. 40-50.

29. Баралій Д. І. Історія Слобідської України. / Баралій Д. І. / Харків: "Основа", 1990. – 258 с.

30. Терако Л.И. Антропология Белорусского Полесья: демография, этническая история и генетика. / Терако Л.И., Микулич А.И., Саливон И.И. / Минск: Наука и техника, 1978. – 158 с.

Надійшла до друку 14.12.15

О. Утевська, канд. біол. наук, Л. Атраментова, д-р біол. наук
Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, Харків, Україна,
О. Балановська, д-р біол. наук
ФГБНУ "Медико-генетичний науковий центр", Москва, Росія,
О. Балановський, д-р біол. наук
Інститут загальної генетики імені М.І. Вавілова РАН, Москва, Росія

МІНЛИВІСТЬ STR ЛОКУСІВ Y-ХРОМОСОМИ В ПОПУЛЯЦІЯХ УКРАЇНЦІВ

Отримано частоти гаплотипів за 17 STR локусами Y-хромосоми для 1151 зразка ДНК корінних українців з 13 обласних популяцій, що представляють основні територіальні підрозділи України. Міжпопуляційні відмінності за сукупністю досліджених Y-STR маркерів не є значущими. Внутрішньоукраїнська диференціація найбільш виражена між групами популяцій, що представляють Полісся, правобережний та лівобережний лісостеп. Найбільш висока дисперсія мікросателітних повторів спостерігається по краях етнічного українського ареалу – на Закарпатті, Буковині, Слобожанщині, найнижча – в Поліссі. Значення гаплотипічної різноманітності в середньому вище в степовій і лісостеповій зонах, ніж у Поліссі або Карпатах. Загальна гаплотипічна різноманітність $HD = 0,998855$, ймовірність збігу гаплотипів у двох випадково взятих з популяції неспоріднених чоловіків $MP = 0,00114508$, потужність дискримінації $DC = 0,89400521$.

Ключові слова: українці, Y-хромосома, STR маркери, гаплотипічна різноманітність.

O. Utevska, PhD., L. Atramentova, DSc
V. N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, Ukraine,
E. Balanovska, DSc,
Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russia,
O. Balanovsky, DSc
Vavilov Institute of General Genetics RAS, Moscow, Russia

Y-CHROMOSOME STR VARIATION IN UKRAINIAN POPULATIONS

The haplotype and allele frequencies for 17 STR loci of Y-chromosome were obtained for 1151 indigenous Ukrainians from 13 regional populations representing the major territorial subdivisions of Ukraine. There were no significant inter-population differences. The genetic subdivisions within Ukraine was revealed between Polesie, western and eastern forest-steppe populations. The highest microsatellite variability was observed along the edges of Ukrainian area – in the Carpathian region, Bukovina, Sloboda Ukraine; the lowest – in Polesie. The average haplotype diversity values are higher in the steppe and forest-steppe zones, than in Polesie and the Carpathians. Forensic parameters were calculated: total haplotype diversity $HD = 0,998855$, match probability $MP = 0.00114508$, the discrimination capacity $DC = 0,89400521$.

Keywords: Ukrainians, Y-chromosome, STR markers, haplotype diversity.

УДК 616.61-008-092:541.182.024-032.35-032.81:612.08

В. Лавриненко, пошукач, Ю. Чайковський, д-р мед. наук, Л. Дегтярьова, д-р мед. наук.
Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, Київ

БІОЛОГІЧНИЙ ВПЛИВ АЛМАЗНИХ НАНОЧАСТОЧОК ТА ТЕХНІЧНОГО ВУГІЛЛЯ НА СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН НИРОК КУРЯЧИХ ЕМБРІОНІВ

Визначали біологічний вплив нанорозмірних матеріалів на нирки курячих зародків, одержаних при інкубуванні яєць лінії Хай-Лайн білий. Суспензію алмазних наночастинок та технічного вугілля на біосумісному декстрані вводили у жовтковий мішок зародків на 3 добу інкубації і проводили оцінку стану тканин нирок на 14 і 20 добу інкубації. За однакових умов з експериментальними групами інкубували яйця з контрольної групи, яким здійснювали введення декстрану без жодних домішок. Показано альтеруючий вплив обох досліджуваних матеріалів на органи виділення зародків. Вони спричиняють набряки, дистрофії, утворення кальцинатів. Статистично продемонстровано збільшення площі епітелію ниркових каналців в експериментальних групах у зв'язку з розвитком білкової дистрофії та набряків епителиоцитів.

Ключові слова: алмазні наночастинок, технічне вугілля, токсичний ефект.

Вступ. Дослідження у галузі нанорозмірних матеріалів демонструють значні переваги їх застосування у багатьох галузях медицини і промисловості. Одним з перспективних щодо діагностики і лікування матеріалів є алмазні наночастинок (АНЧ). Це пов'язано з їхніми унікальними характеристиками – біосумісністю, низькою хімічною реактивністю, оптичною прозорістю, надзвичайною міцністю тощо [1, 2, 3]. Пропонують застосування АНЧ в якості біосенсорів, переносників ліків, засобів візуалізації певних структур чи іммобілізації білків тощо [3, 4, 5, 6, 7, 8]. Розуміння базових принципів і особливостей впливу цих структур на живі організми, тропності до певних структур та органів є абсолютно необхідними для їх подальшого медичного і біологічного застосування. Тим не менше, наукових досліджень на цю тему в рази менше ніж тих, що описують все нові і нові потенційні сфери застосування АНЧ.

Більшість досліджень патологічних ефектів технічного вугілля (сажі) стосується потенційних ризиків для здоров'я при згоранні дизельного палива та фабричних емісій, де окрім нього міститься велика кількість інших речовин. До того ж, практично невисвітленим на сьогоднішній день [9] лишилось питання впливів сажі на різні

системи організму, бо основну увагу дослідники зосереджують на легенях та шкірі.

На жаль, значна частина авторів, що заперечують канцерогенну чи будь-яку іншу патогенну дію сажі на живі організми, спирається на фрагментарне сприйняття її властивостей [10, 11]. Автори вважають, що сажа майже повністю складається з карбону, вона ніяким чином не включається в метаболізм і після інгаляції з часом просто виводиться з організму за допомогою мукоциліарного транспорту. Вочевидь така інтерпретація біологічних ефектів сажі не зовсім коректна, що ми і спробуємо довести результатами цього дослідження.

Матеріали і методи. В якості об'єкту дослідження було обрано курячі ембріони породи Хайлайн білий (бройлери). Використана біологічна модель розроблена за методикою В.П. Терещенко, патент України №49464. Курячий ембріон перебуває під потужним захистом від екзогенних впливів, тож є дуже зручним для вивчення різноманітних потенційно шкідливих речовин (медикаментів, пестицидів тощо) [12]. В експерименті було задіяно 114 яєць, розділених на 3 групи: одну контрольну (53 яйця) та дві експериментальні. Зародкам з експериментальних груп вводили алмазні наночастинок (34 яйця) та технічне вугілля (27 яєць).

Досліджувані матеріали вводили в жовтковий мішок ембріона, оскільки саме з нього організм отримує всі поживні речовини. Для забезпечення потрапляння матеріалу саме в жовтковий мішок і запобігання пошкодження як самого зародка, так і його провізорних органів, яйця на певний час розміщували горизонтально, щоб зародковий диск розмістився на поверхні жовтка, і під фіксованим кутом вводили голку на визначену довжину. Для підтримання замкнутості внутрішнього середовища яйця отвір від введення матеріалу заліплювали воском.

Доза досліджуваних матеріалів складала 0,31 мг на одне яйце.

Разова підтримуюча доза активованого вугілля для дорослої людини вагою 70 кг складає 1,0 г. З урахуванням середньої ваги жовтка яйця (22 г) ми вираховували дозу для введення у жовтковий мішок зародка:

$$22 \times 1:70 \ 000 = 0,31 \text{ мг}$$

Оскільки вводити дані матеріали в організм в сухому вигляді неможливо, необхідно було підібрати розчинник. Зазвичай з даною метою використовують біосумісні рідини, тобто ті, що за своїми властивостями і хімічним складом наближені до рідин, котрі містяться в живих організмах. Ми зупинили свій вибір на Реополіглюкіні-Новофарм (Декстрані 40).

Технічне вугілля і НА було введено в об'ємі 0,2 мл декстрану на один жовток. Кількість рідини, що вводилася є допустимою для введення у експериментах з курячими зародками.

Стерилізація матеріалу здійснювалась за t° 120 $^{\circ}$ C впродовж 60 хвилин.

Всі групи яєць інкубувались в абсолютно однакових умовах – в одному побутовому інкубаторі моделі Термія-60 за однакових вологості і температури (37,5 – 38,5 $^{\circ}$ C).

Введення матеріалу проводилось на 3 добу інкубації, що обумовлено строками розвитку кровоносної системи зародків. Забір матеріалу для гістологічних досліджень проводили на 14 і 20 добу інкубації. Ми акцентували увагу саме на нирках, оскільки вони забезпечують виведення різноманітних шкідливих речовин. Тож цілком логічно припустити, що досліджувані матеріали, які

було введено зародкам, матимуть спорідненість саме до цих органів.

Матеріал для подальших морфологічних досліджень фіксували у 10% розчині нейтрального формаліну. З парафінових блоків виготовляли зрізи завтовшки 4-6 мкм, які забарвлювали гематоксиліном і еозином. Зрізи переглядали під мікроскопом при збільшеннях 10 $\times$ 10 та 10 $\times$ 40.

Нами було також виміряно та статистично оброблено дані щодо площі епітелію прямих і звивистих каналців у нирках зародків з контрольної та експериментальних груп. Вимірювання проводились за допомогою комп'ютерної програми ImageJ. Було встановлено, що розподіл по обох показниках у всіх трьох групах був ненормальним (не відповідав кривій Гаусса). Тому в якості методу статистичної перевірки гіпотез ми обрали U-критерій Манна-Уїтні.

Результати і обговорення. На гістологічних препаратах нирок зародків з контрольної групи патології виявлено не було. Епітелій прямих і звивистих каналців нирок курячих ембріонів на пізніх стадіях інкубації не мав ознак набряків в базальній чи апікальній зонах; білкової чи жирової дистрофії також не спостерігалось. В порожнинах каналців були відсутні сторонні включення, кальцифікати чи відлучені клітини епітелію, інтерстиційних набряків також не було.

Дослідження тканин нирок у зародків з групи із введеною сажею показало наявність значних патологічних змін. Епітелій каналців набряклий в апікальній і базальній частинах (рис. 1). Місцями навіть зустрічались розриви плазмолем епітеліоцитів, хоча у прямих каналцях ушкодження менші, ніж у звивистих. За рахунок набряків у базальній частині клітин ядра зміщені апікально до просвітів каналців. Самі просвіти звужені, в них присутні еритроцити, фрагменти клітин епітелію. Також в каналцях зустрічались крупні гомогенні кальцифікати, що свідчить на користь порушення іонного обміну. В епітеліоцитах ознаки білкової дистрофії – зернистість в цитоплазмі.

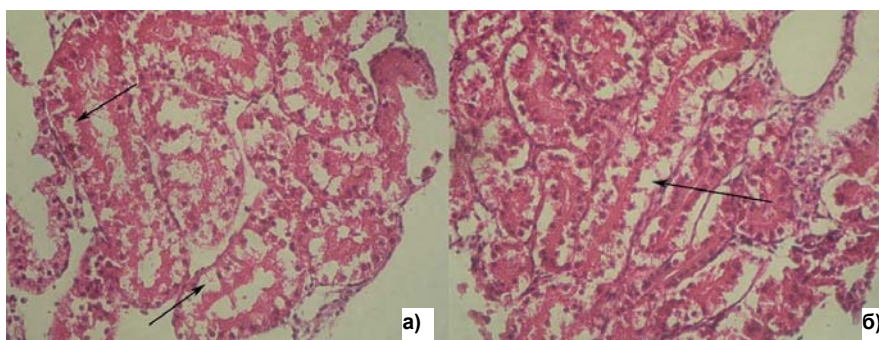


Рис. 1. Мікрофотографія зрізу нирки курячого ембріона 14-денного строку інкубації з групи із введеною сажею.

Набряк в апікальній (а) та базальній (б) частинах епітелію (стрілки).
Забарвлення гематоксиліном і еозином, об. 40х, ок. 10х.

Дослідження нирок зародків із групи з введеними АНЧ показало наявність запальних реакцій, про які свідчило проникнення в тканини полінуклеарних імунних клітин. В каналцях спостерігались дистрофічні зміни: епітеліоцити набрякли, субклітинні вакуолі зливались між собою. В деяких ділянках звивистих каналців навіть спостерігалась десквамація епітелію. В окремих

каналцях зустрічались еритроцити, що є свідченням гематурії та накопичення фільтрату білкової природи, що вказує на порушення процесів фільтрації чи реабсорбції. Присутній також інтерстиційний набряк – каналці розділені набряковою рідиною. В їхніх просвітах зустрічались злучені клітини і різномірний вміст. В цій групі також спостерігались кальцифікати (рис.2).

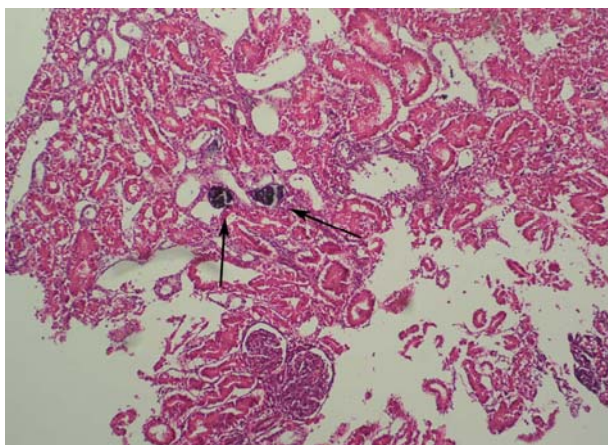


Рис. 2. Мікрофотографія зрізу нирки курячого ембріона 20-денного строку інкубації із введеними АНЧ. Кальцифікати в порожнинах каналців (стрілки).
Забарвлення гематоксилином і еозином, об. 10х, ок. 10х.

У підсумку варто відзначити, що за даними гістологічних досліджень як технічне вугілля, так і алмазні наночасточки мають очевидний альтеруючий вплив на органи виділення зародка. Вони спричинюють набряки, дистрофії, утворення кальцинатів.

Результати статистичної обробки одержаних нами даних щодо площі прямих і звивистих каналців у контрольній та експериментальних групах представлено у таблицях 1 – 2.

Таблиця 1. Порівняльний аналіз площі епітелію звивистих каналців в контрольній та експериментальних групах

Групи	Показники					
	Медіана, мкм2	Максимальне значення, мкм	Мінімальне значення, мкм2	U-критерій Манна-Уїтні	Критичне значення U-критерію Манна-Уїтні	Наявність достовірної різниці між групами
Контрольна група	11221,9	17430,4	5399,5			
Експериментальна група із введеними АНЧ	28153,2	72229,9	9864,4	92	1010	Наявна*
Експериментальна група із сажею	32380,2	70551,9	15655,0	5	1010	Наявна*
				1305	1010	Відсутня**

Тут і далі * – наявність чи відсутність достовірної різниці між інтактною та експериментальною групами при $p \leq 0,05$

** – наявність чи відсутність достовірної різниці між експериментальними групами при $p \leq 0,05$

Таблиця 2. Порівняльний аналіз площі епітелію прямих каналців в інтактній та експериментальних групах

Групи	Показники					
	Медіана, мкм2	Максимальне значення, мкм2	Мінімальне значення, мкм2	U-критерій Манна-Уїтні	Критичне значення U-критерію Манна-Уїтні	Наявність достовірної різниці між групами
Контрольна група	3543,7	6445,2	1291,1			
Експериментальна група із введеними АНЧ	11692,5	27575,4	3355,4	75	628	Наявна*
Експериментальна група із введеною сажею	8068,5	13313,5	2988,4	85	645	Наявна*
				500	645	Наявна**

На основі статистичного аналізу даних з усіх трьох груп можна говорити про достовірне збільшення загальної площі ниркового епітелію як у прямих, так і у звивистих каналцях у експериментальних групах відносно контрольної. Імовірно, це пов'язано з наявністю апікальних і базальних набряків у епітеліоцитах, які значною мірою збільшили їх площу і є свідченням негативного впливу досліджуваних матеріалів на нирки зародків.

Також цікавим є те, що статистично достовірну різницю було виявлено і між експериментальними групами – площа прямих каналців у групі із введеними АНЧ є більшою, ніж у групі з технічним вугіллем, що підтверджує потужність їх токсичної дії.

Висновки.

1. За даними світлової мікроскопії встановлено здатність технічного вугілля (сажі) та алмазних наночастинок проникати крізь клітинні і судинні мембрани та згодом мігрувати в живому організмі.

2. За даними комплексних досліджень встановлено, що технічне вугілля і алмазні наночастинок чинять альтеруючий вплив на органи виділення зародка. Вони спричинюють дистрофічні зміни паренхіматозних клітин з утворенням кальцинатів в нирках.

3. Статистично продемонстровано збільшення площі епітелію ниркових каналців в експериментальних групах у зв'язку з розвитком дистрофії і набряків епітеліоцитів.

Виявлені нами патологічні процеси в тканинах курячих ембріонів, які зазнали дії технічного вугілля та алмазних наночастинок, засвідчують можливість їхнього тератогенного впливу на живі організми.

Список використаної літератури

1. Pulmonary toxicity and translocation of nanodiamonds in mice / Y. Yuan [et al.] // Diamond and Related Materials. – 2010. – P. 291 – 299.
2. Nanometer-Sized Diamond Particle as a Probe for Biolabeling / J-I Chao [et al.] // Biophysics Journal. – 2007. – № 93(6). – P. 2199–2208.

3. Biodistribution and fate of nanodiamonds in vivo / Y Yuan [et al.] // Diamond and related materials. – 2009. – № 18(1). – P. 95 – 100.
4. Vajayanthimala V. Functionalized fluorescent nanodiamonds for biomedical applications / V. Vajayanthimala, H-C.Chang // Nanomedicine London England. – 2009. – № 4(1). – P. 47 – 55.
5. Preparation and characterization of green fluorescent nanodiamonds for biological applications / T.-L. Wee [et al.] // Diamond and Related Materials. – 2009. – № 18(2-3). – P. 567-573.
6. Polymer-functionalized nanodiamond platforms as vehicles for gene delivery / X. Q. Zhang [et al.] // ACS Nano. – 2009. – № 22(3). – P. 2609 – 2616.
7. Nanodiamond-insulin complexes as pH-dependent protein delivery vehicles / R.A. Shimkunas[et al.] // Biomaterials. – 2009. – № 30(29). – P. 5720–5728.
8. Barnard A. Diamond standard in diagnostics: nanodiamond biolabels make their mark // Analytical. – 2009. – № 134(9). – P. 1751 – 1764.

9. Robertson J Case-control Study of Circulatory, Malignant and Respiratory Morbidity in Carbon Black Workers in the USA / J Robertson, T Ingalls // American Industrial Hygiene Association Journal. – 1989. – № 50(10). – P. 510 – 515.
10. Ingalls T Periodic Search for Cancer in the Carbon Black Industry / T Ingalls, R.Risques-Iribarren // Archives of Environmental Health. – 1961. – № 2. – P. 429 – 433.
11. Ingalls T. Incidence of Cancer in the Carbon Black Industry // Archives of Industrial Hygiene and Occupational Medicine. – 1950. – № 1. – P. 662 – 676.
12. Кузнецов А. Ветеринарный медицинский справочник / А. Кузнецов. – Санкт Петербург : Лань, 2004.

Надійшла до редколегії 22.12.15

В. Лавриненко, соискатель, Ю. Чайковский, д-р мед. наук, Л.Дегтярева, д-р мед. наук
Национальный медицинский университет имени А.А. Богомольца, Киев, Украина

БИОЛОГИЧЕСКОЕ ВЛИЯНИЕ АЛМАЗНЫХ НАНОЧАСТИЧЕК И ТЕХНИЧЕСКОГО УГЛЯ НА СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ПОЧЕК КУРИНЫХ ЭМБРИОНОВ

Определяли биологическое влияние наноразмерных материалов на почки куриных эмбрионов, полученных при инкубации яиц линии Хай-Лайн белый. Суспензию алмазных наночастичек и технического угля на биосовместимом декстрате вводили в желточный мешок зародышей на 3 сутки инкубации и проводили оценку состояния тканей почек на 14 и 20 сутки инкубации. При одинаковых условиях с экспериментальными группами инкубировали яйца из контрольной группы, которым производили введение декстрата без примесей. Продemonстрировано альтерирующее влияние обоих исследуемых материалов на органы выделения зародышей. Они вызывают отеки, дистрофию, образование кальцификатов. Статистически продemonстрировано увеличение площади эпителия почечных канальцев в экспериментальных группах в связи с развитием белковой дистрофии и отеков эпителиоцитов.

