

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 та медицини" у 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.

Приведены экспериментальные данные об особенностях строения, развития и функционирования растительных и животных организмов, флору и фауну Украины, полученные на основе исследований, проводимых учеными УНЦ "Институт биологии и медицины" в области физиологии растений и животных, генетики, ботаники, зоологии, микробиологии, вирусологии. Изложены также новые данные о биохимических и биофизических основах 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 and medicine" 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. Торгалю, канд. біол. наук (відп. секр.); С. Є. Вакал, канд. біол. наук (техн. секр.); Шандор Макай, д-р біол. наук, проф. (м. Сомбатхей, Угорщина); Іван Бубриак, канд. мед. наук (Оксфорд, Велика Британія); В. Г. Хоперія, д-р мед. наук, проф.; В. О. Іваниця, д-р біол. наук, проф. (м. Одеса, Україна); Д. М. Говорун, д-р біол. наук, проф., чл.-кор. НАНУ (м. Київ, Україна); В. С. Мартинюк, д-р біол. наук, проф.; М. Ю. Макаруч, д-р біол. наук, проф.; Н. Ю. Таран, д-р біол. наук, проф.; А. В. Сиволоб, д-р біол. наук, проф.; В. В. Джаган, канд. біол. наук, доц.; А. Г. Мойсеєнок, д-р біол. наук, проф., чл.-кор. (м. Гродно, Білорусь)

Адреса редколлегии

ННЦ "Інститут біології та медицини";
просп. акад. Глушкова, 2а, Київ, Україна, 03127
☎ (38044) 521-35-98; www.biovestnik.com; bulletin.vestnik@gmail.com

Затверджено

Вченою радою ННЦ "Інститут біології та медицини"
08.10.18 (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

ВПЦ "Київський університет" (кімн. 43), 6-р Т. Шевченка, 14,
Київ, Україна, 01601
☎ (38044) 239 31 72, 239 32 22; факс 239 31 28

**Журнал входит
до наукометрических баз /
Abstracted and Indexed:**

Index Copernicus (з 2012 р. ICV-2013 = 5,93), 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 (з 2014 р.).

Collection of articles written by the scientists of ESC "Institute of biology and medicine" 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.

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 та медицини" у 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.

Приведены экспериментальные данные об особенностях строения, развития и функционирования растительных и животных организмов, флору и фауну Украины, полученные на основе исследований, проводимых учеными УНЦ "Институт биологии и медицины" в области физиологии растений и животных, генетики, ботаники, зоологии, микробиологии, вирусологии. Изложены также новые данные о биохимических и биофизических основах 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.

EDITOR-IN-CHIEF	Ostapchenko Lyudmila, D. Sci., Prof.
EDITORIAL BOARD	Torgalo Elizabeth, PhD; Sergii Vakal, PhD (Tech. Editor); Sandor Makai, Prof. Dr. habil. Dr. h.c. (Szombathely, Hungary); Ivan Boubriak, PhD (Oxford, United Kingdom); Khoperiay Viktiriay, Dr.Sc.; Volodymyr Ivanytsia, Dr.Sc., Professor Chair (Odessa, Ukraine); Dmytro Hovorun, Dr.Sc., Professor, Corresponding Member of the NASU, Deputy Director (Kyiv, Ukraine); Viktor Martynyuk, Dr.Sc., Professor; Mykola Makarchuk, Dr.Sc., Professor Head of the Chair; Nataliia Taran, Dr.Sc., Professor, Head of the Chair of Plant Biology; Andrii Sivolob, Dr.Sc., Professor; Veronika Dzhagan, PhD, Associate Professor; Andrei Moisieenok, Dr.Sc, Professor, Corresponding Member of the NASB (Grodno, Belarus)
Editorial address	ESC "Institute of Biology and Medicine", 2a, acad. Glushkov av., Kyiv, 03127, Ukrainian ☎ (38044) 521 35 98; www.biovestnik.com ; bulletin.vestnik@gmail.com
Approved by	The Academic Council of the ESC "Institute of Biology and Medicine" 08.10.18 (Protokol № 4)
Attested by	Higher Attestation Commission of Ukraine HAC Presidio decree № 1-05/3 (April 14th, 2010)
Registered by	Ministry of Justice of Ukraine. Registration certificate KV № 16053-4524 ПП (November 9th, 2009)
Founded and Published	Kyiv National Taras Shevchenko University, Kiev, Ukraine, Publishing and Printing Center "Kiev University". The certificate is entered in the State Register DK № 1103 (October 31th 2002)
Publisher's Address	Publishing and Printing Centre "Kiev University" (off. 43), 14 Taras Shevchenko av., Kyiv, 01601, Ukraine ☎ (38044) 239 31 72, 239 32 22; Fax: 239 31 28
Abstracted and Indexed:	Academic Keys, CiteFactor, Directory of Open Access Journals (DOAJ), E-Library.ru, Hinari, Geneva Foundation for Medical Education and Research, DRJI, Open Academic Journal Index (OAJI), Quality Open Access Market (QOAM), ResearchBib, Ulrich's Periodicals, WorldCat, Ukrainian scientific journals

Ткаченко В., Шевцова А. Зміни показників карбонільно-оксидативного стресу в щурів з експериментальною ішемією міокарда під впливом доксицикліну	6
Гурмач Є., Рудик М., Святецька В., Сківка Л. Функціональні характеристики циркулюючих фагоцитів щурів із гліомою C6	12
Ковтун-Водяницька С. Ультраскульптура еремів представників роду <i>ISODON</i> (<i>SCHRAD. ex BENTH.</i>) <i>SPACH</i> (<i>LAMIACEAE LINDL.</i>)	17
Хоменко І., Косик О., Таран Н. Параметри водного обміну рослин салату посівного за дії іонів кадмію	20
Стецька В., Шуставецька Н., Сергійчук Т., Довбинчук Т., Толстанов Г. Кількісний та якісний склад мікробіоти дистального відділу товстої кишки щурів у різні терміни експериментального 6-OHDA-викликаного паркінсонізму (пілотні дослідження)	26
Коломієць Л., Цуварєв О., Корнелюк О. Дослідження впливу наноконкомпозитного комплексу цитокіну EMAP II з декстрином 70 на організм мишей лінії BALB/C.....	29
Ревуцька А., Белава В., Голубенко А., Таран Н. Визначення ксантонів у рослинах та живильному середовищі за умов культивування <i>in vitro</i>	33
Юрченко А., Креницька Д., Тимошенко М. Система глутатіону крові щурів з експериментальною моделлю ожиріння при споживанні екстракту лушпиння квасолі звичайної (<i>PHASEOLUS VULGARIS</i>).....	37
Василакі А., Дмитрик В., Луговська Т., Яковлев П. Показники гемостатичного потенціалу на різних стадіях раку сечового міхура	42
Янко Р. Морфологічні зміни підшлункової залози щурів після сумісного впливу дозованої нормобаричної гіпоксії і мелатоніну	47
Оскірко О., Дудкіна Ю., Ніколаєва І., Галенова Т., Марущак О. Різноманіття і властивості захисних пептидів із шкірних секретів безхвостих амфібій	51
Белемєць Н., Фалалєєва Т., Берегова Т., Остапченко Л., Кобиляк Н., Курик О., Сулаєва О. Морфогенез підшлункової залози за умов глутамат-індукованого ожиріння: механізми корегуючої дії меланіну	56
Блохіна О., Короткий О., Кот Л., Неграй Д., Дворщенко К. Окисна модифікація білків у сироватці крові щурів за умов каррагінан-індукованого запалення задньої кінцівки та тривалого профілактичного введення хондроїтину сульфату	62
Бобошко О., Панюта О., Артеменко О., Таран Н., Ємельянов В. Патоген-індуковане накопичення калози та фенольних сполук у проростках озимої пшениці	66
Руднєва Т., Шевченко Т., Шевченко О., Будзанівська І. Вірус зеленої крапчастої мозаїки огірка в агроценозах України.....	71
Стороженко В., Світлова Н., Коваленко М., Бацманова Л., Таран Н. Індукція стійкості проростків пшениці до дії модельованої посухи колоїдним розчином наночастинок Cu ²⁺ і Zn ²⁺	79