Ключевые слова: алмазные наночастицы, технический уголь, токсический эффект.

V. Lavrinenko, applicant, Y. Tchaikovskiy, DMc, L. Degtiarova, DMc
Bogomolets national medical university, Kyiv, Ukraine

BIOLOGICAL EFFECT OF NANODIAMONDS AND SOOT ON STRUCTURAL AND FUNCTIONAL CONDITIONS OF CHICKEN EMBRYO KIDNEYS

The biological impact of nano-sized materials on kidneys of chicken embryos obtained from incubation of eggs from High-Line white was researched. Suspension of nanodiamonds and soot on bio-friendly dextrane was injected into the yolk sac of embryos on the third day of incubation and the condition of kidney tissues on the 14th and 20th days of incubation was studied. Under the same conditions as experimental groups the eggs from the control group with injection of pure dextrane were incubated. The alteration effect of both researched materials on excretory organs of the embryo was shown. They cause edema, dystrophy and formation of calcificates. The increase of the kidney channels epithelium area due to proteinosis and edema of epitheliocytes was statistically proved for both experimental groups.

Key words: nanodiamonds, soot, toxic effect.

УДК 577.156:577.15.072

И. Вовчук, д-р биол. наук
Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова, Одесса

АМИНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ КАРБОКСИПЕПТИДАЗЫ А НЕИЗМЕНЕННОЙ И ОПУХОЛЕВЫХ ТКАНЕЙ ЭНДОМЕТРИЯ И ЯИЧНИКОВ

Исследован качественный и количественный состав препарата карбоксипептидазы А, полученной из не измененной ткани и тканей доброкачественных и злокачественных опухолей эндометрия и яичника. Показано, что развитие неопластического процесса характеризуется увеличением количества диаминомонокислот в ткани эндометрия и уменьшением количества этих аминокислот в опухолевых тканях яичника. Доля моноаминодикарбоновых аминокислот, вносящих свой вклад в суммарный заряд белковой молекулы уменьшается по мере прогрессии опухолевого процесса яичника и увеличивается в молекуле карбоксипептидазы А доброкачественной опухоли эндометрия. Установлено, что по мере прогрессии опухолевого процесса в ткани яичника увеличивается содержание гидроксил-содержащих аминокислот, потенциально способных участвовать в катализе. Количество цистеина в ферменте, выделенном из опухолевых тканей как яичника так и эндометрия значительно ниже, чем в ферменте из не измененных тканей этих органов и снижается по мере развития опухолевой прогрессии. Полученные результаты свидетельствуют о том, что карбоксипептидаза А не измененной и опухолевых тканей яичника и эндометрия значительно отличается по качественному и количественному составу аминокислот.

Ключевые слова: карбоксипептидаза А, аминокислотный состав, опухоль, эндометрий, яичник.

Введение. Карбоксипептидаза (КФ 3.4.2.1) А играет важную роль в жизнедеятельности организмов. Установлено, что карбоксипептидаза А участвует в клеточном катаболизме нормальных и аномальных белков, токсинов; в регуляции метаболизма клеток; в ограниченном протеолизе молекул предшественников биологически-активных пептидов и полипептидов; в активации проферментов и других эффекторов белковой природы. Специфическая роль карбоксипептидазы А заключается в деградации специфического мембранно-связанного рецептора I карра В-β, активации фактора некроза (NF-карра В) и активации синтеза макрофа-

гами специфического белка – тканевого фактора некроза опухоли (TNF-α protein) [9]. Изучение регуляции активности карбоксипептидазы А как на молекулярном, так и на тканевом уровнях и сравнительные исследования биохимических свойств карбоксипептидазы А не измененной и опухолевой ткани возможны только в случае получения этих ферментов в очищенном виде.

Несмотря на то, что гомогенный препарат карбоксипептидазы А был получен из некоторых органов и тканей человека: легких [8], поджелудочной железы [13], плаценты [14], почек [10], семенной жидкости [15], культуры клеток карциномы легких [6],

аминокислотный состав и биохимические свойства выделенных ферментов не были всесторонне изучены.

Цель исследования состояла в изучении аминокислотного состава карбоксипептидазы А, полученной из не измененной и опухолевых тканей эндометрия и яичника.

Материалы исследования. Для выделения карбоксипептидазы использовали образцы резецированной в ходе оперативного вмешательства ткани новообразований эндометрия и яичников женщин, которые не получали до операции медикаментозное лечение. Материал для исследования был предоставлен патоморфологической лабораторией Одесского областного онкологического диспансера. Патоморфологическую и гистологическую верификацию диагнозов по требованиям ВОЗ проводили гистологи сертифицированной и лицензированной патоморфологической лаборатории Одесского областного онкологического диспансера. Взятие анатомических материалов для диагностических исследований, соблюдение этических и правовых норм согласно: Хельсинской декларации (1964 г.), Конвенции о защите прав и достоинств человека в связи с использованием достижений биологии и медицины (Конвенция о правах человека и биомедицине 1996 г.), закона Украины "О трансплантации органов и других анатомических материалов человеку (1999 г.)" обеспечивалось медицинским учреждением, предоставляющим материал для исследования, согласно договору о совместных исследованиях.

Исследования проводили с препаратами карбоксипептидазы А, полученными из не измененной и опухолевых тканей эндометрия и яичника. Гомогенность выделенных ферментов была подтверждена методом электрофореза в системе SDS. Исследовали аминокислотный состав препаратов не измененных тканей эндометрия и яичника (в которых по данным гистоморфологического исследования было подтверждено отсутствие атипичных клеток), умеренно дифференцированных аденокарциномы эндометрия и цистаденокарциномы яичника (злокачественные новообразования) и доброкачественных новообразований эндометрия и яичника.

Методы исследования. Аминокислотный анализ полученных препаратов фермента проводили на автоматическом анализаторе аминокислот: ILC-3BC (Япония). Гидролиз образцов осуществляли в 6,0 М HCL в соотношении 1:500 при +105°C в герметически закупоренных флаконах в течение 24 часов. После гидролиза пробы упаривали в роторном испарителе "Ротадест" (Венгрия) и осадок растворяли в 0,2 М HCL.

Хроматографию гидролизатов проводили по Муру и Штейну [11]. Содержание триптофана определяли в нативном белке методом Гайтона [7]. Метионин определяли колориметрически нитропруссидным методом [1]. Цистеин определяли на анализаторе аминокислот после предварительного окисления белков надмуравьиной кислотой и последующего их гидролиза в 6 М HCL [12]. Содержание пролина определяли колориметрически с помощью нингидринового реактива [4]. Лизин определяли энзиматическим методом с использованием l-лизиновой декарбоксилазы ("Кальбиохем", США) на автоматическом анализаторе фирмы "Техникон" (США).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни, предназначенного для сравнения независимых выборок [2].

Результаты и их обсуждение. Несмотря на близкие значения молекулярной массы, препараты карбоксипептидазы А, выделенной из и опухолевых тканей яичника и

эндометрия значительно отличаются по аминокислотному составу как между собой, так и от фермента из поджелудочной железы быка (табл. 1). Установлено, что образцы карбоксипептидазы А, выделенные из не измененной ткани яичника и эндометрия наиболее близки между собой по количеству глицина, гистидина, изолейцина, пролина, глутаминовой кислоты и практически не отличаются по количеству тирозина, серина, треонина, аланина, лейцина, аспарагиновой кислоты, цистеина и метионина. Наибольшие отличия между исследуемыми образцами не измененных тканей яичника и эндометрия установлены для фенилаланина, лизина и аргинина, содержание которых выше в препарате карбоксипептидазы А яичника и для триптофана, содержание которого в 10,0 раз выше в препарате фермента из не измененной ткани эндометрия.

В результате исследований было установлено, что процесс малигнизации сопровождается изменением аминокислотного состава как в опухолевых тканях яичника, так и в опухолевых тканях эндометрия, однако это изменение неоднозначно. Развитие процесса малигнизации в ткани яичника сопровождается снижением содержания лизина, аргинина, фенилаланина, валина, лейцина и изолейцина, а в ткани эндометрия наоборот – увеличением содержания этих аминокислот в 1,5 – 3,0 раза. Было установлено, что процесс малигнизации сопровождается снижением содержания аспарагиновой и глутаминовой кислот в опухолевых тканях обоих органов и снижением в 1,4 – 1,7 раза содержания глицина и аланина в ткани эндометрия. Содержание пролина практически не изменяется в процессе малигнизации в ткани яичника и увеличивается в 1,8 раза в ткани эндометрия. Содержание серина увеличивается в 1,71 – 2,0 раза в ткани яичника и снижается в 1,5 – 2,6 раза в ткани эндометрия. Содержание треонина практически не изменяется в процессе малигнизации ткани яичника и увеличивается в 2,5 раза при развитии опухолевого процесса в ткани эндометрия.

В литературе известно лишь несколько карбоксипептидаз, охарактеризованных по аминокислотному составу [3, 5]. Выделенные образцы карбоксипептидазы А значительно отличаются по аминокислотному составу от карбоксипептидазы А поджелудочной железы крупного рогатого скота. Однако обнаружено наибольшее сходство по количеству основных аминокислот: лизина и аргинина и HO-содержащих аминокислот между карбоксипептидазой А поджелудочной железы крупного рогатого скота и образцами фермента из не измененной и опухолевых тканей эндометрия и яичника. Так, по количеству лизина карбоксипептидаза А поджелудочной железы крупного рогатого скота подобна ферменту, выделенному из ткани доброкачественной и злокачественной опухоли эндометрия, а по количеству аргинина – ферменту из не измененной ткани яичника и из ткани доброкачественной и злокачественной опухоли эндометрия. Следует отметить, что установлено большое сходство между ферментом поджелудочной железы крупного рогатого скота и образцами карбоксипептидазы А, выделенными из не измененной ткани как яичника так и эндометрия.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что карбоксипептидаза А не измененной и опухолевых тканей яичника и эндометрия значительно отличается по качественному и количественному составу аминокислот.

Такое количественное изменение аминокислотного состава в свою очередь способно влиять на сум-

марный заряд молекулы фермента и его физико-химические свойства.

Выводы.

1. Развитие неопластического процесса характеризуется увеличением количества диаминомонокислот в ткани эндометрия и уменьшением количества этих аминокислот в опухолевых тканях яичника.

2. Доля моноаминодикарбоновых аминокислот, вносящих свой вклад в суммарный заряд белковой молекулы уменьшается по мере прогрессии опухолевого процесса яичниках и увеличивается в молекуле карбоксипептидазы А доброкачественной опухоли эндометрия.

3. По мере прогрессии опухолевого процесса в ткани яичника увеличивается содержание гидроксил-содержащих аминокислот, потенциально способных участвовать в катализе.

4. Количество цистеина в ферменте, выделенном из опухолевых тканей как яичника так и эндометрия значительно ниже, чем в ферменте из не измененных тканей этих органов и снижается по мере развития опухолевой прогрессии.

Список использованных источников

1. Зелинский В. Г. Количественное определение метионина в зерне с использованием ферментативного гидролиза // Биохимические методы исследования селекционного материала. Сборник научных трудов. – Одесса: ВСГИ, 1979. – Вып. XV. – С. 29-35.
2. Лапач С. Н. "Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel" / С. Н. Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич – К.: Морион, 2000. – 320 с.
3. Пилявская А. С. Выделение и свойства карбоксипептидазы *Streptomyces Griseus*. Дисс. на соискание к. б. н., Киев, 1977. – 133 с.
4. Bates L. S. Rapid determination of free proline for water-stress studies // Plant and Soil. – 1973. – Vol. 39, № 1. – P. 205-207.

I. Вовчук, д-р біол. наук

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова, Одеса, Україна

АМІНОКИСЛОТНИЙ СКЛАД КАРБОКСИПЕПТИДАЗИ А НЕЗМІНЕНОЇ ТА ПУХЛИННИХ ТКАНИН ЕНДОМЕТРІЯ ТА ЯЄЧНИКІВ

Досліджений якісний і кількісний склад препарату карбоксипептидази А, що отримана з не зміненої тканини і тканин доброякісних і злоякісних пухлин ендометрія та яєчника. Показано, що розвиток неопластичного процесу характеризується збільшенням кількості діаміномоноткарбонових кислот в тканині ендометрія та зменшенням кількості цих амінокислот в пухлинних тканинах яєчника. Частка моноамінодикарбонових амінокислот, що вносять свій вклад в сумарний заряд білкової молекули зменшується у міру прогресії пухлинного процесу в яєчниках і збільшується в молекулі карбоксипептидази А доброякісної пухлини ендометрія. Встановлено, що у міру прогресії пухлинного процесу в тканині яєчника збільшується вміст гідроксил-амінокислот, які потенційно здатні брати участь в каталізі. Кількість цистеїну у ферменті, виділеному з пухлинних тканин як яєчника так й ендометрія значно нижче, ніж у ферменті із не змінених тканин цих органів і знижується у міру розвитку пухлинної прогресії. Отримані результати свідчать про те, що карбоксипептидаза А не зміненої та пухлинних тканин яєчника та ендометрія значно відрізняється за якісним і кількісним складом

Ключові слова: карбоксипептидаза А, амінокислотний склад, пухлина, ендометрій, яєчник

I. Vovchuk, DSc

Odessa National University of I.I. Mechnikov, Odessa, Ukraine

AMINO-ACID CONTENT OF A CARBOXYPEPTIDASE A FROM NON- MALIGNANT AND TUMOR TISSUES OF ENDOMETRIUM AND OVARUM

The qualitative and quantitative structure of a preparation of a carboxypeptidase A, not changed fabric received from and fabrics of benign and malignant tumors an endometrium and an ovaries is investigated. It is shown that development of neoplastic process is characterized by increase in quantity the diaminomonocarbonic of acids in fabric an endometrium and reduction of amount of these amino acids in tumoral tissues of an ovary. The share the monoaminodicarbonic of the amino acids making the contribution to a total charge of a proteinaceous molecule decreases in process of a progression of tumoral process ovaries and the endometrium increases in a molecule of a carboxypeptidase A a benign tumor. It is established that in process of a progression of tumoral process in tissue of an ovary the contents a hydroxyl – the containing amino acids potentially capable to participate in a catalysis increases. The amount of cysteine in the enzyme emitted from tumoral fabrics as an ovary and an endometrium is much lower, than in enzyme from not changed fabrics of these bodies and decreases in process of development of a tumoral progression. The received results testify that a carboxypeptidase A but not changed and tumoral tissues of an ovary and the endometrium considerably differs on qualitative and quantitative composition of amino acids.

Key words: carboxypeptidase A, content of amino acids, tumor, endometrium, ovarian.

5. Bradshaw R. S. The amino acid sequence of bovine carboxypeptidase A / L. H. Ericsson, K. A. Wals, H. Neurath // *Proceedings of the National Academy Science USA*. – 1969. – Vol. 63, № 4. – P. 1389-1394.

6. Esswein A. Construction and chemotherapeutic potential of carboxypeptidase A/monoclonal antibody conjugate / E. Hanseler, Y. Montejano, K.S. Vitols, F.M. Huennekens // *Advances in Enzyme Regulation*. – 1991. – Vol. 31. – P. 3-12.

7. Gaitonde M. A rapid and direct method for the quantitative determination of tryptophan in the intact protein/ Gaitonde M. K., Dovey T. // *Biochemistry Journal*. – 1970. – Vol. 11, № 7. – P. 907-911.

8. Goldstein S. Human mast cell carboxypeptidase. Purification and characterization / Goldstein S. M., Kaempfer C. E., Kealey J. T., Wintrob B. U. // *Journal Clinical Investigate*. – 1989. – Vol. 83, № 5. – P. 1630-1636.

9. Jaffray C. Specific pancreatic enzymes activate macrophages to produce tumor necrosis factor-alpha: role of nuclear factor kappa B and inhibitory kappa B proteins / C. Mendez, W. Denham, G. Carter, J. Norman // *Journal Gastrointestinal Surgery*. – 2000. – Vol. 4. – P. 370-377.

10. Michel A. Cleavage of atrial natriuretic peptide by a kidney membrane-bound carboxypeptidase A / J. Nortier, A. Humblet, C. Paradis, E. De Prez, M. Deschodt-Lanckman // *Peptides*. – 1998. – Vol. 19. – № 5. – P. 907-912.

11. Moore S. Chromatography of amino acids on sulfonated polystyrene resins / Moore S., Stein W. H. // *Journal Biological Chemistry*. – 1953. – Vol. 192. – P. 663 – 681.

12. Moore S. On the determination of cystine as cysteic acid/ Moore S. // *Journal Biological Chemistry*. – 1963. – Vol. 238, № 1. – P. 235-237.

13. Pascual R. Purification and properties of five different forms of human procarboxypeptidases / F. J. Burgos, M. Salva, F. Soriano, E. Mendez, F.X. Aviles // *European Journal Biochemistry*. – 1989. – Vol. 179, № 3. – P. 609-616.

14. Skidgel R. Human carboxypeptidase M. Purification and characterization of a membranebound carboxypeptidase that cleaves peptide hormones/ Skidgel R. A., Davis R. M., Tan F. // *Journal Biological Chemistry*. – 1989. – Vol. 264, № 4. – P. 2236-2241.

15. Skigel R. A. Isolation and characterization of a basic carboxypeptidase from human seminal plasma/ Skigel R. A., Deddish P. A., Davis R. M. // *Archives Biochemistry Biophysics*. – 1988. – Vol. 267. – № 2. – P. 660-667.

Надійшла до друку 22.12.15

УДК 616.329-001.37-053

Я. Расцька, канд. біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

РІВЕНЬ ПРОЗАПАЛЬНИХ ТА ПРОТИЗАПАЛЬНИХ ЦИТОКІНІВ У СИРОВАТЦІ КРОВІ ЩУРІВ ЗА УМОВ МОДЕЛЮВАННЯ ЛУЖНОГО ОПІКУ СТРАВОХОДУ 1 ТА 2 СТУПЕНЯ

Досліджено, що при моделюванні лужного опіку стравоходу 1 та 2 ступеня у статевонезрілих щурів відбувався запальний процес, який пригнічував функції імунної системи організму на 7 та 15 доби. Встановлено зміни прозапальних цитокінів (підвищенням вмісту IL-1 β , зниження IL-12) та протизапальних цитокінів (зростання рівню IL-10, зниження IL-4) найсуттєвіші зміни були при моделюванні лужного опіку стравоходу 2 ступеня. Показано, що при моделюванні опіку стравоходу 1 ступеня септичних ускладнень не відбувалось, при моделюванні 2 ступеня залишався ризик поліорганної недостатності або сепсису.

Ключові слова: опік стравоходу, прозапальні, протизапальні, інтерлейкіни.

Вступ. Відповідно до сучасних уявлень про опікову хворобу, одна з основних причин обтяженого перебігу опіку – є розвиток запального процесу. Основним фактором, відповідальним за розвиток запального процесу в організмі, є ослаблення імунного захисту з порушенням бар'єрної функції організму. У реалізації запальної реакції значну роль відіграє імунна система, впливаючи на гуморальні фактори специфічного і неспецифічного імунітету, і на місцеву дію, коли клітини імунної системи наближаються до джерела антигенної інформації, виділяють локально цитокіни, розрізняють і вбивають клітину [1,17]. У розвитку запального процесу важливу функцію виконують прозапальні інтерлейкіни (ІЛ), ІЛ-1 β , ІЛ-12 [2]. Ці цитокіни беруть участь у реалізації як специфічного, так і неспецифічного імунітету [3,17]. Наступний етап репарації включає стихання запальної реакції і посилений синтез колагену. Протизапальні інтерлейкіни, до яких відносять ІЛ-10 та ІЛ-4, які здатні зменшувати запальні прояви [3,5,12].

Незважаючи на великий обсяг досліджень недостатньо вивчені залишаються ряд питань по даній проблематиці, оскільки найчастіше відбувається механічне перенесення закономірностей перебігу опікової хвороби у дорослих в дитячу клініку.

Тому, метою даної роботи було дослідження цитокінів імунної системи у сироватці крові статевонезрілих щурів за умов моделювання лужного опіку стравоходу 1 та 2 ступеню на 7 та 15 доби.

Матеріали та методи. У дослідках використовували білих нелінійних статевонезрілих щурів (1-місячних) масою 90–110 г (відповідають 1-4-річному віку дітей) із дотриманням загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (вересень 2001 р.), інших міжнародних угод і національного законодавства в цій галузі. Тварин утримували на стандартному раціоні віварію. Їм експериментально моделювали лужний опік стравоходу (ЛОС) 1 та 2 ступеня розчином NaOH 10%, 20%, відповідно [4]. Сироватку для дослідження відбирали на 7 та 15 доби, які відповідають стадії ранньої і пізньої токсемії опікової хвороби [6]. Методом виведення тварин із досліді була цервікальна дислокація. Рівень цитокінів (інтерлейкіну-1 β , інтерлейкіну-12, інтерлейкіну-4, інтерлейкіну-10) у сироватці крові піддослідних тварин визначали методом імуноферментного аналізу з використанням наборів реактивів Biotrak ELISA System фірми "Healthcare" згідно з інструкціями. Статистичну обробку отриманих результатів проводили за допомогою методів

варіаційної статистики та кореляційного аналізу з використанням комп'ютерної програми Excel. Для визначення достовірності відмінностей між двома вибірками використовували критерій Стьюдента (t). При цьому достовірними вважались різниці $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення. В багатьох наукових роботах доведено, що на опікову травму, організм відповідає неспецифічною запальною реакцією, яка проявляється викидом цитокінів [6,12,17]. Вираженість цієї реакції залежить від площі та глибини ураження, характеру інфекційного агента та активності імунної відповіді постраждалого організму.

В період ранньої і пізньої токсемії (що припадає на 7-15 доби), знижується активність транспорту кисню до тканин. Тяжка і тривала гіпоксія тканин активує ендотеліальні клітини, котрі звільняють медіатори запалення та мітогенні молекули. Медіатори запалення індукують адгезію нейтрофілівних гранулоцитів і непрямым шляхом ініціюють проліферацію гладком'язових клітин. Під час процесу адгезії лейкоцити активуються і звільняють вільні радикали та протеази. Вони пошкоджують біологічні молекули (зокрема – колаген). Проліферуючі гладком'язові клітини змінюють свій фенотип і втрачають здатність до фізіологічного скорочення. Венозний стаз призводить до церебральної ішемії та цитотоксичного набряку, що виникає в результаті метаболічного ацидозу [3,6,7].

Цитокіни впливають практично на всі клітини, що беруть участь у розвитку запалення, включаючи гранулоцити, макрофаги, фібробласти, клітини ендотелію і епітелію, Т- і В-лімфоцити [8]. При опіковій травмі значення цитокінів важко переоцінити на місцевому і системному рівнях. При тяжкому запаленні цитокіни потрапляють в кров, що призводить до гострої відповіді на рівні всього організму. У розвитку запалення при опіках важлива роль належить прозапальним цитокінам: ФНП- α , ІЛ-1, ІЛ-6, ІЛ-1 β , ІЛ-12.

Нами були досліджені прозапальні інтерлейкіни до яких відносяться ІЛ-1 β , ІЛ-12. Вони стимулюють проліферацію Т- і В-лімфоцитів, продукцію антитіл, посилюють синтез адгезивних молекул, активують синтез білків гострої фази, беруть участь у реалізації як специфічного, так і неспецифічного імунітету [3,5,17]. ІЛ-1 β , є одним з ключових цитокінів, який характеризує рановий процес. Дослідження ІЛ-1 β в сироватці крові показало збільшення цитокіну в порівнянні з інтактними тваринами (рис. 1).

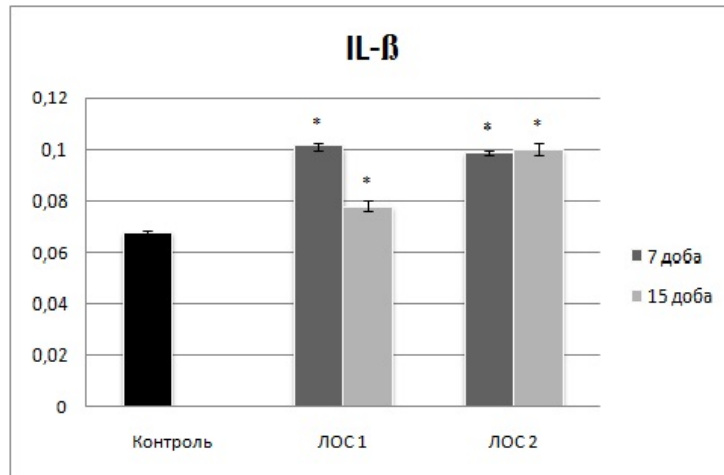


Рис. 1. Рівень прозапального цитокіна (IL-1β) (ум.од.) сироватки крові щурів за умов експериментального моделювання лужного опіку стравоходу 1 та 2 ступеня. (M±m, n=10)

* – $p < 0,05$ порівняно з контролем.

При моделюванні ЛОС 1 ступеня на 7, 15 доби рівень зростав на 60%, 14% відповідно. За умов 2 ступеня на 45%, 47% відповідно, порівняно з контрольними значеннями. Отримані дані узгоджуються з літературними, та свідчать про перебіг ранового процесу у щурів опіком, який характеризується тривалим підвищенням вмісту IL-1β [3].

Основними продуцентами IL-12 є моноцити, макрофаги, нейтрофіли, активовані лімфоцити. Індукторами синтезу цитокіну служать мікробні компоненти і продукти. Було показано, що IL-12 є ключовим цитокіном для посилення імунної відповіді та ініціації протиінфекційного захисту. Основними клітинами-мішенями IL-12 є природні кілери і Т-лімфоцити. Цитокін активує диферен-

ціювання Т-лімфоцитів, підвищує їх цитотоксичну активність [12]. Досліджуючи рівень ІЛ-12 за умов моделювання опіку були показані наступні зміни (рис. 2). При моделюванні ЛОС 1 ступеня на 7 добу рівень знижувався на 12%, на 15 добу зростав на 3%. За умов моделювання 2 ступеня на 7, 15 доби рівень ІЛ-12 знижувався на 6%, 10% відповідно, порівняно з контрольними значеннями. Отже, відзначалось незначне збільшення рівня IL-12 при моделюванні ЛОС 1 ступеня, що свідчить про відсутність септичних ускладнень. Зниження концентрації IL12, яке ми спостерігали при моделюванні опіку 2 ступеня свідчило про ризик розвитку поліорганної недостатності [9,10].

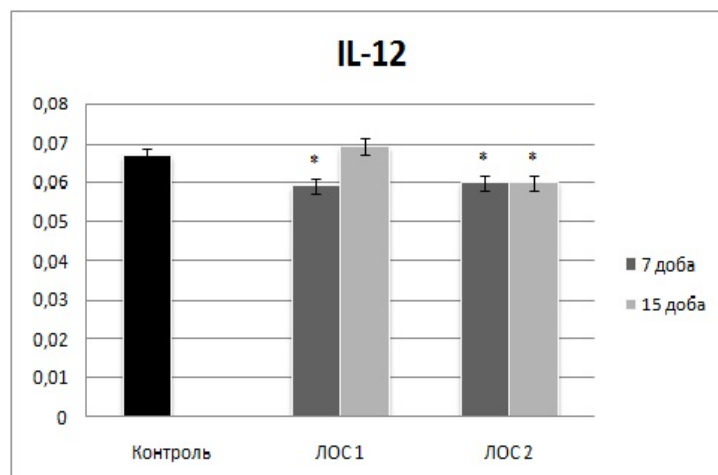


Рис. 2. Рівень прозапального цитокіна (IL-12) (ум.од.) сироватки крові щурів за умов експериментального моделювання лужного опіку стравоходу 1 та 2 ступеня. (M±m, n=10)

* – $p < 0,05$ порівняно з контролем

Таким чином, рівень деяких цитокінів в крові при опіковій травмі розглядається як патофізіологічна ланка ураження органів та розвитку поліорганної недостатності, сепсису [11]. Групою китайських дослідників була встановлена прогностична роль підвищення концентрації ІЛ-10, в період токсемії [12]. Саме високий рівень ІЛ-10 пов'язують з високим ризиком септичних ускладнень після опіків [13,14].

Тому наступним етапом нашої роботи було дослідження протизапальних інтерлейкінів до яких відносяться ІЛ-10, ІЛ-4. Вони синтезовані TH2 і TH3 клітинами, є антагоністами прозапальних цитокінів і володіють здатністю пригнічувати їх біологічну активність, зокрема, вони пригнічують проліферацію і відповідь Т-лімфоцитів на антигени, гальмують продукцію ІЛ-1, ФНП-α, оксиду азоту і простагландинів, зменшуючи,

таким чином, запальні прояви [3,5,12]. Дослідження ІЛ-10 в сироватці крові статевонезрілих щурів показало збільшення цитокіну в порівнянні з інтактними тваринами (рис. 3). При моделюванні ЛОС 1 ступеня на

7 добу рівень зростав на 6%, на 15 добу наближався до рівню контролю. За умов ЛОС 2 ступеня рівень зростав на 1,5%, 13% відповідно, порівняно з контрольними значеннями.

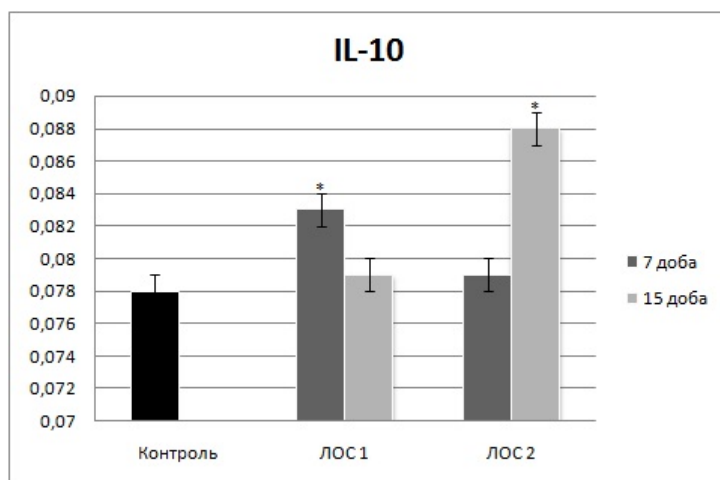


Рис. 3. Рівень протизапального цитокіна (ІЛ-10) (ум.од.) сироватки крові щурів за умов експериментального моделювання лужного опіку стравоходу 1 та 2 ступеня. ($M \pm m$, $n=10$)

* – $p < 0,05$ порівняно з контролем

Інші дослідники включають в критерії несприятливого результату при сепсисі і підвищення концентрації ІЛ-6 [12,15]. Встановлено, що одним з факторів підвищення ІЛ-6 при опіковій травмі є зниження концентрації ІЛ-4 (негативна достовірна кореляція), тому рівень ІЛ-4 також розглядається як прогностичний фактор виникнення ускладнень [16]. При дослідженні рівня ІЛ-4 за умов моделювання опіку були показані наступні зміни (рис. 4). За умов моделювання ЛОС 1 ступеня на 7, 15 доби рівень знижувався на 7%, 14%, відповідно. За умов моделювання 2 ступеня

на 7, 15 доби рівень ІЛ-4 знижувався на 11%, 8% відповідно, порівняно з контрольними значеннями.

Отже, були виявлені певні особливості змін рівнів прозапальних та протизапальних цитокінів при моделюванні ЛОС 1, 2 ступеня у статевонезрілих щурів. Отримані дані свідчать, що ЛОС 1 ступеня протікав без розвитку септичних ускладнень, при моделюванні ЛОС 2 ступеня залишався ризик поліорганної недостатності або сепсису. У зв'язку з цим, доцільною є імунологічна і метаболічна корекція в лікуванні опікових хворих.

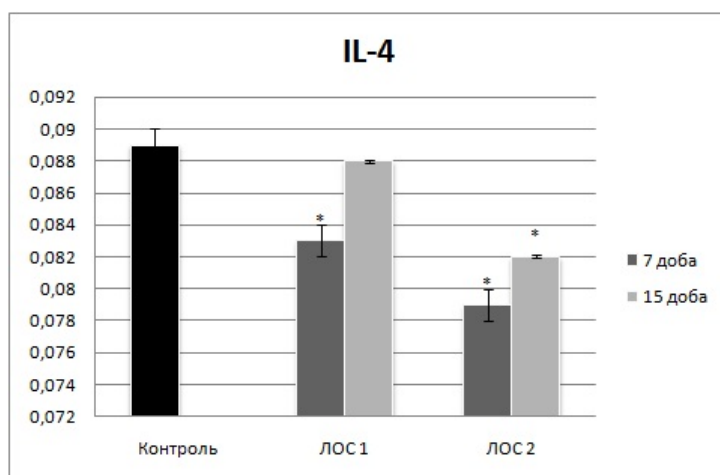


Рис. 4. Рівень протизапального цитокіна (ІЛ-4) (ум.од.) сироватки крові щурів за умов експериментального моделювання лужного опіку стравоходу 1 та 2 ступеня. ($M \pm m$, $n=10$)

* – $p < 0,05$ порівняно з контролем

Висновок

Отже, було досліджено, що при моделюванні лужного опіку стравоходу 1 та 2 ступеня у статевонезрілих щурів відбувався запальний процес, який пригнічував функції імунної системи організму на 7 та 15 доби.

Показано, що при моделюванні опіку стравоходу 1,2 ступеня відбувалось тривале підвищенням вмісту ІЛ-1 β

на 7, 15 доби. Встановлено зниження ІЛ-12 при моделюванні опіку стравоходу 2 ступеня. Виявлено зростання рівню ІЛ-10 та зниження ІЛ-4 найбільше при експериментальному опіку 2 ступеня.

Встановлені зміни рівнів прозапальних та протизапальних цитокінів вказують, що при моделюванні лужного опіку стравоходу 1 ступеня септичних ускладнень

не відбувалось, при моделюванні 2 ступеня залишався ризик поліорганної недостатності або сепсису.

Список використаних джерел

1. Казаков В.Н. Пути взаимодействия нервной, эндокринной и иммунной систем в регуляции функций организма / Казаков В.Н., Снегирь М.А., Снегирь А.Г. и др. // Архив клинической и экспериментальной медицины. – Т.13, № 1–2. – 2004. – С. 3–10.
2. Змушко Е.И., Белозеров Е.С., Митин Ю.А. Клиническая иммунология. Руководство для врачей. – СПб, 2001. – 574 с.
3. Поликарпова А. В. Сравнительное изучение динамики уровней провоспалительных и противовоспалительных цитокинов при ожогах кожи различной природы / А. В. Поликарпова, Е. Э. Перский // Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Серія : Біологія. – 2011. – № 971, вип. 14. – С. 27–32.
4. Я.Б. Раецкая. Экспериментальная модель лужного ожога I та II-го ступеню страховоходу у статевонезрілих щурів / Я.Б. Раецкая, Т.В. Ішук, О.М. Савчук Л.І. Остапченко. // Науковий вісник Чернівецького національного університету імені Юрія Федьковича. Біологія. – 2014. – Т.6. – С. 129–132.
5. Ward P.A. The acute inflammatory response and its regulation / Ward P.A., Lentsch A.B. // Archives of Surgery. – 1999. – №134. – P. 666–669.
6. Фисталь Э.Я., Козинец Г.П., Самойленко Г.Е., Носенко В.М., Фисталь Н.Н., Солошенко В.В. Комбустиология: Учебник. – Донецк, 2005. – 315 с.
7. Оглоблина В. М. Современные основы патогенеза острой церебральной ишемии / В. М. Оглоблина // Український журнал екстремальної медицини імені Г. О. Можая. – 2005. – Том 6. – №2. – С. 81–87.
8. Belardelli, F. Role of interferons and other cytokines in the regulation of the immune response / F. Belardelli // APMIS. – 1995. – Vol. 103 (3). – P. 161–179.

9. Koller M. Liberation of interleukin 12 (IL12) after trauma and polytrauma / Koller M., David A., Hahn M.P. et al. // Langenbecks Arch. Chir. Suppl. Kongressbd. – 1998. – Vol. 115, Suppl. 1. – P. 453–456.

10. Wick M. Does liberation of interleukin 12 correlate with the clinical course of polytraumatized patients? / Wick M., Kollig E., Walz M. et al. // Chirurg. – 2000. – Vol. 71, № 9. – P. 1126–1131.

11. Agay, D. Interleukin-6, TNF-alpha and interleukin-1 beta levels in blood and tissue in severely burned rats / D. Agay, M. Andriollo-Sanchez, R. Claeysen et al. // Agay, D. // European Cytokine Network. – 2008. – Vol. 19 (1). – P. 1–7.

12. Zhou, H. Changes in serum contents of interleukin-6 and interleukin-10 and their relation with occurrence of sepsis and prognosis of severely burned patients / J. Zhou, J.J. Tu, Y. Huang et al. // Zhonghua Shao Shang Za Zhi. – 2012. – Vol. 28 (2). – P. 111–115.

13. Lyons, A. Major injury induces increased production of interleukin-10 by cells of the immune system with a negative impact on resistance to infection / A. Lyons, J.L. Kelly, M.L. Rodrick et al. // Annual Surgery. – 1997. – Vol. 226 (4). – P. 450–458.

14. Napolitano, L.M. Nitric oxide inhibition normalizes splenocyte interleukin-10 synthesis in murine thermal injury / L.M. Napolitano, C. Campbell // Archive Surgery. – 1994. – Vol. 129 (12). – P. 1276–1282.

15. Pileri, D. Concentrations of cytokines IL-6 and IL-10 in plasma of burn patients: their relationship to sepsis and outcome / D. Pileri, A. Accardo Palombo, L. D'Amelio et al. // Annual Burns Fire Disasters. – 2008. – Vol. 21 (4). – P. 182–185.

16. Messingham, K.A. Interleukin-4 treatment restores cellular immunity after ethanol exposure and burn injury / K.A. Messingham, S.A. Heinrich, E.M. Schilling et al. // Alcoholic Clinical Experimental Research. – 2002. – Vol. 26 (4). – P. 519–526.

17. Paunel-Görgülü, A. Molecular mechanisms underlying delayed apoptosis in neutrophils from multiple trauma patients with and without sepsis / A. Paunel-Görgülü, T. Kirichevska, T. Lögters et al. // Molecular Medicine. – 2012. – Vol. 18 (1). – P. 325–335.

Надійшла до редколегії 22.12.15

Я. Раецкая, канд. биол. наук

Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

УРОВЕНЬ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ И ПРОТИВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ КРЫС ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ЩЕЛОЧНОГО ОЖОГА ПИЩЕВОДА 1 И 2 СТЕПЕНИ

Доказано, что при моделировании щелочного ожога пищевода 1 и 2 степени у неполовозрелых крыс происходил воспалительный процесс, который угнетал функции иммунной системы организма на 7 и 15 суток. Установлены изменения провоспалительных цитокинов (повышение содержания IL-1 β , снижение IL-12) и противовоспалительных цитокинов (рост уровня IL-10, снижение IL-4) более существенные изменения наблюдали при моделировании щелочного ожога пищевода 2 степени. Показано, что при моделировании ожога пищевода 1 степени септических осложнений не происходило, при моделировании 2 степени оставался риск полиорганной недостаточности или сепсиса.

Ключевые слова: ожог пищевода, провоспалительные, противовоспалительные, интерлейкины.

Ya. Raetska, PhD

Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

PROINFLAMMATORY AND ANTI-INFLAMMATORY CYTOKINES LEVEL IN RAT'S SERUM UNDER MODELING ALKALI BURNS OF THE ESOPHAGUS OF 1ST AND 2ND DEGREES

It was investigated under modeling alkali burns of the esophagus of 1st and 2nd degrees in immature rats was occurred inflammation that inhibited functions of the immune system at 7th and 15th day. Determined changes of proinflammatory cytokines (increased content of IL-1 β , IL-12 decrease) and anti-inflammatory cytokines (growth level of IL-10, decreased IL-4) were the most significant at the modeling 2nd degrees esophageal alkali burns. It is shown that at modeling esophagus burns of 1st degree not take place septic complications and under modeling 2nd degrees the risk of multiple organ failure or sepsis were occurred.