СОДЕРЖАНИЕ

Ткаченко В., Шевцова А. Изменения показателей карбонильно-оксидативного стресса у крыс с экспериментальной ишемией миокарда под влиянием доксициклина	6
Гурмач Е., Рудик М., Святецкая В., Скивка Л. Функциональные характеристики циркулирующих фагоцитов крыс с глиомой С6	12
Ковтун-Водяницкая С. Ультраскульптура эремов представителей рода <i>ISODON</i> (<i>SCHRAD. ex BENTH.</i>) <i>SPACH</i> (<i>LAMIACEAE LINDL.</i>)	17
Хоменко И., Косык О., Таран Н. Параметры водного обмена растений салата посевого при действии ионов кадмия	20
Стецкая В., Шуставецкая Н., Сергейчук Т., Довбинчук Т., Толстанова Г. Количественный и качественный состав микробиоты дистального отдела толстой кишки крыс в разные сроки экспериментального 6- OHDA- вызываемого паркинсонизма (пилотное исследование)	26
Коломиец Л., Заец В., Цуварев А., Корнелюк О. Исследование влияния нанокмппозитного комплекса цитокина ЕМАР II с декстрином 70 на организм мышей линии BALB/C	29
Ревуцкая А., Белава В., Голубенко А., Таран Н. Определение ксантонов в растениях и питательной среде в условиях культивирования <i>in vitro</i>	33
Юрченко А., Креницкая Д., Тимошенко М. Система глутатиона крови крыс с экспериментальной моделью ожирения при потреблении экстракта створок фасоли обыкновенной (<i>PHASEOLUS VULGARIS</i>)	37
Василаки А., Дмитрик В., Луговская Т., Яковлев П. Показатели гемостатического потенциала при различных стадиях рака мочевого пузыря	42
Янко Р. Морфологические изменения поджелудочной железы крыс после совместного воздействия дозированной нормобарической гипоксии и мелатонина	47
Оскирко О., Дудкина Ю., Николаева И., Галенова Т., Марущак О. Разнообразие и свойства защитных пептидов из кожных секретов бесхвостых амфибий	51
Белемезь Н., Фалалеева Т., Береговая Т., Остапченко Л., Кобыляк Н., Курик Е., Сулаева О. Морфогенез поджелудочной железы в условиях глутамат-индуцированного ожирения: механизмы корректирующего действия меланина	56
Блохина О., Короткий А., Кот Л., Неграй Д., Дворченко Е. Окислительная модификация белков в сыворотке крови крыс в условиях каррагинан-индуцированного воспаления задней конечности и длительного профилактического введения хондроитина сульфата	62
Бобошко Е., Панюта О., Артеменко А., Таран Н., Емельянов В. Патоген-индуцированное накопление каллозы и фенольных соединений в проростках озимой пшеницы	66
Руднева Т., Шевченко Т., Шевченко А., Будзанивская И. Вирус зеленой крапчатой мозаики огурца в агроценозах Украины	71
Стороженко В., Светлова Н., Коваленко Н., Бацманова Л., Таран Н. Индукция устойчивости проростков пшеницы к действию моделируемой засухи коллоидным раствором наночастиц Cu ²⁺ и Zn ²⁺	79

CONTENTS

Tkachenko V., Shevtsova A. Changes parameters carbonyl-oxidative stress in rats with experimental myocardial ischemia under the influence of doxycycline	6
Hurmach Y., Rudyk M., Svyatetska V., Skivka L. Functional characteristics of circulating phagocytes in rats with C6 glioma.....	12
Kovtun-Vodyanitska S. Ultrasculptures of seeds of representatives of a genus <i>ISODON</i> (<i>SCHRAD EX BENTH.</i>) <i>SPACH</i> (<i>LAMIACEAE LINDL.</i>)	17
Khomenko I., Kosyk O., Taran N. Water exchange parameters of lettuce plants under the action of cadmium ions.....	20
Stetska V., Shystavetska N., Serhiychuk T., Dovbynychuk T., Tolstanova G. Quantitative and qualitative microbiota composition of the distal colon of rats in different terms of experimental 6-OHDA- induced parkinsonism (pilot study).....	26
Kolomiets L., Zayets V., Tsuvariev O., Kornelyuk A. Investigation of influence of EMAP II citokin nanocomposite complex with dextran 70 the BALB/C lines muscle organism	29
Revutska A., V.Belava, A. Golubenko, Taran N. Determination of xanthonenes in plants and the nutrient medium under <i>in vitro</i> cultivation conditions	33
Yurchenko A., Krenytska D., Tymoshenko M. The rat blood glutathione system under obesity development with the compatible consumption of the kidney bean (<i>PHASEOLUS VULGARIS</i>) pods extract.....	37
Vasyliak A., Dmytryk V., Luhovska T., Yakovlev P. Indicators of hemostatic potential in various stages of bladder cancer.....	42
Yanko R. Morphological changes of the rats pancreas after the joint influence of the dosed normobaric hypoxia and melatonin	47
Oskyrko O., Dudkina J., Nikolaieva I., Halenova T., Marushchak O. Variability and properties of host defense peptides from the skin secretions of anurans	51
Belemets N., Falalyeyeva T., Beregova T., Ostapchenko L., Kobyliak N., Kuryk O., Sulaieva O. Morphogenesis of pancreas under the conditions of glutamate- induced obesity: mechanisms of correction action of melanin.....	56
Blokhina O., Korotkiy O., Kot L., Negray D., Dvorshchenko K. Oxidative modification of proteins in serum of rats under conditions of carrageenan-induced inflammation back limb and prolonged prophylactic administration of chondroitin sulfate	62
Boboshko O., Panyuta O., Artemenko O., Taran N., Emelyanov V. Pathogen – induced callose and phenolic compounds accumulation in winter wheat seedlings.....	66
Rudnieva T., Shevchenko T., Shevchenko A., Budzanivska I. Cucumber green mottle mosaic virus in agroecosystems of Ukraine	71
Storozhenko V., Svetlova N., Kovalenko M., Batsmanova L., Taran N. Induction of wheat seedlings resistance of different ecotypes to the effect of a drought simulated by a colloidal solution of Cu ²⁺ and Zn ²⁺ nanoparticles.....	79

ЗМІНИ ПОКАЗНИКІВ КАРБОНІЛЬНО-ОКСИДАТИВНОГО СТРЕСУ В ЩУРІВ З ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЮ ІШЕМІЄЮ МІОКАРДА ПІД ВПЛИВОМ ДОКСИЦИКЛІНУ