Keywords: burn of the esophagus, proinflammatory cytokines, anti-inflammatory cytokines, interleukins.

УДК 616-005.4 + 546.41

А. Майстренко, мол. наук. співроб., Н. Войтенко, д-р мед. наук
Інститут фізіології імені О.О. Богомольця, НАН України, Київ

ОСОБЛИВОСТИ КАЛЬЦІЄВОЇ СИГНАЛІЗАЦІЇ ПРИ ІШЕМІЧНОМУ УРАЖЕННІ НЕРВОВИХ ТКАНИН – НЕЙРОНІВ ГІППОКАМПА

Цей огляд описує особливості роботи систем, що забезпечують гомеостаз кальцію під час ішемічного ураження нейронів гіпокампа. Під час ішемії надлишок внутрішньоклітинного Ca²⁺, ексайтотоксична активність глутамату та супутні утворення вільних радикалів являються одними з основних факторів, що сприяють uszkodженню та наступній загибелі нейронів в певних зонах гіпокампу. Розуміння механізмів здатних попередити uszkodження нейронів під час ішемії та запобігти розвитку ураження сьогодні являється ключовим для розробки стратегій нейропротективних пост- та прекодиціонувань.

Ключові слова: SERCA – Ca²⁺-АТФаза ендоплазматичного ретикулу, PMCA – Ca²⁺-АТФаза плазматичної мембрани, ішемічне ураження, гіпокамп.

Вступ. Оскільки лікарські засоби та терапевтичні методики, що працюють на тваринах та допомагають попереджати розвиток ішемічного ураження у людини викликають побічні ефекти і часто є токсичними сьогодні значну увагу приділяють дослідженню механізмів

перебігу ішемічного ураження мозку та пошуку і активації ендогенних нейропротективних стратегій.

Патогенез церебрального ішемічного uszkodження включає багаточисленні процеси, які мають загальний алгоритм як в нейронах гіпокампа, так і в нейронах

будь-якого іншого відділу мозку, проте можуть розвиватися з різною швидкістю. Насамперед, це зниження продукування енергії, пригнічення аеробного і активація анаеробного шляху утилізації глюкози, порушення активного транспорту іонів через мембрани з розкриттям агоніст-залежних Ca^{2+} -каналів в нейронах, через надмірне накопичення Ca^{2+} в мітохондріях [1, 19] порушується їхня робота з наступним виходом Ca^{2+} в цитоплазматичний простір не лише з мітохондрій але й з ендоплазматичного ретикулу, спостерігається відхилення в функціонуванні ексайтотоксичних медіаторів збудження, розвиток ексайтотоксичності та цитокін-опосередкованої цитотоксичності, накопичення вільних радикалів та багато ін. [28]. Серед численних механізмів, що лежать в основі uszkodження та смерті нейронів під час інсульту, глутамат-опосередкована ексайтотоксичність та вхід великої кількості Ca^{2+} відіграє провідну роль, окрім того саме вони задіяні у розвитку відстроченої загибелі нейронів CA1 зони гіпокампа [12,24]. Вразливість нейронів до ішемічного uszkodження варіює у різних регіонах центральної нервової системи. Різні популяції нейронів у мозку також показують неоднакову сприйнятливості до ішемії. Численні дослідження показали що пірамідальні нейрони CA1 зони гіпокампа являються надзвичайно чутливими до ішемічного uszkodження і гинуть на 2-3 день після фокальної транзиторної ішемії, в той час як в CA3 зоні пірамідальні нейрони залишаються життєздатними і виживають [10, 20].

Механізми такої вибіркової загибелі клітин тривалий час залишаються не повністю зрозумілими. Дослідження транскрипційних факторів, білків та сигнальних систем, здатних забезпечувати Ca^{2+} гомеостаз у клітині, є багатобічним для розуміння фундаментальних процесів, що відбуваються під час перебігу ішемічного ураження та пошуку стратегій здатних попередити негативні та летальні наслідки.

Системи та механізми, що контролюють вміст Ca^{2+} в цитоплазматичному просторі.

Іони кальцію виступають важливими внутрішньоклітинними посередниками багатьох процесів. У відповідь на адекватні стимули внутрішньоклітинна концентрація кальцію $[\text{Ca}^{2+}]_i$ збільшується, осцилює і зменшується, що веде до активації, модуляції і припинення клітинних функцій. Багаточисленні кальцієві канали і насоси забезпечують його вхід і вихід з клітини, переміщення між цитозолем та внутрішньоклітинними депо. Клітинам доступні два джерела кальцію: нескінченні запаси зовнішнього кальцію і обмежений запас у внутрішніх депо ендоплазматичного ретикулу. Концентрація вільного кальцію Ca^{2+} в зовнішньоклітинному просторі становить 1,2 mM, в той час як концентрація цитоплазматичного кальцію близько 100 nM. Кальцієвим депо в клітині є ендоплазматичний ретикулум, вміст кальцію в ньому близько 0,5 mM. Для забезпечення сталого рівня йонів Ca^{2+} плазматична мембрана, як правило, містить три системи: Ca^{2+} канали, Ca^{2+} -АТФ-азу, та Na^+ - Ca^{2+} обмінник.

Вхід кальцію за градієнтом концентрації здійснюється в основному Ca^{2+} каналами плазматичної мембрани. Вихід же Ca^{2+} здійснюється Ca^{2+} -АТФ-азою (PMCA) та Na^+ - Ca^{2+} -обмінником (NCX). Найважливішими мембранними структурами, які контролюють концентрацію іонів Ca^{2+} є кальцієві канали. При активації канали формують миттєві іоноселективні пори, через які іони кальцію проникають всередину клітини за градієнтом концентрації. В плазматичній мембрані є три основні типи каналів для входу кальцію: потенціалкеровані (VGC), рецепторкеровані (RGC), та канали регульовані вивільненням з депо (SOCC). Ці три канали мають різні кінетичні властивості, потенціал- та рецептор-керовані канали зазвичай дають короткі всплески високої інтенсивності в той час як канали керовані депо кальцію (SOCC) забезпечують менший, але постійний приток кальцію табл. [2].

Таблиця. Системи, що забезпечують гомеостаз йонів Ca^{2+} [23]

Клітинна структура	Забезпечення входу	Забезпечення виходу
Плазматична мембрана	NCX, VGC, RGC, SOCC	NCX, PMCA
Мембрана ЕПР	SERCA	(RyRs), (IP3Rs)
Мітохондріальна мембрана	Мітохондріальний NCX, Юніпортер, MMCA	Мітохондріальний NCX MPT-пора

Примітка:

SERCA – Ca^{2+} -АТФаза ендоплазматичного ретикулу,
PMCA – Ca^{2+} -АТФ-аза плазматичної мембрани,
NCX – Na^+ - Ca^{2+} -обмінник,
RyRs – ріанодинові канали,
IP3Rs – інозитол-1,4,5-трифосфатні,
VGC – потенціалкеровані,
RGC – рецепторкеровані,
SOCC – канали регульовані вивільненням з депо.

При цьому в той час як, плазматична мембрана клітини містить кілька типів каналів, що опосередковують вхід Ca^{2+} з зовнішньоклітинного середовища, в ній наявна лише одна система для виведення йонів Ca^{2+} за межі цитоплазматичного простору – високоафінна, малоємнісна Ca^{2+} -АТФаза (кальцієва помпа плазматичної мембрани, PMCA – plasma membrane calcium pump), що необхідну для підтримання сталого рівня Ca^{2+} , а також регулювання його цитоплазматичних осциляцій. Окрім цієї системи виведення Ca^{2+} через плазматичну мембрану в клітині існує низькоафінний високоємнісний Na^+ / Ca^{2+} -обмінник (NCX), в клітині Na^+ / Ca^{2+} -обмінник здатний як виводити Ca^{2+} за межі клітини так і забезпечувати його накопичення в мітохондріях. До того ж депо ЕПР має Ca^{2+} -АТФазу (SERCA – Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase), що також за-

безпечує вихід йонів Ca^{2+} з цитоплазми до ендоплазматичного ретикулу. Вихід же Ca^{2+} з ендоплазматичного ретикулу опосередковується двома типами рецепторкерованих каналів: ріанодинові канали (RyRs) та інозитол-1,4,5-трифосфатні (IP3Rs). Типи каналів на мембранах та їхнє співвідношення залежить від типу клітин [4].

Особливості функціонування Ca^{2+} контролюючих систем: PMCA, SERCA, під час ішемічного ураження в нейронах гіпокампа.

Надлишок внутрішньоклітинного Ca^{2+} , ексайтотоксична активність глутамату та супутнє утворення вільних радикалів значною мірою сприяють загибелі нейронів в певних зонах гіпокампу [12,24]. Було показано, що за фізіологічних умов в нейронах гіпокампа основну роль у зниженні рівня цитоплазматичного Ca^{2+} відіграють PMCA [13, 25] і SERCA, тоді як вклад Na^+ - Ca^{2+} -

обмінника та мітохондрій в цьому процесі займає незначну роль, проте нехтувати вкладом мітохондрій в підтримання Ca^{2+} -гомеостазу не варто [16].

Ca^{2+} -АТФ-аза плазматичної мембрани (PMCA). У ссавців чотири окремі гени кодують чотири ізоформи PMCA: PMCA-1, PMCA-2, PMCA-3 та PMCA-4 [4]. PMCA-1 та PMCA-4 експресуються в переважній більшості тканин, PMCA-2 та PMCA-3 є більш тканинно-специфічними, це і тканини мозку, посмугована м'язова тканина. PMCA-2 присутня в нейронах Пуркінє в мозочку, кохлеарних волосяних клітинах, матці, печінці, нирках. PMCA3 експресується в судинному сплетенні.

Експресія PMCA регулюється іонами Ca^{2+} , що було досліджено на культурі нейронів і корелює з їхнім дозріванням. У гранулярних клітинах мозочку збільшення концентрації Ca^{2+} у цитоплазмі змінювало патерн експресії ізоформ PMCA. Відзначався високий рівень експресії усиченого варіанту PMCA-3, а експресія PMCA-4 взагалі зникала [7]. Перепрограмування транскрипції PMCA відіграє важливу роль у виживанні нейронів, а регуляція експресії PMCA може мати вирішальне значення для виживання клітин при патологічному збільшенні концентрації внутрішньоклітинного Ca^{2+} [26]. В нейронах гіпокампу щурів транскрипція всіх ізоформ PMCA в культурі була значно підвищена, загальне збільшення Ca^{2+} супроводжувалося змінами в експресії та клітинній локалізації різних ізоформ [9].

Нейрон специфічна PMCA-2 та присутня у більшості тканинах, ізоформа PMCA-4 розщеплюється каспазами. PMCA-2 розщеплюється *in vivo* після ішемічного ушкодження мозку, і після ексайтотоксичної стимуляції в нейронах запускається апоптоз. Наслідками інгібування PMCA була загибель нейронів пірамідального шару у CA1 зоні гіпокампа [18]. Фрагментація PMCA-2 в експериментах *in vitro* відбувалася більш обширно, що пояснювалося більшою концентрацією каспаз в експериментах [22]. Цікаво, що при дослідженні CA1-толерантних до ішемічного ураження нейронів гіпокампа на гербелах, було показано значне зниження рівня PMCA-1 за умов летального ішемічного ураження [18], а за умов 2-хв. ішемічного ураження, навпаки спостерігалось зростання рівня експресії PMCA-1 [8]. В наших експериментах (неопубліковані дані) ми показали зниження рівня експресії мРНК PMCA1 та PMCA2 у нейронах CA1 зоні гіпокампа під час ішемічного ураження, в той час як в CA3 зоні цих знижень не спостерігалось, оскільки викликає значний інтерес, скільки саме нейрони CA1 зоні відзначаються значною чутливістю до ішемічного ураження та високою смертністю.

Ca^{2+} -АТФаза ендоплазматичного ретикулуму (SERCA). У ссавців SERCA кодується трьома генами ATP2A 1-3, кожен з них в свою чергу кодує кілька ізоформ: SERCA-1a,b, SERCA-2a-c, SERCA-3a-f. Серед всіх цих ізоформ SERCA-2 основна, якщо не єдина яка була знайдена в майже усіх регіонах мозку. SERCA1 не детектувалася у мозку взагалі, а SERCA-3 була знайдена на досить високому рівні лише у нейронах Пуркінє мозочка і в корі головного мозку [6].

SERCA-2 завдяки альтернативному сплайсингу являються тканинно специфічними [14]. SERCA-2a експресується у скелетних, гладеньких та посмугованих м'язах [5]. SERCA-2b має високий рівень експресії в пірамідальних нейронах гіпокампу [15].

Під час ішемічного пошкодження спостерігалось швидке і значне зростання рівня внутрішньоклітинного $[\text{Ca}^{2+}]_i$ у нейронах CA1 зоні гіпокампа *in vivo* та в органістиповій культурі гіпокампа. Глутаматна ексайтотоксичність та спричинена нею висока концентрації $[\text{Ca}^{2+}]_i$ і вважається головним механізмом нейронального ішемічного пошкодження. Дослідження ж на дисоційованій культурі CA-1 нейронів гіпокампа показали, що енерге-

тичний дефіцит викликає швидке порушення гомеостазу Ca^{2+} в ендоплазматичному ретикулумі та призводить до незворотного зростання $[\text{Ca}^{2+}]_i$ та ушкодження нейронів за відсутності глутаматної експозиції. Було показано також, що вхід Ca^{2+} через потенціал-керовані канали та NCX посилює дезрегуляцію Ca^{2+} гомеостазу, але не є його основною причиною. Вихід Ca^{2+} з ендоплазматичного ретикулуму під час ішемії спричинений в основному недостатнім рівнем роботи SERCA, через недостатній енергетичний рівень, який в свою чергу обумовлений погіршенням функціонування мітохондрій в перші ж хвилини КГД (киснево-глюкозної депривації) [11].

В роботі по дослідженню SERCA-2 в кардіоміоцитах при гіпоксичному ураженні [21] було показано, значне зниження рівня експресії SERCA-2, що корелювало з високим рівнем транскрипційного фактору HIF-1 α . Робота цього ж транскрипційного фактору (HIF-1) за останніми даними впливає і на роботу ще однієї системи здатної знижувати рівень цитоплазматичного Ca^{2+} .

В дослідженнях пост-ішемічних змін в гіпокампі при 8 хв. глобальній ішемії було показано зниження рівня білка NCX1 в нейронах CA1 зони, в той час як в нейронах CA2 та 3 зони рівень не змінювався [3]. Нокдаун NCX1 збільшує ішемічне пошкодження мозку, і являється одним із генів-мішеней фактору індукованого гіпоксією (HIF-1), а надекспресія NCX1 індукована HIF-1 має нейропротективний ефект [27]. Супресія NCX3 приводила до загибелі нейронів в усіх зонах гіпокампу після ішемічного ушкодження. Дослідження проводилися на органістиповій культурі гіпокампа, і було виявлено що при видаленні NCX3 рівень смертності клітин спостерігався більшою мірою в CA3 зоні та DG в порівнянні з CA1 [17].

Висновки

Останні дослідження показують, що такі добре і досить давно відомі системи, як PMCA та SERCA за умов ішемічного ураження в нейронах гіпокампа відіграють важливу роль, і розуміння механізмів їхньої активації та стабілізації може дати поштовх у пошуку ендегенних нейропротективних стратегій попередження негативних наслідків ішемічного ураження. Взаємозв'язок же цих систем з одним із ключових факторів відповіді на зміну доступності кисню – HIF-1, може відігравати в цих адаптивних процесах надзвичайно важливу роль, яка на даний момент залишається майже не дослідженою і не розкритою. Останні дослідження провідних лабораторій світу, як і отримані нами результати, показують, що модулюючи роботу HIF-1 ми здатні впливати на відновлення кальцієвого гомеостазу.

Список використаної літератури

1. Basso E. Properties of the permeability transition pore in mitochondria devoid of cyclophilin D./ Basso E., Fante L., Fowlkes J.[et al.].//Journal of Biological Chemistry. –2005. – Vol. 280. – P. 18558–18561.
2. Berridge M. Elementary and global aspects of calcium signalling./ Berridge M.// The Journal of Experimental Biology. –1997. – Vol. 200, Pt 2. – P 315–319.
3. Bojarski C. Na⁺/Ca²⁺ exchanger subtype (NCX1, NCX2, NCX3) protein expression in the rat hippocampus following 3 min and 8 min durations of global cerebral ischemia./ Bojarski C., Meloni B., Moore, S. [et al.].// Brain Research. –2008. – Vol.1189. – P. 198–202.
4. Brini M. Calcium pumps in health and disease./ Brini, M., Carafoli, E. // Physiological Reviews. –2009. – Vol.89, № 4. – P. 1341–78.
5. Eggermont A.. Evidence for two isoforms of the endoplasmic reticulum Ca²⁺ pump in pig smooth muscle./ Eggermont A. Wuytack F., De Jaegere S.[et al.] //The Biochemical Journal. – 1989. – Vol.260, №3. – P. 757–761.
6. Foradori C. Activation of the androgen receptor alters the intracellular calcium response to glutamate in primary hippocampal neurons and modulates sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2 transcription./ Foradori C., Werner S., Sandau U.[et al.].// Neuroscience. – 2007. –Vol. 149, №1. –P. 155–164.
7. Guerini D. Calcineurin controls the expression of isoform 4CII of the plasma membrane Ca²⁺ pump in neurons./Guerini D., Wang X., Li L.[et al.] //Journal of Biological Chemistry. – 2000. – Vol.275, №5. – P. 3706–3712.
8. Kato K. Differential effects of sublethal ischemia and chemical preconditioning with 3-nitropropionic acid on protein expression in gerbil

hippocampus./ Kato K., Shimazaki K., Kamiya T.[et al.]/Life Sciences. – 2005. – Vol. 77, №23. – P. 2867–2878.

9. Kip S. Changes in the expression of plasma membrane calcium extrusion systems during the maturation of hippocampal neurons./ Kip S., Gray N., Burette A.[et al.]/Hippocampus. – 2006. – Vol.16, №1. – P. 20–34.

10. Kirino T. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia./Kirino T.//Brain Res. –1982. – Vol. 239, № 1. – P. 57–69.

11. Larsen G. Endoplasmic reticulum dysfunction and Ca²⁺ deregulation in isolated CA1 neurons during oxygen and glucose deprivation./ Larsen G., Skjellegrind H., Moe M.[et al.]/Neurochemical Research. –2005. – Vol.30, № 5. – P. 651–659.

12. Lehotsky J. Distribution of plasma membrane Ca²⁺ pump (PMCA) isoforms in the gerbil brain: effect of ischemia-reperfusion injury./ Lehotsky J., Kaplan P., Racay P.[et al.]/Neurochemistry International. – 1999. – Vol.35, № 3. – P. 221–227.

13. Lehotsky, J. Plasma membrane Ca²⁺-pump functional specialization in the brain – Complex of isoform expression and regulation by effectors./ Lehotsky, J.//Molecular and Chemical Neuropathology. – 1995. – Vol.25. – P. 175–187.

14. Lytton J. Molecular cloning of the mammalian smooth muscle sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase./ Lytton J., Zarain-Herzberg, Periasamy M.[et al.] // Journal of Biological Chemistry. – 1989. – Vol. 264, №12. – P. 7059–7065.

15. Miller K. Localization of an endoplasmic reticulum calcium ATPase mRNA in rat brain by in situ hybridization./ MillerK., Verma A., SnyderS. [et al.] //Neuroscience. – 1991. – Vol. 43, № 1. – P. 1–9.

16. Mironov S. Plasmalemmal and intracellular Ca²⁺ pumps as main determinants of slow Ca²⁺ buffering in rat hippocampal neurones./ Mironov S.//Neuropharmacology. –1995. – Vol.34, № 9. – P. 1123–32.

17. Molinaro P. Targeted disruption of Na⁺/Ca²⁺ exchanger 3 (NCX3) gene leads to a worsening of ischemic brain damage. / Molinaro P., Cuomo O., Pignataro G. [et al.] // The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience. – 2008. – Vol.28(5). – P.1179–84.

18. Oguro K. Histochemical study of Ca²⁺-ATPase activity in ischemic CA1 pyramidal neurons in the gerbil hippocampus. / Oguro K., Nakamura M., Masuzawa T.//Acta Neuropathologica. –1995. – Vol.90. – P. 448–53.

19. Pignataro G. Prolonged activation of ASIC1a and the time window for neuroprotection in cerebral ischemia. / Pignataro G., Simon R., Xiong Z. // Brain. –2007. – Vol.130. – P.151–58.

20. Pulsinelli W. Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia./Pulsinelli W., Brierley J., Plum F.// Ann. Neurol. –1982. – Vol. 11, № 5. – P. 491–498.

21. Revuelta-López E. Hypoxia-driven sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2 (SERCA2) downregulation depends on low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1)-signalling in cardiomyocytes./ Revuelta-López E., Cal R., Herraiz-Martínez A. [et al.] //Journal of Molecular and Cellular Cardiology. – 2015. – Vol.85. – P. 25–36.

22. Schwab B. Cleavage of plasma membrane calcium pumps by caspases: a link between apoptosis and necrosis./ Schwab B., Guerini D., Didszun C. [et al.]//Cell Death and Differentiation. – 2002. – Vol.9. – P.818–831.

23. Syntichaki P. The biochemistry of neuronal necrosis: rogue biology?/ Syntichaki P., Tavernarakis N. //Nature Reviews Neuroscience. – 2003. – Vol.4, №8. – P.672–684.

24. Szatkowski M. Triggering and execution of neuronal death in brain ischemia: Two phases of glutamate release by different mechanisms./ Szatkowski M., Attwell D.//Trends in Neurosciences. –1994. – Vol. 17, №9. – P. 359–365.

25. Toescu E. Region-specific activity of the plasma membrane Ca²⁺ pump and delayed activation of Ca²⁺ entry characterize the polarized, agonist-evoked Ca²⁺ signals in exocrine cells. / Toescu E., Petersen O. // Journal of Biological Chemistry. –1995. – Vol. 270, №15. – P. 8528–8535.

26. Usachev Y. Differentiation induces up-regulation of plasma membrane Ca²⁺-ATPase and concomitant increase in Ca²⁺ efflux in human neuroblastoma cell line IMR-32. /UsachevY., Toutenhoofd S., Goellner G. [et al.]//Journal of Neurochemistry. –2001. – Vol.76. – P. 1756–1765.

27. ValsecchiV.. NCX1 is a novel target gene for hypoxia-inducible factor-1 in ischemic brain preconditioning. Stroke/ Valsecchi V., Pignataro G., Del Prete A. [et al.]// Journal of Cerebral Circulation. –2011. – Vol.42, №3. – P. 754–763.

28. Woodruff T. Pathophysiology, treatment, and animal and cellular models of human ischemic stroke. / Woodruff T., Thundiyil J., TangS. [et al.] //Molecular Neurodegeneration. – 2011. – Vol. 6, №1. – P.6–11.

Надійшла до редколегії 14.12.15

A. Майстренко, млад. науч. сотр., Н. Войтенко, д-р біол. наук
Інститут фізіології імені А.А. Богомольця НАН України, Київ, Україна

ОСОБЕННОСТИ КАЛЬЦИЕВОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ ПРИ ИШЕМИЧЕСКОМ ПОРАЖЕНИИ НЕРВНОЙ ТКАНИ – НЕЙРОНОВ ГИППОКАМПА

В этом обзоре описываются особенности работы систем, обеспечивающих восстановление гомеостаза кальция во время ишемического повреждения нейронов гиппокампа. Высокий уровень внутриклеточного Ca²⁺, эксайтотоксическая активность глутамата и формирование свободных радикалов во время ишемии являются одним из основных повреждающих факторов, ведущих к дальнейшему повреждению нейронов гиппокампа. Понимание механизмов способных предупредить развитие повреждений сегодня является ключевым для разработки стратегий нейропротективного пост- и preconditionирования.

Ключевые слова: SERCA – Ca²⁺-АТФаза эндоплазматического ретикула, PMCA – Ca²⁺-АТФаза плазматической мембраны, ишемическое поражение, гиппокамп.

A. Maistrenko, junior researcher, N. Voitenko, DSc.
Bogomoletz Institute of Physiology NASU, Kyiv, Ukraine

FEATURES OF CALCIUM SIGNALING IN ISCHEMIC INJURY NERVOUS TISSUE – OF NEURONS IN THE HIPPOCAMPUS

This review describes the features of the systems to ensure the restoration of calcium homeostasis of hippocampal neurons during ischemic injury. High levels of intracellular Ca²⁺, glutamate excitotoxicity activity and the formation of free radicals during ischemia are a major damaging factors, leading to further damage to hippocampal neurons. Understanding the mechanisms able to prevent the development of damage today is key for the development of post- and preconditioning neuroprotective strategies.

Keywords: SERCA – Ca²⁺-ATPase of endoplasmic reticulum, PMCA – Ca²⁺-ATPase of plasmatic membrane, ischemic injury, the hippocampus.

УДК:602:575.853

Г. Світліна, асп., Л. Гарманчук, д-р біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ,
В. Шаблій, канд. біол. наук
Інститут клітинної терапії, Київ

МЕТОДИ ОТРИМАННЯ МУЛЬТИПОТЕНТНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН ПЛАЦЕНТИ У ЩУРІВ

Плацента є цінним джерелом мультипотентних стовбурових клітин (ПМСК), які широко починають використовуватися у клітинній терапії. Таким чином, пошук найбільш оптимального методу отримання таких клітин є відкритим. Метод посадки експлантів та ферментативної обробки дозволяють отримати ПМСК плодового походження, які зберігають здатність диференціюватися у мезенхімальних напрямках до 4 пасажу. Аллогена щуряча сироватка не підтримує становлення та ріст ПМСК, тому залишається широким використання фетальної бичачої сироватки, ксеногенної по відношенню до клітин.

Ключові слова: плацента, стовбурові клітини, клітинна терапія.

Вступ. На сьогодні клітинна терапія та регенеративна медицина все більше впроваджується в клінічне застосування та набуває розповсюдження, як іннова-

ційні персоналізовані біотехнологічні методи лікування [1-4]. Мезенхімальні стовбурові клітини займають (МСК) основне місце серед типів клітин, що проходять клінічні

© Світліна Г., Гарманчук Л., Шаблій В., 2015

випробування та вже застосовуються в медичній практиці. Потенційним джерелом стовбурових клітин можуть слугувати різні типи тканин людини (кістковий мозок, жирова тканина, ендометрій тощо), але використання плаценти як джерела МСК має низку переваг [5-7]. Використання зрілої плаценти не має етичних проблем, не потребує інвазивних втручань, клітини виділені з нею мають ряд переваг, порівняно із МСК кісткового мозку та жирової тканини через те що плацента відіграє фундаментальну роль у підтриманні толерантності материнського організму до розвитку плода [8-11]. Потрібно відмітити, що плацента може слугувати джерелом не тільки мезенхімальних стовбурових клітин, але також епітеліальних та ендотеліальних. На разі, лікування із застосуванням трансплантації плацентарних МСК проходить перші фази клінічних випробувань [12].

Для вивчення процесів формування і функціонування плаценти у людини використовують модель плаценталії у щурів. У обох видів встановлено подібність процесів і залучених механізмів у процесах інвазії, ремоделюванні спіральних артерій, імунологічних змін тощо [13-15].

На сьогодні відомо декілька методів виділення мультипотентних стовбурових клітин з плаценти щурів (ПМСК) 21-го дня гестації [16], але не оцінювався найбільш оптимальний склад поживного середовища, тип покриття, на якому найкраще підтримується ріст та зберігаються мультипотентні властивості клітин. Таким чином, головною метою було підібрати найбільш оптимальні умови виділення і культивування ПМСК.

Матеріали та методи. *Методи отримання ПМСК зі зрілої плаценти щурів.* Самок щурів ($n=3$) на 21-му дні вагітності поміщали у камеру з CO_2 на 2 хв, декапітували та вирізали плаценти фетусів чоловічої статі з дотриманням правил асептики та антисептики. Плаценти промивали в розчині Хенксу з додаванням 50 мкг/мл стрептомицину, 100 од/мл бензилпенициліну. Амніотичні та децидуальні оболонки видаляли і в подальшому працювали з ворсинчастою тканиною лабіринто- і спонгіотрофобласта. Тестовані методи посадки ПМСК: 1. Метод експлантів. Тканину подрібнювали стерильними ножицями у повному середовищі на фрагменти розміром 1-2 мм³; 2. Ферментативний. Тканину інкубували в розчині 0,1% колагенази та 0,6 од/мл диспази І при 37 °С протягом 30 хв. Отриману суспензію клітин відмивали від ферментів шляхом центрифугування при 300 g 10 хв та перерозчиняли у поживному середовищі. Клітини висівали на адгезивний пластик із розрахунку 200 тис на см². Для визначення найбільш оптимального складу поживного середовища були використані наступні: 1. Альфа-MEM, 10% фетальної бичачої сироватки (ФБС), 1X RPMI розчин амінокислот, 50 мкг/мл стрептомицину, 100 од/мл бензилпенициліну; 2. DMEM, 10% ФБС, 1X RPMI розчин амінокислот, 50 мкг/мл стрептомицину, 100 од/мл бензилпенициліну; 3. Альфа-MEM, 10% алогогенної щурячої сироватки (АЩС), 1X RPMI розчин амінокислот, 50 мкг/мл стрептомицину, 100 од/мл бензилпенициліну; 4. DMEM, 10% АЩС, 1X RPMI розчин амінокислот, 50 мкг/мл стрептомицину, 100 од/мл бензилпенициліну. Фрагменти тканини отримані методом експлантів висаджували на адгезивний пластик для культур клітин та на пластик, покритий колагеном.

При посадці методом експлантів першу зміну середовища проводили на 7-ий день культивування, після ферментативного способу виділення – на 2-ий день, пода-

льші зміни здійснювали двічі на тиждень. Після досягнення культурою 80-90% моношару, клітини пересівали. Для цього культуру промивали у фосфатному сольовому буфері від залишків сироватки, інкубували у розчині 0,05% трипсину, після цього відмивали від залишків трипсину шляхом центрифугування та висівали 5 тис на см².

Отримання АЩС. Здорових щурів 1-1,5 року поміщали у камеру з CO_2 на 2 хв, декапітували та набирали кров з стегнової вени. Цільну кров витримували 30 хв при кімнатній температурі, після чого центрифугували протягом 20 хв при 1000 g та відбирали супернатант. Отриману сироватку інактивували впродовж 30 хв при 56 °С.

Остеогенне та адипогенне диференціювання. Для визначення здатності клітин диференціюватися в остеогенному напрямку культуру клітин на 4-му пасажі культивували в середовищі DMEM з 10⁻⁷ М дексаметазону, 10 мМ β-гліцерофосфату і 0,1 мМ аскорбат-2-фосфату протягом 21 доби. Мінералізований матрикс виявляли фарбуванням 1 % розчином алізаринового червоного. Для адипогенного диференціювання клітини культивували в DMEM з додаванням 10% ФБС, 1 мкМ дексаметазону, 0,5 мМ ізобутил-метилксантину, 0,06 мМ індометацину і 5 мкг/мл інсуліну протягом 21 доби. Жирові включення виявляли фарбуванням жиронепрозонним О. Як контроль були використані клітини, культивовані протягом того ж терміну в живильному середовищі без факторів диференціювання.

Флуоресцентна in situ гібридизація (FISH). Для проведення FISH аналізу брали ПМСК 4-го пасажу, отримані методом посадки експлантів ($n=3$) та ферментативним методом ($n=3$) з плаценти фетусів чоловічої статі. Приготування препаратів для гібридизації проводили за стандартною методикою. Для гібридизації використовували зонди Chromosome Y-green and Chromosome X-orange X-Cyting Rat Chromosome Painting. Ядра фарбували розчином DAPI (Abbot Molecular, USA). Для аналізу підраховували не менше 300 ядер. Візуалізацію проводили на флуоресцентному інвертованому мікроскопі Axio Imager M1.

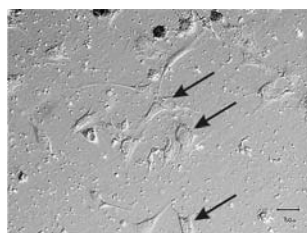
Результати та їх обговорення.

Після посадки експлантів плаценти, тканина прикріплювалася впродовж першого тижня, а після сьомого дня культивування можна було спостерігати вихід клітин та утворення колоній навколо прикріплених фрагментів. Ми очікували, що використання колагенового покриття буде сприяти швидшому прикріпленню та росту культури, але за нашими даними ріст культури на пластику відбувався швидше, ніж на колагеновому покритті. Цікавим є факт, що використання алогогенної щурячої сироватки пригнічувало вихід, прикріплення та ріст клітин з посадженого експланту, тому вже після першого пересіву (на 1-му пасажі) клітини не ділилися та не прикріплювалися при наступному пересіві. Ми вважаємо, що АЩС стимулює вихід та ріст клітин відмінних від мезенхімальних стовбурових клітин, бо у клітин відсутня веретеноподібна форма, клітини містять багато включень у цитоплазмі. При використанні ферментативного способу виділення ПМСК, моношар клітин утворювався порівняно швидко. Схожа ситуація спостерігається щодо впливу АЩС, клітини затримувалися в рості і не переживали двох пересівів. Використання середовища альфа-MEM як базового є переважним, бо клітини в подальшому пересівалися більшу кількість разів.

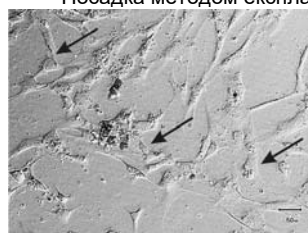
Таблиця 1. Характеристики культур ПМСК, виділених різними методами

метод виділення культур	склад середовища	поверхня, на яку висаджували клітини	день досягнення 80-90% моношару на 0-му пасажі	пасажи, на якому відбувалося старіння культури
посадка експлантів	1 (альфа-МЕМ, ФБС)	колаген	15-17	3-4
	1 (альфа-МЕМ, ФБС)	пластик	7-17	4-7
	3 (альфа-МЕМ, АЩС)	колаген	15-23	1-4
	3 (альфа-МЕМ, АЩС)	пластик	17-21	1-3
ферментативний	1 (альфа-МЕМ, ФБС)	пластик	5-6	5
	2 (ДМЕМ, ФБС)	пластик	6	3
	3 (альфа-МЕМ, АЩС)	пластик	14-30	1 або не вдалося отримати культуру
	4 (ДМЕМ, АЩС)	пластик	10	1

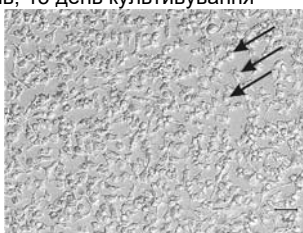
Посадка методом експлантів, 15 день культивування



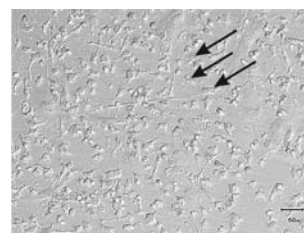
альфа-МЕМ, ФБС, колаген



альфа-МЕМ, ФБС, пластик

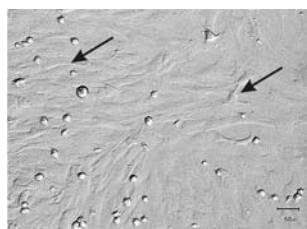


альфа-МЕМ, АЩС, колаген

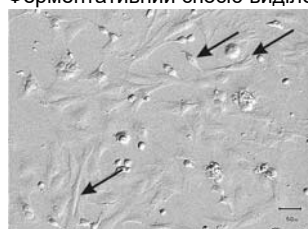


альфа-МЕМ, АЩС, пластик

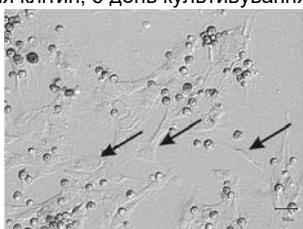
Ферментативний спосіб виділення клітин, 6 день культивування



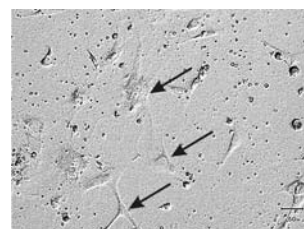
альфа-МЕМ, ФБС, пластик



ДМЕМ, ФБС, пластик



альфа-МЕМ, АЩС, пластик



ДМЕМ, АЩС, пластик

Рис.1. Репрезентативні фотографії культур ПМСК при використанні різних методів виділення на 0-му пасажі; стрілками показано клітини типової морфології; довжина шкали = 50 мкм.

При старінні ПМСК кількість клітин посаджених клітин дорівнювала кількості знятих клітин, після чого клітини вже не прикріплювалися до культуральної поверх-

ні. При цьому спостерігалось збільшення клітин у розмірах, збільшення частки синтетично активних клітин з 3-7 ядерцями та включеннями у цитоплазмі (рис.2).

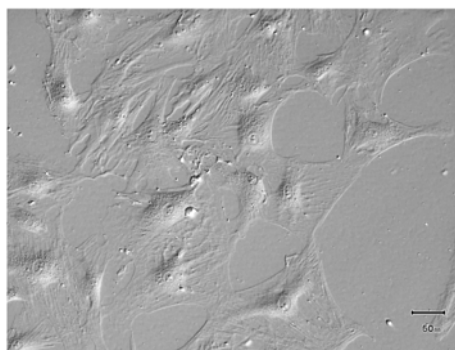


Рис.2. Репрезентативна морфологія старіючої ПМСК; фазово-контрасна мікроскопія; довжина шкали = 50 мкм.

Таким чином, найбільш оптимальним за складом середовищем для росту ПМСК був альфа-МЕМ з додаванням 10% ФБС, 1X RPMI розчин амінокислот, 50 мкг/мл стрептомицину, 100 од/мл бензилпенициллину. Використання додаткового покриття колагеном, для пришвидшення прикріплення експлантів тканини не було доцільним. Для підтвердження мультипотентності

ПМСК, отриманих ферментативним методом чи методом експлантів було поставлене направлене диференціювання у адипогенному і остеогенному напрямках. В результаті, ПМСК, виділені обома методами зберігали здатність сильно диференціюватися у мезенхімальних напрямках на 4 пасажі (рис.3).

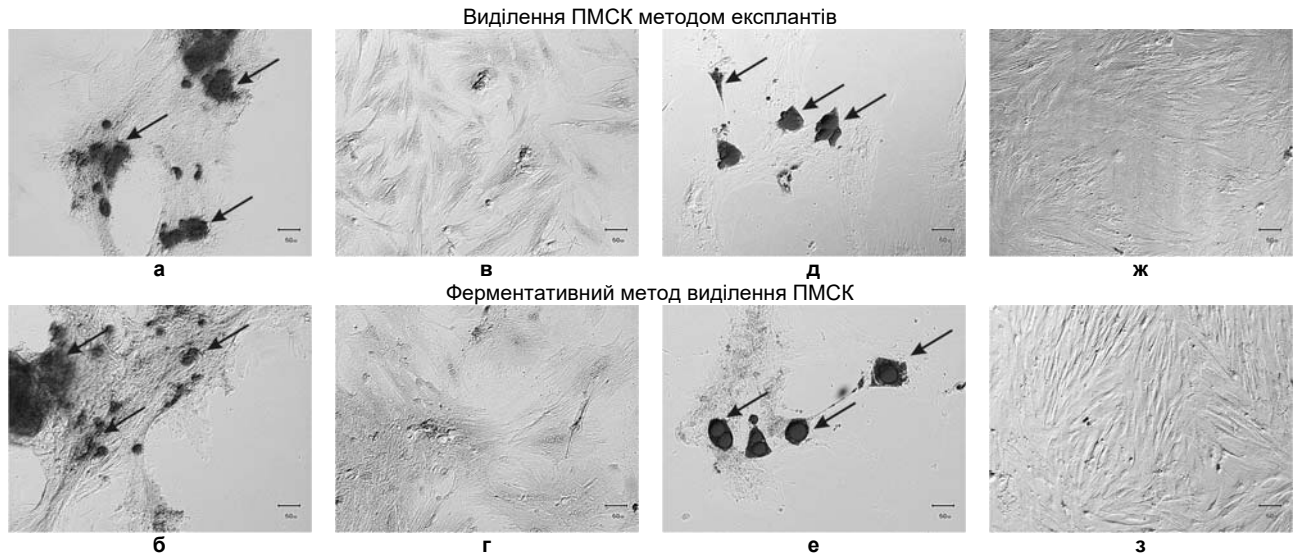


Рис.3. Направлене диференціювання ПМСК у мезенхімальних напрямках: а, б – остеогенне диференціювання, накопичені кальцієві депозити забарвлені червоним (вказані стрілками), забарвлення алізариним червоним; в, г – контроль до остеогенного диференціювання, не спостерігається відкладання кальцію клітинами, забарвлення алізариним червоним; д, е – адипогенне диференціювання, спостерігається вміст жирових вакуоль у клітинах (вказано стрілками), забарвлення жиривим червоним О; ж, з – контроль до остеогенного диференціювання, відсутні жирові включення, забарвлення жиривим червоним О; довжина шкали = 50 мкм.