Ішемічна хвороба серця (ІХС) є найбільш серйозним та загрозливим за негативними наслідками захворюванням у всьому світі. Незважаючи на велику кількість досліджень, біохімічні механізми виникнення ІХС та процесу постінфарктного ремоделювання міокарда до кінця не з'ясовані. Карбонільно-оксидативний стрес (КОС) розглядається як невід'ємний учасник розвитку та прогресування ускладнень у пацієнтів ІХС, тому перспективним напрямом є пошук терапевтичних заходів, що були б здатними до знешкодження проміжних та кінцевих продуктів КОС. Серед таких препаратів розглядаються антиоксиданти флавоноїдної структури, а також інгібітори процесів карбонілювання та глікації білків. Останнім часом з'явилися дослідження стосовно кардіопротекторної дії антибіотика тетрациклінового ряду доксицикліну (ДЦ), у яких доведено його роль як інгібітору процесів протеолізу. Водночас наявність багатозаміщеного фенольного кільця може забезпечити здатність ДЦ до знешкодження вільних радикалів. У цій статті здійснено порівняльний аналіз впливу малих (4,2 мг/кг) і великих (16,8 мг/кг) доз ДЦ з ефектами класичних антиоксидантів корвітину та аміногуанідину на показники КОС та активність ферментів антиоксидантного захисту в крові та субклітинних фракціях серця щурів з експериментальною ішемією міокарда, індукованою комбінованим введенням пітуїтрину та ізадрину. Визначено, що ДЦ виявляє кардіопротекторні властивості, знижуючи утворення продуктів карбонільної і окислювальної модифікації біомолекул ТБК-активних речовин, флуоресціюючих кінцевих продуктів глікації (фКПП) альдегідфенілгідрозонів (АФГ) та кетонфенілгідрозонів (КФГ), причому більш виражений ефект спостерігається за малих доз цього препарату. Одночасно ДЦ активує ферменти антиоксидантного захисту, передусім глутатіонпероксидазу. Ефекти малих доз ДЦ порівнянні або перевищують дію аміногуанідину й корвітину, що визначає перспективність використання ДЦ у лікуванні постінфарктної серцевої недостатності.

Ключові слова: карбонільно-оксидативний стрес, антиоксидантна система, доксициклін, пітуїтрин-ізадринове ушкодження міокарда.

Вступ. Серцево-судинні захворювання (ССЗ), особливо ішемічна хвороба серця (ІХС), є головною причиною смерті у всьому світі: за офіційними даними серед 17,5 мільйона померлих від ССЗ у 2012 році 42,3 % страждали на ІХС [6]. Поточна лікувальна допомога на сучасному рівні дозволяє пережити серцеві напади більшій частині хворих, ніж у минулому, проте багато з тих, хто залишився в живих, і далі страждають на серцеву недостатність і потребують госпіталізації пізніше. Причини серцевої недостатності після серцевого нападу ще остаточно не з'ясовані. Згідно зі спрощеною моделлю патофізіологічного кола прогресування постішемічного ушкодження міокарда надлишок кисню, що надходить у серце після відновлення коронарного кровообігу, призводить до утворення великої кількості активних форм кисню (АФК) і розвитку оксидативного стресу, наслідком чого є ушкодження мембранних ліпідів та функціонально важливих білків кардіоміоцитів [11, 20]. Важливий внесок у патогенез серцевої недостатності вносить також карбонільний стрес, підсилюючи негативні наслідки оксидативного стресу [33]. У зв'язку з цим перспективним напрямом є попередження та лікування ІХС і постішемічного синдрому є пошук препаратів, здатних послаблювати негативний вплив карбонільно-оксидативного стресу на серцевий м'яз.

Аналіз літературних даних свідчить, що кардіопротекторні ефекти антиоксидантів та гіпоглікемізуючих препаратів мають окремі обмеження. Дослідження впливу корвітину, що є водорозчинним аналогом біофлавоноїда кверцетину, показало, що його відновлювача дія після ішемії обумовлена регулюванням активності антиоксидантної системи та зниженням карбонілювання протеїнів [27], але цей препарат відновлює активність антиоксидантних ензимів не в повному обсязі [31]. Класичний гіпоглікемізуючий препарат аміногуанідин знижує кількість кінцевих продуктів глікації в разі тривалого застосування, але має побічну токсичну дію [26]. Останнім часом з'явилися дослідження стосовно кардіопротекторної дії антибіотика тетрациклінового ряду доксицикліну. Попередні результати свідчать про те, що доксициклін знижує постінфарктне ремоделювання лівого шлуночка [18] та проявляє захисний ефект у тваринних моделях серцевої недостатності [29,32], проте його точний молекулярний механізм поки що не-

відомий. Більшою частиною обговорюється здатність цього антибіотика інгібувати матриксні металопротеїнази, що відповідають за процеси ремоделювання серцевого м'яза. Крім цього відзначається різноспрямованість його дії залежно від дози та тривалості застосування [17]. Дані стосовно впливу доксицикліну на показники карбонільно-оксидативного стресу у клітинах постішемізованого міокарда поодинокі та дуже суперечливі. Отже, **метою дослідження** було порівняння впливу різних доз доксицикліну, корвітину та аміногуанідину на показники карбонільно-оксидативного стресу у плазмі та субклітинних фракціях серця щурів з експериментальною ішемією міокарда.

Матеріали та методи. Дослідження було проведено на білих щурах лінії Вістар. Експериментальне ушкодження міокарда, подібне до гострого перебігу ішемічної хвороби серця людини, моделювали шляхом комбінованого введення ізадрину та пітуїтрину за схемою, що описана нами в попередніх дослідженнях [1]. Щурів було розділено на 6 груп по 10 тварин в кожній групі: Перша група – контрольна – отримувала 0,9 % NaCl; друга група – щури з пітуїтрин-ізадрин-індукованим ушкодженням міокарда (ПІУМ); щурам третьої та четвертої груп після моделювання ПІУМ вводили перорально доксициклін протягом 6 днів у дозі 4,2 мг/кг (Д1) та 16,8 мг/кг (Д2) (РУП "Белмедпрепарати", Республіка Білорусь); у п'ятій групі після ПІУМ застосовували аміногуанідин (АГ) протягом 6 днів у дозі 200 мг/кг (Sigma-AldrichInc, StLouis, MO, USA); у шостій вводили інтраабдомінально корвітин (Борщівський ХФЗ) протягом 5 днів після ПІУМ за схемою, описаною в попередніх роботах [9]

Функціональний стан міокарда оцінювали наприкінці експерименту за даними електрокардіограми у другому стандартному відведенні за допомогою комп'ютерного кардіографічного комплексу CardioLab2000 ("ХАІ-Медика", Харків). Індекс маси серця (ІМС) розраховували як відсоток маси серця до маси тіла тварин. Виведення тварин з експерименту здійснювали відповідно до вимог Міжнародної конвенції з правил гуманного поводження з дослідними тваринами та етичним кодексом МОЗ України, використовуючи як знеболювальний препарат тіопентал натрію (40 мг/кг).

Для біохімічного аналізу було використано плазму, еритроцити та клітинні фракції серця експериментальних тварин. Цитозольну, ядерну та мітохондріальну фракції отримували шляхом диференційного центрифугування за стандартною схемою з урахуванням особливостей структури серця [5,7]. Відміте від крові охолодженим 0,9 % NaCl серце гомогенізували у 0,05 М трис-HCl буфері, рН 7,2 (співвідношення тканина/буфер = 1:5), центрифугували при 4 °С протягом 10 хвилин при 600 g. Осад (P1) ресуспендували у 2 частинах такого ж буфера з додаванням інгібіторів протеолізу, центрифугували протягом 15 хв при 15000 g, отриманий супернатант містив ядерну фракцію. Для отримання цитозольної та мітохондріальної фракцій супернатант S1 центрифугували при 15000 g протягом 15 хв, надосадову рідину (S2) відбирали як цитозольну фракцію, а осад P2 ресуспендували у буфері з інгібіторами (1:1), центрифугували 15 хв. при 15000 g і S3 відбирали як фракцію мітохондріальних білків.

Ступінь карбонільно-окисативного стресу (КОС) оцінювали за визначенням ТБК-активних речовин (ТБКАР) [8], рівнем флуоресціюючих кінцевих продуктів глікації (фКПГ) [12], а також показників окислювальної модифікації білка – альдегідфенілгідразонів (АФГ) та кетонфенілгідразонів (КФГ) [4]. Активність антиоксидантних ензимів: супероксиддисмутизи (СОД), каталази, глутатіонпероксидази (ГП), глутатіонредуктази (ГР) оцінювали за загальноприйнятими методами, що були описані в попередніх дослідженнях [9,31]. Рівень глюкози та активності аспартатамінотрансферази (АсАТ) вимірювали за використанням тест-систем ТОВ НВП "Філісіт-Діагностика". Загальний вміст білка оцінювали методом Бредфорд [16].