Відомо, що плацента містить частину клітин плодового, а частину материнського походження. Виділення клітин плодового походження є більш необхідним для використання у клітинній терапії, по-перше, можливе подальше збереження (кріоконсервування) для аутологічного застосування, клітини характеризуються біль-

шими потенціями до диференціювання та приживлення в організмі реципієнта. За результатами FISH аналізу, культури ПМСК, отримані і методом експлантів і ферментативним методом, вирощені на середовищі складом 1, мали фетальний чоловічий каріотип (рис.4)



Рис. 4. FISH аналіз ПМСК, флуоресцентна мікроскопія; одинарною стрілкою показано сигнал Y хромосоми, подвійною стрілкою показано сигнал X хромосоми; ×1000

Висновки. Плацента є важливим джерелом стовбурових клітин плодового походження, які можна виділити і методом експлантів і ферментативним методом. Зважаючи на вищезазначений факт, виділення ПМСК методом експлантів є менш трудомістким та менш затратним. Найкраще підтримує ріст та мультипотентні властивості середовище альфа-МЕМ з 10% ФБС. Використання аллогенної сироватки не підтримує ріст ПМСК.

Список використаних джерел

1. Titomanlio L. Stem cell therapy for neonatal brain injury: perspectives and challenges. / Titomanlio L, Kavelaars A, Dalous J, Mani S, El Ghouzzi V, Heijnen C, Baud O, Gressens P. // *Annual Neurology*. 2011;70:698–712.
2. Li Z. Transplantation of placenta-derived mesenchymal stem cell-induced neural stem cells to treat spinal cord injury. / Li Z, Zhao W, Liu W, Zhou Y, Jia J, Yang L. // *Neurology Regen Research*. 2014;9(24):2197–204. doi: 10.4103/1673-5374.147953.
3. Ventura C. Hyaluronan mixed esters of butyric and retinoic Acid drive cardiac and endothelial fate in term placenta human mesenchymal stem cells and enhance cardiac repair in infarcted rat hearts. / Ventura C, Cantoni S, Bianchi F, Lionetti V, Cavallini C, Scarlata I, Foroni L, Maioli M, Bonsi L, Alviano F, et al. // *Journal Biology Chemistry*. 2007;282:14243–14252.

4. Chamberlain G. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. / Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton. // *Journal Stem Cells*. 2007;25:2739–2749.
5. Wulf GG. Mesengenic progenitor cells derived from human placenta. / Wulf GG, Viereck V, Hemmerlein B, Haase D, Vehmeyer K, Pukrop T, Glass B, Emons G, Trümper L. // *Tissue Engineering*. 2004;10:1136–1147.
6. Wolbank S. Alternative sources of adult stem cells: human amniotic membrane. Wolbank S, van Griensven M, Grillari-Voglauer R, Peterbauer-Scherb A. // *Advances Biochemistry Engineering Biotechnology*. 2010;123:1–27.
7. Rus Ciucă D. Isolation and characterization of chorionic mesenchymal stem cells from the placenta. / Rus Ciucă D, Sorîțau O, Sușman S, Pop VI, Miha CM. // *Romanian Journal Morphology and Embryology*. 2011;52:803–808.
8. Karlsson H. Stromal cells from term fetal membrane are highly suppressive in allogeneic settings in vitro. / Karlsson H, Erkers T, Nava S, Ruhm S, Westgren M, Ringdén O. // *Clinical Experimental Immunology*. 2012;167:543–555.
9. Miao Z. Isolation of mesenchymal stem cells from human placenta: comparison with human bone marrow mesenchymal stem cells. / Miao Z, Jin J, Chen L, Zhu J, Huang W, Zhao J, Qian H, Zhang X. // *Cell Biology International*. 2006;30:681–687.
10. Apps R. Human leucocyte antigen (HLA) expression of primary trophoblast cells and placental cell lines, determined using single antigen beads to characterize allotype specificities of anti-HLA antibodies. / Apps R,

Murphy SP, Fernando R, Gardner L, Ahad T, Moffett A// Immunology. 2009;127:26–39.

11. Erlebacher A. Immunology of the maternal-fetal interface. / Erlebacher A. // Annual Review Immunology. 2013;31:387–411. doi: 10.1146/annurev-immunol-032712-100003.

12. Parolini O. Review: Preclinical studies on placenta-derived cells and amniotic membrane: an update. / Parolini O, Caruso M. // Placenta. 2011;32 Suppl 2:S186–S195.

13. Soares MJ. Rat placentation: an experimental model for investigating the hemochorial maternal-fetal interface. / Soares MJ, Chakraborty D, Karim Rumi MA, Konno T, Renaud SJ// Placenta. 2012;33(4):233–43. doi: 10.1016/j.placenta.2011.11.026

14. Konno T. Pregnancy in the brown Norway rat: a model for investigating the genetics of placentation. / Konno T, Rempel LA, Arroyo JA, Soares MJ. // Biology Reproduction. 2007;76(4):709–18.

15. Carter AM. Animal models of human placentation—a review. / Carter AM. // Placenta. 2007;28 Suppl A:S41–7.

16. Ding HF. Therapeutic effect of placenta-derived mesenchymal stem cells on hypoxic-ischemic brain damage in rats. / Ding HF, Zhang H, Ding HF, Li D, Yi XH, Gao XY, Mou WW, Ju XL. // World Journal Pediatric. 2015;11(1):74–82. doi: 10.1007/s12519-014-0531-8.

Надійшла до редколегії 22.12.15

Г. Свитина, асп., Л. Гарманчук, д-р біол. наук

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна,

В. Шаблій, канд. біол. наук

Інститут клітинної терапії, Київ, Україна

МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ СТЕВЛОВЫХ КЛЕТОК ПЛАЦЕНТЫ У КРЫС

Плацента является ценным источником мультипотентных стволовых клеток (ПМСК), которые широко используются в клеточной терапии. Таким образом, поиск наиболее оптимального метода получения таких клеток остается открытым. Метод посадки эксплантов и ферментативной обработки позволяют получить ПМСК плодового происхождения, которые сохраняют способность дифференцироваться в мезенхимальных направлениях до 4 пассажа. Аллогенная крысиная сыворотка не поддерживает становление и рост ПМСК, поэтому использование фетальной телячьей сыворотки, ксеногенной по отношению к клеткам, остается широким.

Ключевые слова: плацента, стволовые клетки, клеточная терапия.

G. Svitina, PhD stud., L. Garmanchuk, DSc.

Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine,

V. Shablii, PhD

Institute of cell therapy, Kyiv, Ukraine

METHODS OF OBTAINING MULTIPOTENT STEM CELLS OF THE PLACENTA IN RATS

Placenta is a valuable source of multipotent stem cells (PMSC) widely used for cell therapy. Hence, the most optimal method of PMSC obtaining remains questionable. By methods of explant culturing and enzymatic digestion were obtained PMSC of fetal origin and multipotent features at 4th passage. Allogeneic rat serum is not favor PMSC establishment and growth, consequently the use is made of fetal bovine serum, that is xenogeneic for cell cultures.

Key words: Placenta, stem cells, cell therapy.

УДК 582.28.614.876

А. Турай, пошукач, Т. Турай, д-р біол. наук

Інститут мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ,

Д. Лукашов, д-р біол. наук

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

ВПЛИВ ХРОНІЧНОГО ОПРОМІНЕННЯ НА ФІЗІОЛОГО-БІОХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ТРЬОХ ОПРОМІНЕНИХ "ПОКОЛІНЬ" *ASPERGILLUS VERSICOLOR*

Охарактеризовано вплив хронічного опромінення на три "покоління" *Aspergillus versicolor*, які були отримані в модельних умовах з двох батьківських штабів: *A.versicolor* 99 з радіоадаптивними властивостями, що був ізольований з приміщень об'єкту "Укриття" Чорнобильської АЕС, та *A.versicolor* 432 – контрольного. При культивуванні на двох середовищах з різним вмістом джерела вуглецю у досліджених "поколіннях" *A. versicolor* 99 та *A. versicolor* 432 виявлено різноспрямовані зміни швидкості радіального росту (від сповільнення до пришвидшення), які за величиною знаходилися у межах від 60% до 140% (на суцільно-агарі) та від 70% до 230% (на голотомно агарі) по відношенню до відповідних неопромінених "покоління". Виявлені зміни у профілі активності антиоксидантних ферментів супероксиддисмутази, каталази, пероксидази, що мають хвилеподібний характер у трьох досліджених "поколіннях" *A.versicolor* 432 і *A.versicolor* 99 (за виключенням каталази) та високу амплітуду коливань від зменшення (до 70%) до збільшення (до 900%).

Ключові слова: іонізуюче опромінення, "покоління" *Aspergillus versicolor*, ферменти антиоксидантного захисту.

Вступ. За майже 30 років, які минули після аварії на Чорнобильській АЕС, було встановлено низку радіобіологічних явищ, котрі у своїй сукупності визначають формування віддалених наслідків опромінення на різних рівнях організації біотичних систем [1–4]. Радіонукліди в екосистемі перебувають у постійній міграції, внаслідок чого всі представники біоти, включаючи мікроорганізми, гриби, рослини і тварини, а також людина зазнають додаткового опромінення. Особливий науковий інтерес має дослідження наслідків впливу хронічного опромінення в популяціях мікроміцетів, виділених з приміщень об'єкту "Укриття" ЧАЕС з різним рівнем радіоактивного забруднення, у яких сформувались нові, раніше невідомі радіоадаптивні властивості (позитивний радіотропізм, радіостимуляція, адаптивна відповідь) за дії великих доз опромінення [5, 6, 7]. Найбільш поширеним видом мікроміцетів у приміщеннях об'єкту "Укриття" є *Aspergillus versicolor*, у штабів якого було виявлено ра-

діоадаптивні властивості. *A.versicolor* є звичайним еврибіонтним видом у наземних та водних екосистемах, часто трапляється у вологих закритих приміщеннях, може викликати руйнування конструкційних матеріалів та призводити до захворювань людини [8]. Розуміння механізмів адаптації *A. versicolor* до критичних умов середовища є важливим для оцінки та прогнозу його шкодочинності. Особливої уваги заслуговує дослідження характеру змін фізіолого-біохімічних властивостей у "поколіннях" опромінених мікроміцетів, ступеню їх прояву та стабільності, що дасть інформацію для прогнозів щодо віддалених наслідків дії хронічного опромінення на мікобіоту.

Метою роботи було вивчення біологічної активності у ряду опромінених в модельних умовах генерацій *A.versicolor* на рівні організму – за швидкістю радіального росту та на молекулярному – за активністю ключових ферментів антиоксидантного захисту (каталази, пероксидази, супероксиддисмутази).

Матеріали та методи. Об'єктами дослідження були два штами *A. versicolor* з колекції культур мікроміцетів відділу фізіології та систематики мікроміцетів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України: *A. versicolor* 432 – контрольний, що був виділений з Варязьких печер (Києво-Печерська Лавра, м.Київ) за фонового рівня радіоактивного випромінювання 12 мкР/год ($8,6 \cdot 10^{-13}$ Кл/кг*с) та *A. versicolor* 99 – опромінений, що був виділений з приміщення 4-го блоку ЧАЕС у 2003 році з потужністю експозиційної дози 70 Р/год ($50,2 \cdot 10^{-7}$ Кл/кг*с) та проявляв радіоадаптивні властивості [5-7].

Для проведення довгострокових досліджень у контрольованих умовах була використана раніше створена модельна установка, що імітує хронічне опромінення низької інтенсивності. Джерелом іонізуючого випромінювання слугував ґрунт з 5-кілометрової зони відчуження, що містив $^{137}\text{Cs} - 3,06 \cdot 10^6$ Бк/м², що відповідало енергії $E_\gamma = 0,662$ МэВ. Потужність експозиційної дози на висоті 10 см від поверхні площадки становила 3 мР/год. Фоновий рівень контрольних умов експерименту становив 12 мкР/год ($8,6 \cdot 10^{-13}$ Кл/кг) [9].

Мікроскопічні гриби, для яких характерна швидка зміна "покоління", є зручною моделлю для вивчення механізмів адаптації до дії хронічного опромінення у великій кількості "поколінь". Проте, на сьогоднішній день відсутнє однозначне трактування самого терміну "покоління" для анаморфних мікроміцетів, оскільки для них є характерним вегетативний тип розмноження. Запропоновано кілька назв "індивідуумів" у анаморфних грибів, що розмножуються безстатевим (вегетативним) шляхом, а саме: рамета та клон [10]. У представленому дослідженні, авторами запропоновано методичний підхід, який полягає в проведенні досліджень в порівняльному аспекті, для нівелювання можливих змін в метаболізмі досліджуваних штамів за дії інших, ніж хронічне опромінення, абіотичних факторів. Отримання опромінених та неопромінених "поколінь" від двох батьківських штамів *A. versicolor* 99 та *A. versicolor* 432 проводили синхронно за дії хронічного опромінення в контрольованих модельних умовах та за його відсутності. В останніх надалі величину усіх досліджуваних кількісних параметрів приймали за 100% при порівнянні з такими у "покоління", отриманих в умовах хронічного опромінен-

ня. Тривалість отримання кожного покоління складала 30 днів, що відповідало стаціонарній фазі росту досліджуваних грибів. Саме в такій фазі росту були отримані покоління мікроміцету *Fusarium solani* у роботі Д.М.Гродзинського з співавторами по вивченню впливу хронічного опромінення на мікроскопічні гриби [11].

Для дослідження швидкості радіального росту кожний штам вирощували на двох агаризованих поживних середовищах різного складу: оптимальному – сусло-агарі (СА), та голодному агарі (ГА) – середовищі, що найбільш наближене до реальних умов існування мікроміцетів, з яких вони були виділені [12]. Тривалість дослідів з визначення радіальної швидкості росту складала 25-28 днів.

При дослідженні особливостей функціонування антиоксидантної системи, культивування усіх отриманих "поколінь" проводили при $25 \pm 2^\circ\text{C}$ на модифікованому рідкому середовищі Чапека, яке містило 20 г/л глюкози. Засів проводили суспензією конідій у поживному середовищі, яку готували з розрахунку 1×10^6 конідій/мл (підррахунок конідій проводили за допомогою камери Горяєва). Суспензію конідій вносили в кількості 10% до об'єму поживного середовища (10 мл суспензії на 100 мл середовища). Біомасу мікроміцетів відділяли фільтруванням крізь капроновий фільтр з подальшим багаторазовим промиванням від залишків культуральної рідини дистильованою водою. Клітини руйнували розтиранням у рідкому азоті та суспендували в 0,15 М калій-фосфатному буфері (рН 7,0). Від залишків клітин звільнялись шляхом центрифугування за допомогою центрифуги ОПН-8 при 8000 об/хв. Пероксидазну, каталазну та супероксиддисмутазну активність (СОД) визначали у супернатанті згідно стандартних методів та розраховували на мг білку [13-15]. Визначення концентрації білку проводили за методом Bradford [16]. Усі вимірювання проводили у трикратній повторюваності.

Статистичну обробку результатів здійснювали з використанням програми Statistica 6.0. Статистичну значимість відмінностей середніх величин встановлювали за допомогою *t*-критерію Стьюдента ($p \leq 0,05$).

Результати та обговорення. При порівнянні швидкості радіального росту (K_r) міцелію трьох опромінених "поколінь" штамів *A. versicolor* 432 та *A. versicolor* 99 на СА та ГА було виявлено суттєві відмінності (Рис. 1).

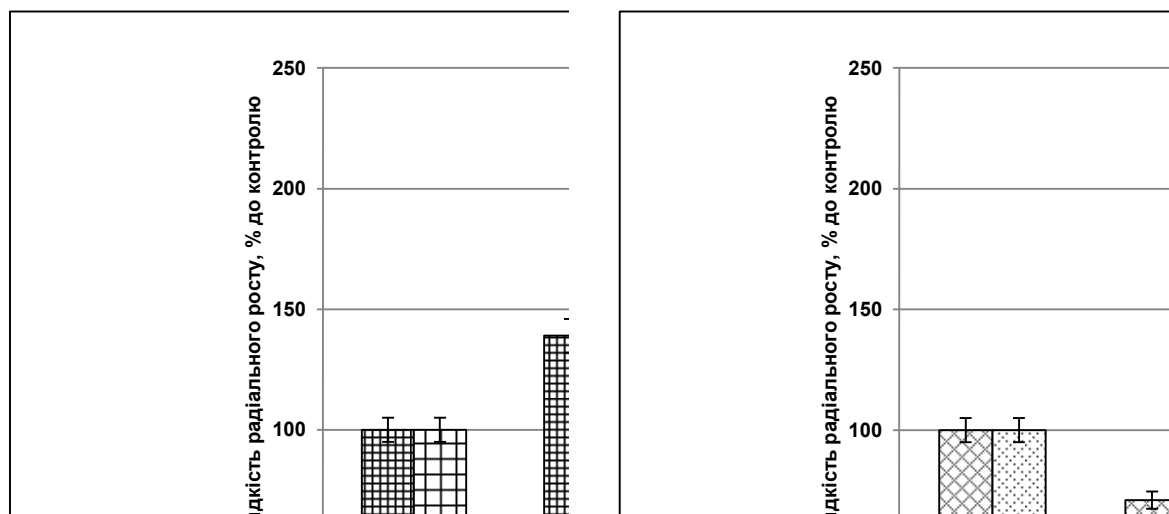


Рис. 1. Швидкість радіального росту трьох "поколінь" (I-III) штамів *A. versicolor* 432 (1) та *A. versicolor* 99 (2) на сусло агарі (а) та голодному агарі (б) в умовах опромінення

При рості на СА ми спостерігали майже однаковий характер змін K_r в "поколіннях" у контрольного

A. versicolor 432 та штаму з радіоадаптивними властивостями *A. versicolor* 99. У *A. versicolor* 432 спостерігається

збільшення K_r у першому "поколінні" та його зниження у другому та третьому "поколінні", а у *A. versicolor* 99 – майже однакова K_r (в порівнянні з відповідними неопроміненими "поколіннями") у першому "поколінні" та зниження у другому та третьому "поколіннях", тобто виявлені аналогічні зміни у другому та третьому опромінених "поколіннях" контрольного штаму *A. versicolor* 432 та штаму *A. versicolor* 99 з радіоадаптивними властивостями.

При рості на ГА ми спостерігали різноспрямовані зміни швидкості росту досліджуваних штамів. У *A. versicolor* 432 було виявлено зниження швидкості росту у порівнянні з контролем у першому та другому "поколінні", та збільшення у 2,3 рази у третьому "поколінні". Для *A. versicolor* 99 було характерне незначне збільшення (до 130%) швидкості радіального росту у першому "поколінні", невелике зниження (до 90%) у другому та підвищення до рівня неопроміненого контролю у третьому "поколінні". У "поколінні" штаму з радіоадаптивними властивостями зміни радіальної швидкості росту менш виражені порівняно з "поколіннями" *A. versicolor* 432.

Таким чином, виявлена суттєва різниця у величині змін у K_r у досліджених "поколінні" *A. versicolor* 99 та *A. versicolor* 432 при культивуванні на СА та ГА. Так, у досліджених "поколінні" штаму *A. versicolor* 99 з радіоадаптивними властивостями зміни у K_r не перевищували 40% як при рості на СА так і на ГА. В той час, як у досліджених "поколінні" штаму *A. versicolor* 432 зміни K_r більш виражені і суттєво відрізнялись в залежності від середовища культивування, а саме: при рості на СА різниця між K_r при різноспрямованих змінах складала 70%, а при рості на ГА – 160%. Отримані дані можуть свідчити на користь того, що у батьківського штаму *A. versicolor* 99 з радіоадаптивними властивостями, виділеного з радіоактивно забруднених територій через 17 років після аварії, сформувались певні адаптаційні властивості до хронічного опромінення, які унаслідуються, що проявляється у відсутності суттєвих змін K_r у досліджених опромінених "поколінні" цього штаму. Штам *A. versicolor* 432, був виділений з територій з фоновим рівнем радіоактивності, а досліджені його "покоління" вперше зазнали опромінення і не були попередньо адаптовані до нього, що, на нашу думку, призвело до більш значних змін K_r , слід зазначити, що їхній напрямок різнився у поколіннях.