Результати оброблялися за допомогою програми Microsoft Excel, 2007 та програмного продукту Statistica 6.0. Для порівняння результатів використовували U-критерій Манна-Уїтні для малих груп, рівень відмін-

ностей розглядався як статистично значущий за ймовірності помилки $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення. Після введення пітуїтрину та ізадрину у щурів другої групи спостерігали значні зміни ЕКГ, що є характерними для ішемічного ушкодження міокарда: підвищення частоти серцевих скорочень (ЧСС) на 17 % від щодо контрольної групи, елевацію ST сегменту, зменшення амплітуди та розширення QRS. У тварин цієї групи відбувалося підвищення індексу маси серця (ІМС) на 13 %, що свідчить про незначну гіпертрофію, зумовлену, скоріше за все, початковими стадіями ремоделювання міокарда. Застосування доксицикліну призвело до зниження ЧСС: у третій групі цей показник повернувся до норми і склав $343,8 \pm 7,5 \text{ хв}^{-1}$, у четвертій – $353,6 \pm 6,2 \text{ хв}^{-1}$. Застосування доксицикліну у дозі 4,2 мг/кг призвело до зниження ІМС, а за використання аміногуанідину та високих доз доксицикліну ІМС, навпаки, залишався високим і перевищував такі параметри контрольної групи на 19 % та 12 % відповідно. Отже, низькі дози доксицикліну проявляють виражений відновлювальний ефект на фізіологічний стан та функції серцевого м'яза після експериментально набутої ішемії міокарда.

Результати біохімічного аналізу плазми крові експериментальних тварин наведено в табл. 1. Як видно з наведених даних, введення пітуїтрину та ізадрину за обраною нами схемою супроводжувалося розвитком карбонільно-окисативного стресу: вірогідним ($p \leq 0,001$) підвищенням вмісту ТБКАР, ранніх (АФГ) та пізніх (КФГ) карбонільних продуктів вільнорадикального окиснення, а також фКПГ. Ці зміни спостерігались на тлі підвищеного рівня АсАТ ($p \leq 0,001$) та глюкози ($p \leq 0,05$), що свідчить про ураження серцевого м'яза після ПІУМ та незначну гіперглікемізуючу дію аналога антидіуретичного гормону пітуїтрину.

Таблиця 1. Показники карбонільно-окисного стресу, активність аспартатамінотрансферази та концентрація глюкози в плазмі крові експериментальних тварин ($M \pm m$, $n = 10$)

Показники	Контроль	ПІУМ	ПІУМ + Д1	ПІУМ + Д2	ПІУМ + АГ	ПІУМ + К
ТБК-активні речовини [нмоль/мл]	0,74±0,09	2,09±0,11***	1,06±0,14***§§	1,28±0,18***§§§	0,64±0,09§§§	1,06±0,09***§§§
АФГ [мкмоль/мл]	1,571±0,08	2,19±0,11***	1,45±0,13§§§	1,62±0,17§	1,72±0,24	1,88±0,06***
КФГ [мкмоль/мл]	1,46±0,11	1,71±0,07***	1,41±0,05§	1,54±0,17*	1,33±0,21§§	1,54±0,08***
фКПГ [мг/мл]	0,07±0,003	0,09±0,004***	0,07±0,01§§§	0,08±0,01§	0,07±0,01§§§	0,08±0,002***
АсАТ [мкат/л]	0,49±0,03	0,64±0,01***	0,56±0,02§§§	0,51±0,03§§§	0,49±0,04§§	0,57±0,02§§
Глюкоза [ммоль/мл]	4,71±0,57	6,03±0,63*	6,98±0,36**	6,32±0,56*	5,02±0,28§§	4,91±0,29§

ПІУМ – пітуїтрин-ізадринове ушкодження міокарда, Д1 – доза доксицикліну 4,2 мг/кг, Д2 – доза доксицикліну 16,8 мг/кг, АГ – аміногуанідин, К – корвітин, АФГ – альдегідфенілгідразони, КФГ – кетонфенілгідразони, фКПГ – кінцеві продукти глікації.

* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ – щодо групи контролю; § $p \leq 0,05$, §§ $p \leq 0,01$, §§§ $p \leq 0,001$ – щодо групи з ПІУМ.

Після застосування доксицикліну спостерігалось вірогідне зниження показників КОС порівняно з групою ПІУМ, причому ступінь змін залежала від дози препарату. У дозі Д1 рівень АФГ знижувався у 1,5 раза, КФГ – у 1,2 раза; ТБКАР – у 2 рази стосовно контролю. Подібні зміни, хоча й значно менші, відбувалися і в разі застосування дози Д2. Слід зазначити, що рівень кінцевих продуктів знижувався до значень норми, хоча вміст глюкози був підвищений. Отже, доксициклін знижує ступінь карбонільно-окисативного стресу, не впливаючи на рівень глікемії. Дані літератури стосовно впливу доксицикліну на показники КОС поодинокі і дуже суперечливі. В одних роботах доводиться токсична дія цього препарату на ракові клітини і обговорюється його здатність активувати окисативний стрес, апоптоз та загибель ракових клітин [30, 36], а в інших дослідженнях, навпаки, доводиться захисна дія доксицикліну, що зумовлена зниженням окисативного стресу [15, 19]. Однак у всіх дослідженнях розглядається вплив доксицикліну на показники окисної модифікації без урахуван-

ня процесів карбонілювання та глікації білків. На наш погляд, зниження активності цих процесів під дією доксицикліну є одним з ключових моментів кардіопротекторної дії цього антибіотика. Порівняння дії доксицикліну з ефектами аміногуанідину та корвітину показало, що його малі дози проявляють більш значну дію на рівень ранніх продуктів карбонілювання, ніж зазначені антиоксиданти, хоча пізні продукти карбонілювання (КФГ) та кінцеві продукти глікації (фКПГ) були більш чутливі до дії аміногуанідину. Такий результат пов'язаний з механізмом дії аміногуанідину, що є похідним гідразину. За дослідженням Sho-ichi Yamagishi та ін. доведено, що АГ здатний захоплювати α -дикарбонільні сполуки і таким чином блокувати подальші реакції з аміногрупами білків, утворення КПГ і перехресні зшивки в молекулах колагену [34].

Враховуючи, що зниження рівня КОС може бути наслідком дії антиоксидантної системи, було здійснено аналіз активності СОД, каталази, глутатіонпероксидази та глутатіонредуктази (табл. 2).

Таблиця 2. Активність ензимів системи антиоксидантного захисту в крові експериментальних тварин
($M \pm m$, $n = 10$)

Групи тварин Показники	Контроль	ПІУМ	ПІУМ + Д1	ПІУМ + Д2	ПІУМ + АГ	ПІУМ + К
Супероксидисмутаза [нг/мл/Нв] у гемолізаті еритроцитів	8,01±0,44	9,10±0,90	8,09±1,38	10,05±1,54	8,34±0,55	5,95±0,76*§
Глутатіонпероксидаза [МО/г Нв] у гемолізаті еритроцитів	83,42±7,16	123,29±7,90***	140,98±14,03***	150,35±6,98***	130,05±6,91***	143,61±2,24 ***§
Глутатіонредуктаза [МО/г Нв] у гемолізаті еритроцитів	2,36±0,68	1,69±0,23	2,31±0,88	1,76±0,61	1,99±0,61	1,87±0,16
Каталаза у плазмі [МО/л]	7,25±0,81	2,67±0,46**	4,32±0,21*	3,27±0,03**	3,81±0,04*	5,02±0,58*§§§
Індекс окисного стресу	0,008	0,016	0,007	0,008	0,005	0,007

* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ – щодо групи контролю; § $p \leq 0,05$, §§ $p \leq 0,01$ – щодо групи з ПІУМ.