Як нами встановлено раніше, у 60% – 80% виділених через 10 – 20 років після Чорнобильської катастрофи штамів мікроміцетів, в тому числі і у популяції *A. versicolor*, за дії опромінення, виявлено пришвидшення росту за дії великих доз опромінення, здатність направлено рости до джерела випромінювання, тобто відбулося формування популяцій з великою стійкістю до хронічного опромінення [6, 17, 18].

На сьогоднішній день питання про наслідкування цих властивостей у поколіннях мікроміцетів, зокрема, *A. versicolor*, є відкритим і потребує детального вивчення.

У результаті дії іонізуючого випромінювання в клітині відбувається зростання кількості активних форм кисню (АФК). З метою захисту від надлишку АФК в клітині активуються специфічні компоненти системи антиоксидантного захисту, зокрема – ферментативний комплекс ключових компонентів у складі: СОД, каталаза та пероксидаза. Було виявлено, що СОД-активність в умовах опромінення у першого "покоління" зростала у 2,0 та 2,7 рази у *A. versicolor* 99 і *A. versicolor* 432, відповідно, а

у другому "поколінні" обох штамів зростала у 3,3-3,5 рази. При цьому у третьому "поколінні" активність даного ферменту різко знижувалася (у 2 рази). У доступній нам літературі відсутні дані щодо змін СОД-активності у "поколіннях" мікроміцетів, проте є відомості щодо різного рівня СОД-активності в онтогенезі грибів. Так, було встановлено, що у *Neurospora crassa*, у *Fusarium decemcellulare* та *F. equiseti* загальна активність СОД зростала при переході до стаціонарної фази росту [19-20]. На відміну від них, у патогенних видів *A. flavus*, *A. niger* та сапрофітів *A. nidulans*, *A. terreus* внутрішньоклітинна СОД-активність була найвищою на початку експоненційної фази росту грибів [21].

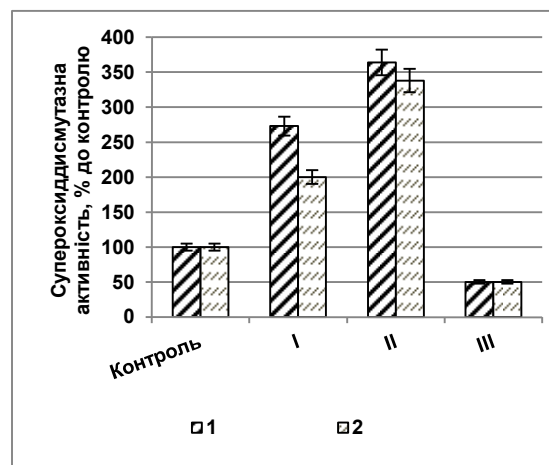


Рис. 2. Ферментативна активність трьох "поколін" (I-III) штамів *A. versicolor* 432 (1) та *A. versicolor* 99 (2) в умовах опромінення

За дії радіоактивного опромінення було виявлено різноспрямовані зміни каталазної активності у "поколіннях" контрольного штаму та штаму з радіоадаптивними властивостями (рис. 3а). У контрольного штаму виявили зниження ферментативної активності у першому та третьому "поколіннях" та підвищення у другому. На противагу цьому, у першому "поколінні" штаму з радіоадаптивними властивостями були відсутні зміни у каталазній активності в порівнянні з контролем та виявлено збільшення ферментативної активності у 4-5 разів у другому та третьому "поколіннях". Слід зазначити, що каталазна активність у досліджених штамів *A. versicolor* у кілька разів вище ніж у *Neurospora crassa* та близька за величиною у *Blakeslea trispora* [22]. Висока каталазна активність є фізіологічною особливістю *A. versicolor*, та, ймовірно, може відігравати певну роль у реалізації його адаптації до хронічного опромінення.

У досліджених "поколінні" *A. versicolor* 432 та *A. versicolor* 99 спостерігали однотипові зміни у пероксидазній активності – суттєве (на 50%) зменшення у першому та третьому "поколіннях" та значне збільшення у другому "поколінні" (до 240% та 900%, відповідно) (рис. 3б). Слід зазначити, що найбільш відрізняється характер змін каталазної та пероксидазної активності у "поколіннях" штаму з радіоадаптивними властивостями.

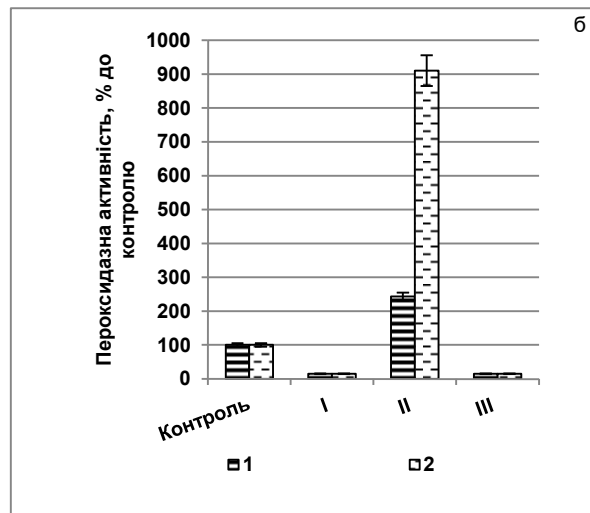
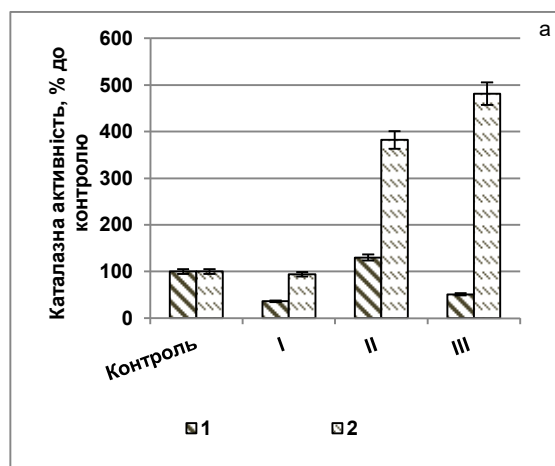


Рис. 3. Ферментативна активність (а), (б) трьох "поколінь" (I-III) штамів *A.versicolor* 432 (1) та трьох "поколінь" штаму *A.versicolor* 99 (2) в умовах опромінення

Таким чином, встановлено, що зміни у профілі антиоксидантних ферментів у досліджених "поколінь" *A. versicolor* 432 та *A. versicolor* 99 мають не однонаправлений, а хвилюподібний характер (за виключенням каталазної активності), з максимумом підвищення ферментативних активностей у другому "поколінні". Слід зазначити, що каталазна активність значно вища в 3 та 9 разів у другому та третьому "поколінні" *A. versicolor* 99 з радіоадаптивними властивостями ніж у відповідних "поколінні" *A. versicolor* 432, а пероксидазна активність вище в 4 рази лише у другому "поколінні".

Підсумовуючи отримані дані, можна констатувати, що сумарна величина змін каталазної та пероксидазної активностей у "поколінні" штаму з радіоадаптивними властивостями значно вища, ніж у "поколінні" контрольного штаму. Раніше нами були описані хвилюподібні зміни активності антиоксидантних ферментів, які були характерні для "покоління" *Hormoconis resinae*, що домінував у приміщенні об'єкту "Укриття" з різним рівнем у радіоактивного забруднення та проявляв радіоадаптивні властивості [23]. При комплексному дослідженні впливу хронічного опромінення на ферментативну складову антиоксидантної системи у мікроміцетів, що часто зустрічались у різних екотопах зони відчуження та проявляли радіоадаптивні властивості, зокрема, видів *H. resinae*, *A. versicolor*, *Cladosporium cladosporioides*, *Paecilomyces lilacinus* показано суттєві зміни в активності ферментів на онтогенетичному рівні [18,24].

Висновки. Показано, що незалежно від середовища культивування, у досліджених "поколінні" штаму *A. versicolor* 99 з радіоадаптивними властивостями зміни у K_f не перевищували 40%. На противагу цьому, у досліджених "поколінні" штаму *A. versicolor* 432 спостерігали різноспрямовані зміни у K_f , величина яких залежала від типу середовища та становила при рості на СА 70%, а при рості на ГА – 160%, тобто зміни у K_f більш виражені у "поколінні" контрольного штаму.

Встановлено, що профіль змін активності антиоксидантних ферментів супероксиддисмутази, каталази, пероксидази має хвилюподібний характер та високу амплітуду коливань у трьох досліджених "поколінні" *A.versicolor* 432 і *A.versicolor* 99 (за виключенням каталази). Проте збільшення каталазної активності у другого та третього "покоління" та пероксидазної активності у другого "покоління" *A. versicolor* 99 з радіоадаптивними властивостями було у 3 і 9 рази та 4 рази вище за таке у відповідних "поколінні" *A.versicolor* 432, тобто зміни в

активності антиоксидантних ферментів більш виражені у "поколінні" штаму з радіоадаптивними властивостями.

Список використаних джерел

- Гудков І.М. Стан фітоценозів в зоні радіаційного впливу аварії на Чорнобильській АЕС / І.М. Гудков // Радіобіологічні і радіоекологічні аспекти Чорнобильської катастрофи: міжнародна конфер., 11–14 квіт. 2011 р.: тези доп. – Славутич, 2011. – С. 73.
- Дмитрієва С.А. Изучение адаптации природных популяций растений к хроническому облучению, вызванному аварией на Чернобыльской АЭС // Цитология и генетика. – 1996. – Т. 30, № 4. – С. 3–11.
- Журавская А.Н. Энзимологические механизмы адаптации растений к условиям повышенного естественного радиационного фона / А.Н. Журавская, Б.М. Кершенгольц, Т.Т. Курилюк, Т.М. Щербакова // Радиационная биология. Радиоэкол. – 1995. – Т. 35, Вып. 3. – С. 349–355.
- Котеров А.Н. Молекулярные и клеточные механизмы адаптивного ответа у эукариот / А.Н. Котеров, А.В. Никольский // Укр. биохим. журн. – 1999. – Т. 71, № 3. – С. 13–25.
- Жданова Н.Н. Грибное поражение помещений объекта "Укрытие" / Н.Н. Жданова, В.А. Захарченко, Т.И. Тугай [и др.] // Проблемы безопасности атомных электростанций и Чернобыля. – 2005. – Т. 3, № 1. – С. 78–86.
- Tugay T. The influence of ionizing radiation on spore germination and emergent hyphal growth response reactions of microfungi / T. Tugay, N.N. Zhdanova, V.A. Zheltonozhsky [et al.] // Mycologia. – 2006. – Vol. 98, № 4. – P. 521–527.
- Тугай Т.И. Проявление радиоадаптивных свойств у микроскопических грибов, длительное время находившихся на территориях с повышенным радиационным фоном после аварии на ЧАЭС / Т.И. Тугай, Н.Н. Жданова, В.А. Желтоножский [и др.] // Радиационная биология. Радиоэкол. – 2007. – Т. 47, № 5. – С. 543–549.
- Jussila J., Spores of *Aspergillus versicolor* isolated from indoor air of a moisture-damaged building provoke acute inflammation in mouse lungs / J. Jussila, H. Komulainen, V.M. Kosma [et al.] // Inhal Toxicol. 2002 Dec;14(12):1261–77.
- Тугай Т.И. Закономерности влияния низких доз опромінення на мікробіологічні гриби / Т.И. Тугай, А.В. Тугай, М.В. Желтоножська [та ін.] // Ядерна фізика та енергетика. – 2012. – Т.13, № 4. – С. 396–402.
- Leslie J.F. Female fertility and mating type effect on effective population size and evolution in filamentous fungi / J.F. Leslie, K.K. Klein // Genetics. – 1996. – Vol. 144. – P. 557–567.
- Тверской Л.А. Исследование биологического эффекта хронического действия радиации с низкой мощностью доз на фитопатогенные грибы / Л.А. Тверской, Д.М. Гродзинский, Л.В. Кейсевич // Радиационная биология. Радиоэкол. – 1997. – Т. 37, № 5. – С. 797–803.
- Кочкина Г.А. Радиальная скорость роста колоний грибов в связи с их экологией. / Г.А. Кочкина, Е.Г. Мирчинк, П.А. Кожевин [и др.] // Микробиология. – 1978. – Т. 47, № 5. – С. 964–965.
- Костюк В.А. Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутази, основанный на реакции окисления кверцетина / В.А. Костюк, А.И. Потапович, Ж.В. Ковалева // Вопр. мед. химии. – 1990. – Т. 36, № 2. – С. 88–91.
- Королюк М.А. Методы определения активности каталазы / М.А. Королюк, Л.И. Иванова, И.Г. Майорова [и др.] // Лабораторное дело. – 1988. – №1. – С. 16–19.
- Ермаков А.И. Методы биохимического исследования растений / А.И. Ермаков – М.: Агропромиздат, 1987. – 170 с.
- Bredford M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein – Dye Binding / M. M. Bredford // J. Analytical Biochemistry. – 1976. – Vol. 72. – P. 248–254.

17. Zhdanova N.N. Ionizing radiation attracts soil fungi / N.N. Zhdanova, T. Tugay, J. Dighton [et al.] // Mycol. Res. – 2004. – Vol. 108, № 9. – P. 1089–1096.

18. Тугай Т.І. Адаптація мікроміцетів до хронічного іонізуючого опромінення : Автореф. дис. на здобуття наук. ступеня д-ра біол. наук. – К., 2013 – 41с.

19. Гесслер Н.Н. Сравнительное исследование компонентов антиоксидантной защиты в процессе роста мицелия дикого типа *Neurospora crassa* и мутантов *white collar 1* и *white collar 2* / Н.Н. Гесслер, О.А. Леонovich, Я.М. Рабинович [и др.] // Прикл. биохим. Микробиол. – 2006. – Т. 42, № 3. – С. 354–358.

20. Меденцев А.Г. Адаптация фитопатогенного гриба *Fusarium decemcellulare* к окислительному стрессу / А.Г. Меденцев, А.Ю. Аринбасарова, В.К. Акименко [и др.] // Микробиология. – 2001. – Т. 70, № 1. – С. 34–38.

21. Holdom M.D. The Cu,Zn superoxide dismutases of *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus terreus*: purification and biochemical comparison with the *Aspergillus fumigatus* Cu, Zn superoxide dismutase / M.D. Holdom, R.J. Hay, A.J. Hamilton // Infect. Immun. – 2006. – Vol. 64, № 8. – P.3326–3332.

22. Гесслер Н.Н. Активные формы кислорода в регуляции развития грибов / Н.Н. Гесслер, А.А. Аверьянов, Т.А. Белозерская // Биохимия. – 2007. – Т. 72, № 10. – С. 1342–1363.

23. Тугай А.В.. Влияние хронического облучения в малых дозах на *Hormoconis resinae* Радиобиология: антропогенные излучения / А.В.Тугай, Л.С. Гиренко, Л.О. Пидгурская [и др.] // Матер. междунар. науч. конф. Гомель, 2014. – Гомель, 2014.

24. Тугай Т.І. Функціонування антиоксидантної системи *Aspergillus versicolor* з радіоадаптивними властивостями за дії іонізуючого опромінення / Т.І. Тугай // Микробиол. журн. – 2011. – Т. 73, №5. – С. 28–35.

Надійшла до редколегії 27.12.15

А. Тугай, соискатель, Т. Тугай, д-р биол. наук

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, Киев, Украина,

Д. Лукашов, д-р биол. наук

Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

ВЛИЯНИЕ ХРОНИЧЕСКОГО ОБЛУЧЕНИЯ НА ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ТРЕХ ОБЛУЧЕННЫХ "ПОКОЛЕНИЙ" *ASPERGILLUS VERSICOLOR*

Охарактеризовано влияние хронического облучения на три "поколения" *Aspergillus versicolor*, которые были получены в модельных условиях из двух родительских штаммов: *A.versicolor* 99 с радиоадаптивными свойствами, был изолирован из помещений объекта "Укрытие" Чернобыльской АЭС и *A.versicolor* 432 – контрольный. При культивировании на двух средах с различным содержанием источника углерода у исследованных "поколений" *A. versicolor* 99 и *A. versicolor* 432 выявлено разнонаправленные изменения скорости радиального роста (от замедления к ускорению), которые по величине находились в пределах от 60% до 140% (на сусло-агаре) и от 70% до 230% (на голодном агаре) по отношению к соответствующим необлученным "поколениям". Выявлены изменения в профиле активности антиоксидантных ферментов супероксиддисмутазы, каталазы, пероксидазы, которые имеют волнообразный характер у трех исследованных "поколений" *A.versicolor* 432 и *A.versicolor* 99 (за исключением каталазы) и высокую амплитуду колебаний от уменьшения до 30% к увеличению до 900 %.

Ключевые слова: ионизирующее облучение, "поколения" *Aspergillusversicolor*, ферменты антиоксидантной защиты.

A. Tugay, applicant., T. Tugay, DSc

Institute of Microbiology and Virology. DK Zabolotny National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine,

D. Lukashov, DSc.

Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

INFLUENCE OF LOW CHRONIC EXPOSURE ON PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL PROPERTIES OF THREE IRRADIATED GENERATIONS *ASPERGILLUS VERSICOLOR*

Exposure of chronic radiation on three generation *Aspergillus versicolor*, which were obtained in the model conditions from two parental strains: *A.versicolor* 99 with radioadaptive properties isolated from location "Shelter" Chornobyl NPP and *A.versicolor* 432 – control were characterized. In investigated generation *A. versicolor* 99 and *A. versicolor* 432 were found opposite changes of the growth rate (from deceleration to acceleration) under the cultivating in two medium with different content of carbon source, which value was in the range from 60% to 140% (on wort agar) and from 70% to 230% (on depleted nutrients agar) in comparison with non-irradiated generations. In three investigated generations *A.versicolor* 432 and *A.versicolor* 99 were found changes in the profile of activity of the antioxidant enzymes superoxidedismutase, catalase, peroxidase, which had wavy like character (except catalase) and high amplitude of oscillation from decreasing to 70% up to an increase to 900 %.

Key words: ionizing radiation, generations *Aspergillus versicolor*, enzymes of antioxidant system.

УДК: 57.612.3+616-008+3

Д. Воєйкова, асп., Л. Степанова, канд. біол. наук,

О. Савчук, д-р біол. наук, Л. Остапченко, д-р біол. наук

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ,

М. Кондрю, канд. мед. наук

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, Львів

СКЛАД БІЛКІВ ГЕПАТОЦИТІВ ЩУРІВ ЗА УМОВ ГЛУТАМАТ-ІНДУКОВАНОГО ОЖИРІННЯ ТА ЙОГО КОРЕКЦІЇ

Охарактеризовано низько-, середньо- та високомолекулярні фракції гепатоцитарних білків за умов розвитку глутамат-індукованого ожиріння та корекції нанокристалічним діоксидом церію і піоглітазоном. Білкові фракції були розділені за допомогою диск-електрофорезу за методом Laemmli у градієнті ПААГ з додецилсульфатом натрію. За умов глутамат-індукованого ожиріння пул білків гепатоциту змінюється, а саме зменшується вміст високомолекулярних білків на фоні підвищення вмісту низькомолекулярних. Характер змін у пулі гепатоцитарних білків узгоджується з раніше встановленими даними про зміни вмісту білків у гепатоцитах під впливом ВКД багатой на жири і вуглеводи. За умов корекції діоксидом церію було відмічено схожі зміни у пулі білків гепатоциту, але у порівнянні з глутамат-індукованим ожирінням вміст низькомолекулярних білків був нижчим. Піоглітазон не показав позитивного впливу на пул гепатоцитарних білків, що може бути пов'язане з коротким терміном введення.

Ключові слова: глутамат-індуковане ожиріння, діоксид церію, піоглітазон, білкові фракції, гепатоцити.