За отриманими даними в еритроцитах щурів з ПІУМ було незначне підвищення рівня СОД та зростання активності ГП на тлі незначного зниження ГР. Несподіваним було різке зниження активності каталази в плазмі крові. Відомо, що активність глутатіонпероксидази превалює над іншими ферментами антиоксидантного захисту за високої швидкості утворення перекису водню, а каталаза виявляє захисну дію за низької швидкості утворення цього окисника [24]. Отже, отримані нами результати свідчать про високу швидкість утворення перекису водню за умов ПІУМ. Слід також зазначити, що зниження активності каталази може бути наслідком неферментативної глікації цього ферменту, яка пов'язана з окисативним стресом [14].

Застосування доксицикліну в дозі Д1 призвело до нормалізації активності ГР та СОД у еритроцитах, підвищення рівня каталази у 2 рази порівняно з групою ПІУМ. Активність ГП у цій групі збільшилась на 70 % та 14 % порівняно з контрольною групою та групою ПІУМ відповідно. Для дози Д2 аналогічні розрахунки становили 22 % та 85 %, а в разі застосування аміногуанідину та корвітину зростання активності ГП стосовно контролю становило 57 % та 72 % відповідно. Отже, є всі підстави стверджувати, що доксициклін активує один з найважливіших ферментів антиоксидантного захисту – глутатіонпероксидазу. До цього часу кардіопротекторну дію доксицикліну пов'язували здебільшого з його здатністю пригнічувати активність MMP2 та MMP9, які приймають участь у деградації міжклітинного матриксу [22]; знижуючи таким чином процеси ремоделювання та фіброзування у серцевому м'язі [18, 37], але дані щодо активації ГП під дією доксицикліну в науковій літературі відсутні. Антиоксидантні властивості доксицикліну підтверджуються розрахунком індексу окисного стресу (ІОС), що запропонований S. K. Jaiswal [23], за такою формулою: $ІОС = ТБКАР / \text{рівень} (СОД + ГП + ГР)$. Як видно з табл. 2, значення ІОС в групі тварин з ПІУМ у 2 рази перевищувало норму, а в разі застосування антиоксидантів та доксицикліну поверталось до нормальних значень, причому, результати групи 3, де застосовували доксициклін у малих дозах збігалися з такими групи 6, що приймала корвітин – класичний антиоксидант. Найбільш суттєве зниження було в групі 5, у якій застосовували аміногуанідин, що пояснюється його впливом не тільки на окисні, але й на карбонільні радикали.

Дослідження показників КОС у клітинних фракціях серцевого м'яза експериментальних тварин показало,

що за умов ПІУМ рівень ТБКАР, фКПГ та ОМБ збільшується у всіх фракціях. Найбільш значуще підвищення спостерігалось у цитоплазматичній фракції для АФГ та КФГ (рис. 1С), причому рівень ранніх форм ОМБ, а саме АФГ, збільшувався більшою мірою, ніж пізніх, тобто КФГ. У ядерній фракції зміни АФГ та КФГ були недостовірними. Отримані результати не суперечать літературним даним, згідно з якими під впливом стресу в організмі тварин різного віку відбувається зменшення активності ферментів катаболізму ендогенних альдегідів в різних тканинах і їхніх субклітинних фракціях [2,3], що призводить до ендогенної інтоксикації і розвитку патологічного стану [10]. На відміну від показників ОМБ, рівень флуоресціюючих кінцевих продуктів глікації більше зростає у ядерній фракції, що може пояснюватись додатковим внеском ДНК-флуоресценції. Слід зазначити, що у мітохондріальній фракції було зафіксовано лише незначне підвищення ТБКАР. За даними літератури, саме в мітохондріях утворюється найбільша кількість вільних радикалів у разі патологічних станів, і вони є найбільш чутливими до окисного стресу [28]. З іншого боку, окисний стрес призводить до фрагментації мітохондрій, порушенню структури та проникності їхніх мембран [25], що може частково пояснювати слабку реакцію на ТБКАР у мітохондріальній фракції.

Під впливом доксицикліну спостерігались різноспрямовані зміни досліджуваних показників. За дією малих доз цього препарату визначалось зменшення продуктів окисної модифікації та кінцевих продуктів глікації, в основному, в ядерній фракції, а за високих доз різко знижувався рівень АФГ та КФГ в цитозолі, причому, ефекти низьких доз доксицикліну на ці параметри були схожі з дією аміногуанідину. Зміни ТБКАР у всіх субклітинних фракціях серця під дією високих доз цього антибіотика співпали зі змінами, що спостерігались за дії корвітину. (рис. 1А). Слід зазначити, що доксициклін має багатозаміщене фенольне кільце з багатьма гідроксильними групами, тобто за будовою він частково схожий з антиоксидантом кверцетином, що є діючою речовиною корвітину. Така структура може бути ключем до здатності доксицикліну нейтралізувати вільні радикали. Було показано, що реакція фенольного кільця з вільним радикалом породжує фенольний радикал, який стає відносно стабільним і неактивним [21]. Саме цим пояснюється знайдене нами повернення до нормальних значень рівня ТБКАР у цитозольній фракції під дією високих доз доксицикліну.

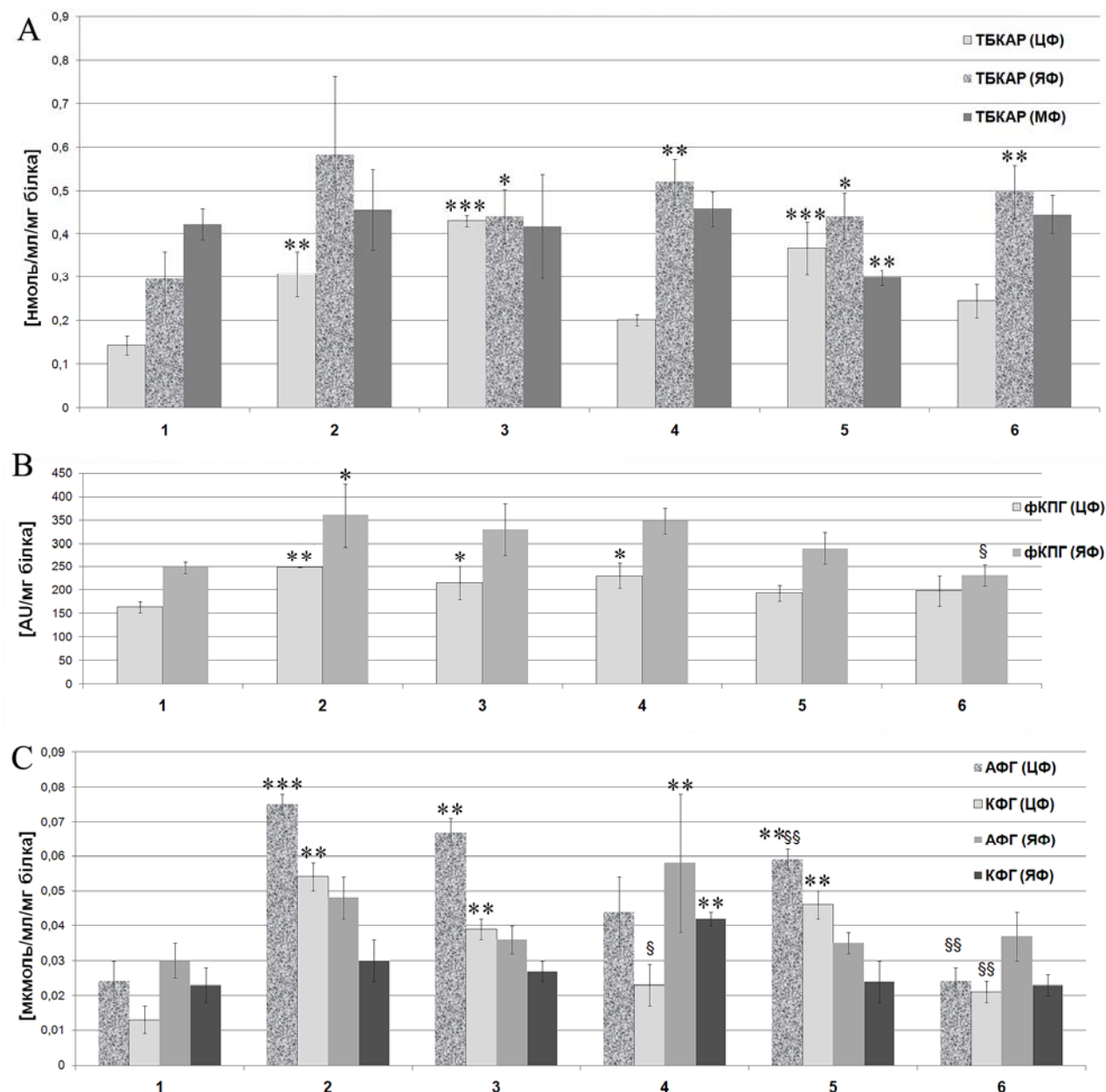


Рис. 1. Рівень ТБКАР (А), фКПГ (Б) та показники ОМБ (С) у субклітинних фракціях серця за впливу доксицикліну та антиоксидантів ($M \pm m$, $n = 10$)

1 – контрольна група, 2 – щури з ПІУМ; 3 – ПІУМ + Д1, 4 – ПІУМ + Д2; ПІУМ + АГ; ПІУМ + К; АФГ – альдегідфенілгідразони, КФГ – кетонфенілгідразони, фКПГ – кінцеві продукти глікації; ЦФ – цитозольна, ЯФ – ядерна, МФ – мітохондріальна фракції; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ – щодо групи контролю; § $p \leq 0,05$, §§ $p \leq 0,01$ – щодо групи з ПІУМ.

Підсумовуючи результати дослідження, можна зробити такі висновки. Доксициклін проявляє кардіопротекторну дію у щурів з пітуїтрин-ізадриним ушкодженням міокарда, знижуючи утворення продуктів окисної та карбонільної модифікації білків і активуючі ферменти антиоксидантного захисту, передусім глутатіонпероксидазу. Ефект дії доксицикліну залежить від дози: в дозі 4,2 мг/кг він має більш виражені антиоксидантні властивості, ніж у разі застосування дози 16,8 мг/кг, причому ефекти його низьких доз порівнянні або перевищують такі за дії аміногуанідину і корвітіну. Згідно з отриманими результатами, доксициклін може бути перспективним препаратом для лікування постінфарктної серцевої недостатності.

Список використаних джерел:

1. Фармакологическая коррекция нарушений в сопряженных системах NO-свободные тиолы при экспериментальном инфаркте миокарда с помощью метаболитотропного кардиопротектора "лизиний" / И. Ф. Беленичев, Л. И. Кучеренко и др. // Экспериментальная и клиническая физиология и биохимия. – 2012. – № 2. – С. 7–11.
2. Грабовецкая Е. Активность ферментов утилизации альдегидов в сердце крыс разного возраста при иммобилизационном стрессе / Е. Р. Грабовецкая, В. В. Давыдов // Укр. біохім. журн. – 2009. – Т. 81, № 1. – С. 99–104.
3. Давыдов В. Карбонильный Стресс как неспецифический фактор патогенеза / В. В. Давыдов, А. И. Божков // Журн. НАМН України. – 2014. – Т. 20, № 1. – С. 25–34.
4. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод ее определения / Е. Е. Дубинина, С. О. Бурмистров, Д. А. Ходов и др. // Вопросы мед. химии. – 1995. – Т. 41, № 1. – С. 24–26.
5. Егорова М. Выделение митохондрий из клеток и тканей животных и человека: современные методические примеры / М. В. Егорова,