Вступ. Ожиріння є великою проблемою сьогодення, що пов'язано з порушенням системи харчування, хаотичним режимом прийому їжі та широким використанням у продуктах харчових добавок, зокрема, таких як L-глутамат натрію (ГН). Вище зазначені фактори впливають на обмін речовин та призводять до розвитку "пандемії" аліментарного або дієтичного ожиріння [15]. В умовах надлишкової ваги абдомінального типу, збільшення маси вісцерального жиру призводить до

надходження в кровоносне русло, і далі у печінку, надлишкової кількості вільних жирних кислот, що, в свою чергу, призводить до ряду порушень вуглеводного і жирового обміну. Одним з найбільш небезпечних є розвиток інсулінорезистентності і печінковий стеатоз, які негативно впливають на функціонування печінки [7, 12]. Паралельний розвиток запальних процесів та окисного стресу веде до посилення патологічних процесів, які пов'язані з кількісними і якісними змінами пулу білків.

Було показано, що розвиток дієт-індукованого ожиріння та стеатозу впливає на склад та розподіл білків у цитоплазмі гепатоцитів змінюючи їх. Це вказує на те, що визначення змін у пулі гепатоцитарних білків може слугувати додатковим маркером ступеня ліпідної інфільтрації та стеатозу [4, 9, 15]. Проте дані щодо змін у пулі білків гепатоцитів за умов розвитку глутамат-індукованого ожиріння відсутні.

Не менш важливою проблемою сьогодення є пошук препаратів, які впливають на різні ланки патогенезу асоційованого з ожирінням стеатозу. На сьогодні, в ряді робіт було показано, що нанокристалічний діоксид церію у низьких дозах володіє антиоксидантними властивостями і знижує кількість ліпідних включень у гепатоциті, поряд зі зменшенням запальних і апоптичних явищ [5, 14]. Інша родина речовин, яка привернула до себе нашу увагу, це тіазолідиніони (ТЗД). ТЗД є синтетичними лігандами ядерних рецепторів PPAR γ , які регулюють широке коло процесів, зокрема вуглеводний і ліпідний обмін. Показано, що ТЗД зменшують рівень токсичних продуктів ліпідного метаболізму і підвищують чутливість тканин печінки і м'язів до інсуліну [6, 7, 13, 17]. Отримані літературні дані дозволяють припустити можливу ефективність і доцільність застосування діоксиду церію і піоглітазону для корекції ожиріння і супутнього стеатозу.

Саме тому, метою роботи стало визначення вмісту білків гомогенату гепатоциту у щурів з глутамат-індукованим ожирінням та за умов корекції піоглітазоном і нанокристалічним діоксидом церію.

Матеріали і методи:

Досліди проводили на білих нелінійних щурах самцях. Новонароджених щурят ділили на чотири групи, першим трьома групам на протязі 2, 4, 6, 8 і 10 дня підшкірно вводили L-глутамат натрію (ГН) у дозі 4 мг/кг розчиненому у фізіологічному розчині у кількості 8 мкл/г ваги щурят. Четвертій групі в ці ж терміни підшкірно вводили фізіологічний розчин у кількості 8 мкл/г. Починаючи з 1 місяця від дня народження та протягом наступних трьох місяців щурам другої групи перорально почали вводити нанокристалічний діоксид церію у дозі 1 мг/кг [3, 16]. Введення препарату було за наступною схемою: 2 тижні введення, 2 тижні перерви. Щурам третьої групи за аналогічною схемою вводили піоглітазон, у дозі 20 мг/кг шляхом додавання у раціон харчування.

На основі аналізу методичних підходів для отримання морфологічно та функціонально інтактних клітин нами була модифікована відома методика неферментативного отримання гомогенату гепатоцитів за Петренко А.Ю. і співав [1]. Аналіз складу білків гепатоцитів здійснювали з використанням методу диск-електрофорезу за методом Laemmli у 10% ПААГ з додецилсульфатом натрію (ДДС-Na) [11]. Статистичну обробку результатів дослідження проводили загальноприйнятими методами варіаційної статистики. Для статистичної обробки параметричних даних був використаний t-критерій Стюдента для незалежних вибірок [2].

Результати та їх обговорення:

У контрольній групі чотирьохмісячних щурів білки гомогенату гепатоцитів розділилися на 13 фракцій. У групі чотирьохмісячних щурів, які мали ожиріння, гепатоцитарні білки розділилися на 17 фракцій. У щурів, яким на фоні розвитку ожиріння вводився діоксид церію, білки гепатоцитів розділилися на 13 фракцій, а у групі, де у якості корекції надлишкової ваги вводився піоглітазон, на 12 фракцій.

Аналіз літературних даних дозволив нам поділити фракції, відповідно до молекулярної маси (м.м.), на високомолекулярні (100-235 кДа), середньомолекулярні (65-96 і 30-59 кДа) та низькомолекулярні (5-29 кДа) для всіх досліджуваних груп. Розподіл між білками у контрольній і групі щурів з ожирінням показав різницю у кількості фракцій. У контрольній групі високомолекулярні білки поділились на 4 фракції, а у групі з глутамат-індукованим ожирінням на 11 фракцій. Спостерігалась поява білків з м.м. 113, 118, 135, 141, 147 і 175 кДа, яких не було у контролі. Високомолекулярні білки за умов корекції діоксидом церію поділились на 7 фракцій, а у групі, де тваринам вводили піоглітазон, вони розділились на 3 фракції. При цьому ми спостерігали, що в обох групах максимальна м.м. білків була нижчою ніж у контролі. При застосуванні діоксиду церію вона становила 137 кДа, а при корекції піоглітазоном 180 кДа. Середньомолекулярні і низькомолекулярні фракції білків у всіх групах розділились схожим чином без суттєвих змін.

Порівнявши вміст відповідних фракцій білків гомогенату гепатоцитів з контрольною групою, виявилось, що за умов розвитку ожиріння зменшується вміст високомолекулярних білків у 2,92 рази ($p < 0,05$) та у 8,22 рази ($p < 0,05$) білків з м.м. 65-96 кДа (рис. 1).

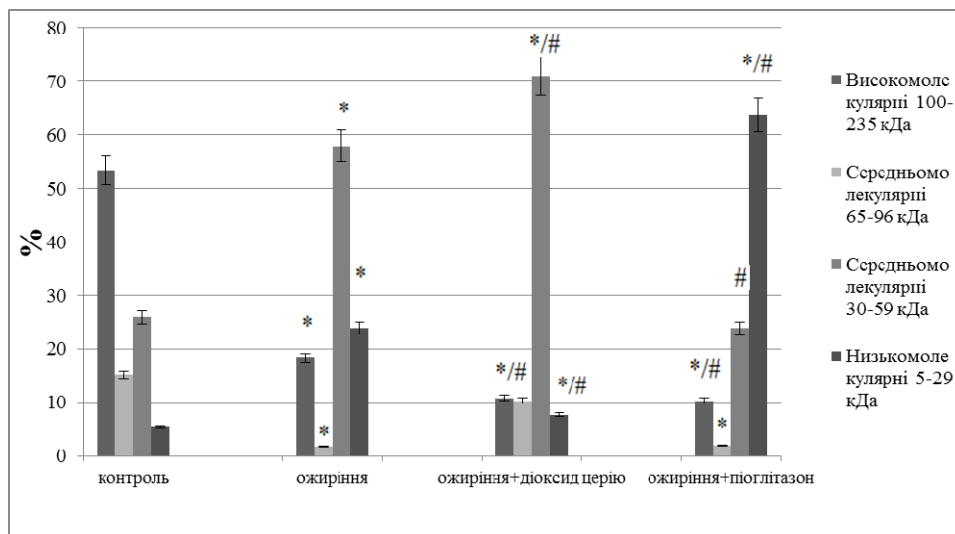


Рис 1. Вміст білків гепатоцитів щурів-самців за умов розвитку глутамат-індукованого ожиріння та його корекції діоксидом церію і піоглітазоном ($M \pm m$, $n=10$)

Примітки: * - $p < 0,05$ (у порівнянні з контрольною групою); # - $p < 0,05$ (у порівнянні з групою ожиріння)

При цьому вміст білків з м.м. 30-59 кДа та 5-29 кДа збільшувався у 2,23 ($p<0,05$) і 4,41 ($p<0,05$) рази відносно контрольної групи. Отримані дані корелюють з попередньо встановленими змінами пулу білків у гепатоцитах щурів за умов утримання на ВКД, з високим вмістом як жирів, так і вуглеводів. Подібне зменшення вмісту високомолекулярних білків, поряд з значним підвищенням фракції низькомолекулярних білків спостерігалось вже з 12 тижня утримання на змінній дієті і до кінця експерименту [4]. Літературні дані вказують на зв'язок між змінами у пулі білків гепатоцитів і розвитком асоційованого зі стеатозом ожирінням за умов довготривалого утримання на ВКД різних типів. Саме тому, ми припускаємо, що встановлені нами зміни вмісту білків гепатоцитів відбуваються через розвиток стеатозу, який також супроводжує глутамат-індуковане ожиріння [9, 10].

Введення діоксиду церію показало, також, зниження вмісту високомолекулярних білків у 4,93 рази ($p<0,05$) і білків з м.м. 60-96 кДа у 1,5 рази ($p<0,05$). Вміст білків з м.м. 30-59 кДа і 5-29 кДа збільшувався у 2,74 ($p<0,05$) і 1,42 ($p<0,05$) рази відносно контрольних груп. Порівняння з групою ожиріння показало, що вміст високомолекулярних білків був нижчим у 1,68 ($p<0,05$) рази, середньомолекулярних вищим у 5,58 ($p<0,05$) і 1,23 ($p<0,05$) рази, а низькомолекулярних навпаки нижчим у 3,09 рази ($p<0,05$). Літературні дані вказують, що застосування нанокристалічного діоксиду церію знижує кількість ліпідних включень у цитоплазмі гепатоцитів, пригнічує розвиток запальних і апоптичних явищ у печінці щурів за умов внутрішньовенного введення [14, 16]. Проаналізувавши характер отриманих нами даних, ми припускаємо, що пероральне введення також може зменшувати ступінь накопичення ліпідів клітинами печінки, так як спостерігається позитивний вплив на вміст білків гепатоцитів у порівнянні з групою де розвивалось ожиріння під впливом ГН.

Періодичне введення піоглітазону на фоні глутамат-індукованого ожиріння показало зниження вмісту високомолекулярних білків у 5,17 разів ($p<0,05$) і білків з м.м. 62-96 кДа у 7,59 разів ($p<0,05$). При цьому спостерігалось підвищення вмісту низькомолекулярних білків у 11,77 разів ($p<0,05$) і не змінювався вміст білків з м.м. 30-59 кДа. При порівнянні отриманих результатів з групою без корекції надлишкової ваги, виявилось, що вміст високомолекулярних білків був нижчим у 1,77 разів ($p<0,05$), білків з м.м. 30-59 кДа також нижчим у 2,43 рази ($p<0,05$), а вміст низькомолекулярних білків був вищим у 2,67 рази ($p<0,05$). Отже, отримані результати дозволяють спостерігати відсутність ефекту від застосування у якості корекції піоглітазону, а у деяких випадках навіть погіршення показників вмісту цитоплазматичних білків у порівнянні з контрольною групою. Як було зазначено вище, літературні дані щодо похідних тіазолідиндіону показують наявність ефекту лише від довготривалого прийому у людей як з печінковим стеатозом і ожирінням, так і лише зі стеатозом. Можливо саме тому, ми не спостерігали ефекту від препарату через короткочасність прийому [7, 12, 15].

Висновки:

Виявлено, що за умов глутамат-індукованого ожиріння пул білків гепатоциту змінюється, а саме зменшу-

ється вміст високомолекулярних білків на фоні підвищення вмісту низькомолекулярних. Характер змін у пулі гепатоцитарних білків узгоджуються з раніше встановленими даними про зміни вмісту білків у гепатоцитах під впливом ВКД багатої на жири і вуглеводи. За умов корекції діоксидом церію було відмічено схожі зміни у пулі білків гепатоциту, але у порівнянні з глутамат-індукованим ожирінням вміст низькомолекулярних білків був нижчим. Піоглітазон не показав позитивного впливу на пул гепатоцитарних білків, що може бути пов'язане з коротким терміном введення.

Список використаних джерел

1. Петренко А. Ю. Выделение гепатоцитов крыс не ферментативным методом: детоксикационная и дыхательная активности / А. Ю. Петренко, А. Н. Сукач, А. Д. Росляков // Биохимия. – 1991. – Т. 56, № 9. – С. 1647 – 1650.
2. Плохинский Н.А. Методические консультации по биометрии / Н.А. Плохинский // Проблемы современной биометрии. – М.: МГУ, 1981. – С. 30-50.
3. Спивак Н.Я. Нанокристаллический диоксид церия повышает функциональную активность репродуктивной системы стареющих самцов крыс / Н.Я. Спивак, Н.Д. Носенко, Н.М. Жолобак [и др.] // Наносистемы: физика, химия, математика. – 2013, № 4(1). – С. 72-77.
4. Шелест Д.А. Характеристика белковых фракций цитозоля гепатоцитов крыс в условиях развития экспериментального метаболического синдрома / Д.А. Шелест, А.Н. Савчук, Л.И. Остапенко, М.М. Кондрю // Universum: Химия и биология. – 2015, № 3-4(12).
5. Amin K.A. The protective effects of cerium oxide nanoparticles against hepatic oxidative damage induced by monocrotaline / K.A. Amin, M.S. Hassan, el-S.T. Awad [et al.] // International Journal of Nanomedicine. – 2011. – Vol. 6. – P. 143-149.
6. Caldwell S.H. A pilot study of a thiazolidinedione, troglitazone, in nonalcoholic steatohepatitis / S.H. Caldwell, E.E. Hespdenheide, J.A. Redick [et al.] // The American Journal of Gastroenterology. – 2001. – Vol. 96(2). – P. 519-525.
7. Eckel R.H. Pharmacological treatment and therapeutic perspectives of metabolic syndrome / R.H. Eckel, S. Lim // Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders. – 2014. – Vol. 15(4). – P. 329-341.
8. Fountoulakis M. Proteomic analysis of the rat liver / M. Fountoulakis, L. Suter // Journal of Chromatography B. – 2002. – Vol. 782. – P. 197-218.
9. Kirpich I. Integrated hepatic transcriptome and proteome analysis of mice with high-fat diet-induced nonalcoholic fatty liver disease / I. Kirpich, L. Gobejishvili, M. Homme [et al.] // The Journal of Nutritional Biochemistry. – 2011. – Vol. 22(1). – P. 1-19.
10. Kondro M. Metabolic profile and morpho-functional state of the liver in rats with glutamate-induced obesity / M. Kondro, G. Mykhalchysyn, P. Bodnar, N. Kobylak, T. Falalyeyeva // Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences. – 2013. – Vol. 26(4). – P. 379-381.
11. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage / U.K. Laemmli // Nature. – 1970. – P. 680-685.
12. Medina J. Approach to the pathogenesis and treatment of Non-alcoholic steatohepatitis / J. Medina, L.I. Fernandez-Salazar, L. Garcia-Buey [et al.] // Diabetes Care. – 2004. – Vol. 27, №8. – P. 2057-2066.
13. Neuschwander-Tetri B.A., Brunt E.M., Wehmeier K.R. et al. Improved nonalcoholic steatohepatitis after 48 weeks of treatment with the PPAR-gamma ligand rosiglitazone // Journal of Hepatology. – 2003. – Vol. 38(4). – P. 1008-1017.
14. Oro D. Cerium oxide nanoparticles reduce steatosis, portal hypertension and display anti-inflammatory properties in rats with liver fibrosis / D. Oro, T. Yudina, G. Fernandez-Varo [et al.] // Journal of Hepatology. – 2015. – accepted manuscript, DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2015.10.020>.
15. Pereira-Lancha L.O. Obesity: considerations about etiology, metabolism, and the use of experimental models / L.O. Pereira-Lancha, P.L. Campos-Ferraz, A.H. Lancha // Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targeted and Therapy. – 2015. – Vol. 5. – P. 75-87.
16. Shcherbakov A.B. Nanocrystalline Ceria based materials – perspectives for biomedical application / A.B. Shcherbakov, V.K. Ivanov, N.M. Zholobak [et al.] // Biophysics. – 2011. – Vol. 56(6). – P. 995-1015.
17. Razavizade M. The effect of pioglitazone and metformin on liver function tests, insulin resistance, and liver fat content in nonalcoholic Fatty liver disease: a randomized double blinded clinical trial / M. Razavizade, R. Jamali, A. Arj [et al.] // Hepatitis Monthly. – 2013. – Vol. 13(5). – P. 1-10.

Надійшло до редколегії 27.12.15

D. Voieikova, PhD stud., L. Stepanova, PhD., O. Savchuk, DSc., L. Ostapchenko, DSc
Taras Shevchenko National university of Kyiv, Kyiv, Ukraine,
M. Kondro, PhD
Danila Galitsky Lviv National Medical University, Lviv, Ukraine

PROTEIN ANALYSIS OF RAT HEPATOCYTES UNDER CONDITIONS GLUTAMATE-INDUCED OBESITY AND ITS CORRECTION

We had characterized low-, medium- and high-molecular protein fractions of hepatocytes under development of glutamate-induced obesity and correction of nanocrystalline cerium dioxide and pioglitazone. Protein fractions were separated by electrophoresis using a 10 % Laemmli SDS-PAGE sodium dodecyl sulfate. Protein hepatocytes change under glutamate-induced obesity: high-protein reduced, and low-protein increased. Changes in hepatocyte proteins are consistent with previously established changes in protein content of hepatocytes under the influence HCD rich in fats and carbohydrates. We had noticed similar changes in protein of hepatocytes under correction cerium dioxide, but compared with glutamate-induced obesity, low proteins were lower. Pioglitazone didn't show a positive effect on hepatocyte proteins that may be associated with short-term administration.

Key words: glutamate-induced obesity, cerium dioxide, pioglitazone, protein fractions, hepatocytes.

Д. Воейкова, асп., Л. Степанова, канд. биол. наук, А. Савчук, д-р биол. наук, Л. Остапченко, д-р биол. наук
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина,
М. Кондро, канд. мед. наук
Львовский национальный медицинский университет имени Данила Галицкого, Львов, Украина

АНАЛИЗ СОСТАВА БЕЛКОВ ГЕПАТОЦИТОВ КРЫС В УСЛОВИЯХ ГЛУТАМАТ-ИНДУЦИРОВАННОГО ОЖИРЕНИЯ И ЕГО КОРРЕКЦИИ

Охарактеризованы низко-, средне- и высокомолекулярные фракции гепатоцитарных белков в условиях развития глутамат-индуцированного ожирения и коррекции нанокристаллическим диоксидом церия и пиоглитазоном. Белковые фракции были разделены с помощью диск-электрофореза по методу Laemmli в градиенте ПААГ с додецилсульфатом натрия. В условиях глутамат-индуцированного ожирения пул белков гепатоцита меняется, а именно уменьшается содержание высокомолекулярных белков на фоне повышения содержания низкомолекулярных. Характер изменений в пуле гепатоцитарных белков согласуются с ранее установленными данными об изменениях содержания белков в гепатоцитах под влиянием ВКД богатой жирами и углеводами. В условиях коррекции диоксидом церия было отмечено схожие изменения в пуле белков гепатоцита, но по сравнению с глутаматом-индуцированным ожирением содержание низкомолекулярных белков было ниже. Пиоглитазон не показал положительного влияния на пул гепатоцитарных белков, что может быть связано с коротким сроком введения.

Ключевые слова: глутамат-индуцированное ожирение, диоксид церия, пиоглитазон, белковые фракции, гепатоциты.

Наукове видання



ВІСНИК
КИЇВСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОГО УНІВЕРСИТЕТУ ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

БІОЛОГІЯ

Випуск 2(70)

Друкується за авторською редакцією

Оригінал-макет виготовлено ВПЦ "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. 9,9. Наклад 300. Зам. № 215-7562.
Гарнітура Arial. Папір офсетний. Друк офсетний. Вид. № Б 2.
Підписано до друку 15.01.16

Видавець і виготовлювач
ВПЦ "Київський університет"

01601, Київ, б-р Т. Шевченка, 14, кімн. 43
☎ (38044) 239 32 22; (38044) 239 31 72; тел./факс (38044) 239 31 28
e-mail: vpc@univ.kiev.ua
<http://vpc.univ.kiev.ua>

Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 1103 від 31.10.02