- C. A. Afanas'ev // Сибирский мед журнал. – 2011. – Т. 26, № 1, Вып 1. – С. 22–28.
6. Коваленко В. Серцево-судинні хвороби: медично-соціальне значення та стратегія розвитку кардіології в Україні / В. М. Коваленко, А. П. Дорогой // Український кардіологічний журнал. – 2016. – Дод. 3. – С. 5–13.
7. Влияние цитозольной фракции кардиомиоцитов и липополисахарида на функцию моноцитов / В. Г. Матвеева, А. С. Головкин, М. Н. Чернова, И. В. Кудрявцев и др. // Медицинская иммунология. – 2013. – Т. 15, № 5. – С. 439–448.
8. Біохімічні та біофізичні методи оцінки порушень окислювального гомеостазу в осіб, що зазнали радіаційного впливу внаслідок аварії на ЧАЕС / Л. М. Овсяннікова, С. М. Альохіна, О. В. Дробінська та ін. // Методичні рекомендації. – К.: Вид. "Чорнобильінтерінформ". – 1999. – 18 с.
9. Ткаченко В. Вплив еплеренону на фізіологічні параметри та ступінь карбонільно-окислювального стресу у щурів з експериментальним ушкодженням міокарда / В. А. Ткаченко // Український біофармацевтичний журнал. – 2018. – № 2. – С. 4–12.
10. Федоров С. В. Корекція ендогенної інтоксикації при серцевій недостатності / С. В. Федоров // Світ медицини та біології. – 2014. – № 4(47). – С. 66–68.
11. Шарафеев А. Реперфузионные повреждения при остром инфаркте миокарда / А. Шарафеев, В. А. Баязитова // Дневник Казанской медицинской школы, Клиническая и экспериментальная медицина. – 2017. – Вып. 4(16). – С. 49–54.
12. Спосіб визначення флуоресціюючих кінцевих продуктів глікації у плазмі крові. Пат. 116929 UA, МПК G 01 N 1/00, 21/39, 21/64, 33/49 / А. І. Шевцова, В. А. Ткаченко, О. А. Коваль та ін. // Заявл. 21.12.2016; опубл. 12.06.2017, Бюл. № 11.
13. Quercetin as a finer substitute to aminoguanidine in the inhibition of glycation products / J. Ashraf, U. Shahab, S. Tabrez et al. // Int J Biol Macromol. – 2015. – Vol. 77. – P. 188–92. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2015.03.021.
14. Catalase, at target of glycation damage in rat liver mitochondria with aging / H. Bakala, M. Hamelin, J. Mary et al. // Biochim Biophys Acta. – 2012. – Vol. 1822(10). – P. 1527–34.
15. L-NAME improves doxycycline and ML-7 cardioprotection from oxidative stress / I. Bil-Lula, A. Krzywonos-Zawadzka, J. Sawicka et al. // Front Biosci (Landmark Ed). – 2018. – Vol. 23. – P. 298–309.
16. Bradford M. M. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M. M. Bradford // Analytical Biochemistry. – 1976. – Vol. 72. – P. 248–254.
17. Combined subthreshold dose inhibition of myosin light chain phosphorylation and MMP-2 activity provides cardioprotection from ischemic/reperfusion injury in isolated rat heart / V. Cadete, J. Sawicka, L. Bekar, G. Sawicki // Br. J. Pharmacol. – 2013. – Vol. 170(2). – P. 380–90. doi: 10.1111/bph.12289.
18. Early short-term doxycycline therapy in patients with acute myocardial infarction and left ventricular dysfunction to prevent the ominous progression to adverse remodeling: the TIPTOP trial / G. Cerisano, P. Buonamici, R. Valenti et al. // Eur Heart J. – 2014. – Vol. 35(3). – P. 184–91. doi: 10.1093/eurheartj/ehu240.
19. Protective outcomes of low-dose doxycycline on renal function of Wistar rats subjected to acute ischemia/reperfusion injury / A. Cortes, S. Gonzalez, L. Rioja et al. // Biochim Biophys Acta. – 2018. – Vol. 1864(1). – P. 102–114. doi: 10.1016/j.bbdis.2017.10.005.
20. Csányi G. Oxidative Stress in Cardiovascular Disease / G. Csányi, F. J. Jr. Miller // International Journal of Molecular Sciences. – 2014. – Vol. 15(4). – P. 6002–6008. doi:10.3390/ijms15046002.
21. Hepatoprotective and anti-tumor effects of targeting MMP-9 in hepatocellular carcinoma and its relation to vascular invasion markers / M. Elewa, M. Al-Gayyari, M. Schaalan et al. // Clin Exp Metastasis. – 2015. – Vol. 32(5). – P. 479–93. doi: 10.1007/s10585-015-9721-6.
22. Effects of Doxycycline on Cx43 Distribution and Cardiac Arrhythmia Susceptibility of Rats after Myocardial Infarction / Xi-zhen Fana, Hong-jun Zhu, Xu Wu, Ji Yan et al. // Iranian Journal of Pharmaceutical Research. – 2014. – Vol. 13(2). – P. 613–621. PMID: PMC4157037.
23. Curcumin Mediated Attenuation of Carbofuran Induced Oxidative Stress in Rat Brain [Electronic resource] / S. Jaiswal, A. Sharma, K. Vivek et al. // Biochemistry Research International. – 2016. – Vol. 2016, № 7637931. – 7 p. – Access mode : <http://dx.doi.org/10.1155/2016/7637931>.
24. Kazimiro V. Antioxidant system and its functioning in the human body / V. K. Kazimiro, V. I. Maltsev // Healthy Ukraine. – 2006. – Vol. 98. – P. 21–24.
25. Marin-Garcia J. Mitochondria in heart failure: the emerging role of mitochondrial dynamics / J. Marin-Garcia, A. Akhmedov, G. Moe // Heart Fail Rev. – 2013. – Vol. 18(4). – P. 439–56. doi: 10.1007/s10741-012-9330-2.
26. Aminoguanidine inhibits ventricular fibrosis and remodeling process in isoproterenol-induced hypertrophied rat hearts by suppressing ROS and MMPs / A. Parthasarathy, V. Gopi, K. Devi, N. Balaji et al. // Life sci. – 2014. – Vol. 118(1). – P. 15–26. doi: org/10.1016/j.lfs.2014.09.030.
27. Therapeutic potential of quercetin as a cardiovascular agent / R. Patel, B. Mistry, S. Shinde, R. Syed et al. // Eur J Med Chem. – 2018. – Vol. 155. – P. 889–904. doi: 10.1016/j.ejmech.2018.06.053.
28. Sawyer D. Mitochondrial oxidative stress in heart failure: "oxygen wastage" revisited / D. Sawyer, W. Colucci // Circ Res. – 2000. – Vol. 86(2). – P. 119–20. PMID:10666404.
29. Smith J. Protective effects of doxycycline in mesenteric ischemia and reperfusion / J. Smith, W. Gabler // Res Commun Mol Pathol Pharmacol. – 1995. – Vol. 88(3). – P. 303–15. PMID:8564386.
30. Induction of Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Damage by Antibiotic Drug Doxycycline Enhances the Responsiveness of Glioblastoma to Chemotherapy / Q. Tan, X. Yan, L. Song, H. Yi et al. // Med Sci Monit. – 2017. – Vol. 23. – P. 4117–4125. PMID: 28842551. PMID: PMC5584825.
31. The cardio- and neuroprotective effects of Corvitan and 2-oxoglutarate in rats with pituitrin-isoproterenol-induced myocardial damage [Electronic resource] / V. Tkachenko, Y. Kovalchuk, N. Bondarenko et al. // Hindawi. – 2018. – № 9302414. – Access mode : <https://www.hindawi.com/journals/bri/ai/p/9302414/>
32. Chronic doxycycline exposure accelerates left ventricular hypertrophy and progression to heart failure in mice after thoracic aorta constriction / L. Vinet, P. Rouet-Benzineb, X. Marniquet, N. Pellegrin et al. // Am J Physiol Heart Circ Physiol. – 2008. – Vol. 295(1). – P. H352-60. doi:10.1152/ajpheart.01101.2007.
33. The role of advanced glycation end-products and their receptor on outcome in heart failure patients with preserved and reduced ejection fraction / S. Willemsen, J. Hartog, D. Veldhuisen, A. Voors // American heart journal. – 2012. – Vol. 164(5). – P. 742–749. e3. doi:10.1016/j.ahj.2012.07.027.
34. Inhibitors of Advanced Glycation End Products (AGEs): Potential Utility for the Treatment of Cardiovascular Disease / S. Yamagishi, K. Nakamura, T. Matsui et al. // Cardiovascular Therapeutics. – 2008. – Vol. 26. – P. 50–58. doi: 10.1111/j.1527-3466.2007.00038.x.
35. Enhancement of glyoxalase 1, a polyfunctional defense enzyme, by quercetin in the brain in streptozotocin-induced diabetic rats / X. Zhu, Y. Cheng, Q. Lu et al. // Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol. – 20018. doi: 10.1007/s00210-018-1543-z. PMID: 30062553.
36. Doxycycline inhibits proliferation and induces apoptosis of both human papillomavirus positive and negative cervical cancer cell lines / Y. Zhao, X. Wang, L. Li, C. Li // Can J Physiol Pharmacol. – 2016. – Vol. 94(5). – P. 526–33. doi: 10.1139/cjpp-2015-0481.
37. Doxycycline ameliorates aggregation of collagen and atrial natriuretic peptide in murine post-infarction heart / H. Zhu, X. Sun, D. Wang et al. // Eur J Pharmacol. – 2015. – Vol. 754. – P. 66–72. doi: 10.1016/j.ejphar.2015.02.026.

References:

15. Bil-Lula I., Krzywonos-Zawadzka A., Sawicka J., Bialy D. et al. L-NAME improves doxycycline and ML-7 cardioprotection from oxidative stress. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2018;23:298–309.
16. Bradford M. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M. M. Bradford // *Analytical Biochemistry*. 1976;72:248–254.
17. Cadete V., Sawicka J., Bekar L., Sawicki G. Combined subthreshold dose inhibition of myosin light chain phosphorylation and MMP-2 activity provides cardioprotection from ischaemic/reperfusion injury in isolated rat heart. *Br J Pharmacol*. 2013;170(2):380–90. doi: 10.1111/bph.12289.
18. Cerisano G., Buonamici P., Valenti R., Sciagra R. et al. Early short-term doxycycline therapy in patients with acute myocardial infarction and left ventricular dysfunction to prevent the ominous progression to adverse remodelling: the TIPTOP trial. *Eur Heart J*. 2014; 35(3):184–91. doi: 10.1093/eurheartj/ehu420.
19. Cortes A., Gonsalez S., Rioja L., Oliveira S. et al. Protective outcomes of low-dose doxycycline on renal function of Wistar rats subjected to acute ischemia/reperfusion injury. *Biochim Biophys Acta*. 2018; 1864(1):102–114. doi: 10.1016/j.bbdis.2017.10.005
20. Csányi G., Miller F. Oxidative Stress in Cardiovascular Disease. *International Journal of Molecular Sciences*. 2014;15(4):6002–6008. doi:10.3390/ijms15046002.
21. Elewa M., Al-Gayyar M., Schaal M., Abd El Galil K. et al. Hepatoprotective and anti-tumor effects of targeting MMP-9 in hepatocellular carcinoma and its relation to vascular invasion markers. *ClinExp Metastasis*. 2015;32(5):479–93. doi: 10.1007/s10585-015-9721-6.
22. Xi-zhen Fana, Hong-jun Zhu, Xu Wu, Ji Yan, Jian Xu, De-guo Wang. Effects of Doxycycline on Cx43 Distribution and Cardiac Arrhythmia Susceptibility of Rats after Myocardial Infarction. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 2014;13(2):613–621. PMID: PMC4157037
23. Jaiswal S., Sharma A., Vivek K., Singh R., Sharma B. Curcumin Mediated Attenuation of Carbofuran Induced Oxidative Stress in Rat Brain. *Biochemistry Research International*. 2016;2016:7637931. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/7637931>.
24. Kazimiro V., Maltsev V. Antioxidant system and its functioning in the human body. *Health Ukraine*. 2006;98:21–24.
25. Marin-Garcia J., Akhmedov A., Moe G. Mitochondria in heart failure: the emerging role of mitochondrial dynamics. *Heart Fail Rev*. 2013;18(4):439–56. doi: 10.1007/s10741-012-9330-2.
26. Parthasarathy A., Gopi V., Devi K. et al. Aminoguanidine inhibits ventricular fibrosis and remodeling process in isoproterenol-induced hypertrophied rat hearts by suppressing ROS and MMPs. *Life sci*. 2014;118(1):15–26. doi.org/10.1016/j.lfs.2014.09.030.
27. Patel R., Mistry B., Shinde S., Syed R. et al. Therapeutic potential of quercetin as a cardiovascular agent. *Eur J Med Chem*. 2018;155:889–904. doi: 10.1016/j.ejmech.2018.06.053.
28. Sawyer D., Colucci W. Mitochondrial oxidative stress in heart failure: "oxygen wastage" revisited. *Circ Res*. 2000;86(2):119–20. PMID:10666404
29. Smith J., Gabler W. Protective effects of doxycycline in mesenteric ischemia and reperfusion. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*. 1995;88(3):303–5. PMID:8564386.
30. Tan Q., Yan X., Song L., Yi H., Li P. et al. Induction of Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Damage by Antibiotic Drug Doxycycline Enhances the Responsiveness of Glioblastoma to Chemotherapy. *Med Sci Monit*. 2017;23:4117–4125. PMID: 28842551. PMID: PMC5584825.
31. Tkachenko V., Kovalchuk Y., Bondarenko N. et al. The cardio- and neuroprotective effects of Corvitiin and 2-oxoglutarate in rats with pituitrin-isoproterenol-induced myocardial damage. *Hindawi*. 2018; 9302414. <https://www.hindawi.com/journals/bri/aip/9302414/>
32. Vinet L., Rouet-Benzineb P., Marquet X., Pellegrin N. et al. Chronic doxycycline exposure accelerates left ventricular hypertrophy and progression to heart failure in mice after thoracic aorta constriction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008;295(1):H352–60. doi:10.1152/ajpheart.01101.2007.
33. Willemsen S., Hartog J., Veldhuisen D., Voors A. The role of advanced glycation end-products and their receptor on outcome in heart failure patients with preserved and reduced ejection fraction. *American heart journal*. 2012;164(5):742–749.e3. doi: 10.1016/j.ahj.2012.07.027.
34. Yamagishi S. Inhibitors of Advanced Glycation End Products (AGEs): Potential Utility for the Treatment of Cardiovascular Disease / S. Yamagishi, K. Nakamura, T. Matsui et al. // *Cardiovascular Therapeutics*. 2008;26:50–58. doi: 10.1111/j.1527-3466.2007.00038.x.
35. Zhu X., Cheng Y., Lu Q. et al. Enhancement of glyoxalase 1, a polyfunctional defense enzyme, by quercetin in the brain in streptozotocin-induced diabetic rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 20018. doi: 10.1007/s00210-018-1543-z. PMID:30062553.
36. Zhao Y., Wang X., Li L., Li C. Doxycycline inhibits proliferation and induces apoptosis of both human papillomavirus positive and negative cervical cancer cell lines. *Can J Physiol Pharmacol*. 2016;94(5):526–33. doi: 10.1139/cjpp-2015-0481.
37. Zhu H., Sun X., Wang D., Hu N., Zhang Y. Doxycycline ameliorates aggregation of collagen and atrial natriuretic peptide in murine post-infarction heart. *Eur J Pharmacol*. 2015;754:66–72. doi: 10.1016/j.ejphar.2015.02.026.

Надійшла до редколегії 15.08.2018

Отримано виправлений варіант 17.09.2018

Підписано до друку 17.09.2018

Received in the editorial 15.08.2018

Received a revised version on 17.09.2018

Signed in the press on 17.09.2018

В. Ткаченко, препод., А. Шевцова, д-р биол. наук, проф.
 ГУ "Днепропетровская медицинская академия МОЗ Украины", Днепро, Украина

ИЗМЕНЕНИЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КАРБОНИЛЬНО-ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА У КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИШЕМИЕЙ МИОКАРДА ПОД ВЛИЯНИЕМ ДОКСИЦИКЛИНА

Ишемическая болезнь сердца (ИБС) во всем мире является наиболее серьезным заболеванием, которое сопровождается осложнениями и часто приводит к смерти. Несмотря на большое количество исследований, биохимические механизмы возникновения ИБС и процесса постинфарктного ремоделирования миокарда до конца не выяснены. Карбонильно-оксидативный стресс (КОС) рассматривается как важный участник развития и прогрессирования осложнений у пациентов ИБС, поэтому перспективным направлением является поиск терапевтических мероприятий, направленных на обезвреживание промежуточных и конечных продуктов КОС. Среди таких препаратов рассматриваются антиоксиданты флавоноидной структуры, а также ингибиторы процессов карбонилирования и гликации белков. В последнее время появились исследования, посвященные кардиопротекторным эффектам антибиотика тетрациклинового ряда доксициклина (ДЦ), в которых доказана его роль как ингибитора процессов протеолиза. В то же время наличие многозамещенного фенольного кольца в молекуле ДЦ может способствовать обезвреживанию свободных радикалов. В данной статье проведен сравнительный анализ влияния малых (4,2 мг/кг) и больших (16,8 мг/кг) доз ДЦ с эффектами классических антиоксидантов корвитина и аминогуанидина на показатели КОС и активность ферментов антиоксидантной защиты в крови и субклеточных фракциях сердца крыс с экспериментальной ишемией миокарда, индуцированной комбинированным введением питуитрина и изадрина. Установлено, что ДЦ проявляет кардиопротекторные свойства, снижая образование продуктов карбонильной и окислительной модификации биомолекул ТБК-активных веществ, флуоресцирующих конечных продуктов гликации (фКПГ) альдегидфенилгидразонов (АФГ) и кетонфенилгидразонов (КФХ), причем более выраженный эффект наблюдается при действии низких доз этого препарата. Одновременно ДЦ активирует ферменты антиоксидантной защиты, в первую очередь, глутатионпероксидазы. Эффекты низких доз ДЦ сопоставимы или превышают действие аминогуанидина и корвитина, что определяет перспективность использования ДЦ в лечении постинфарктной сердечной недостаточности.

Ключевые слова: карбонильно-оксидативный стресс, антиоксидантная система, доксициклин, питуитрин-изадриновое повреждение миокарда.

V. Tkachenko, assist., A. Shevtsova, Dr. Sc. Prof.
 SI "Dnipropetrovsk Medical Academy of the Ministry of Health of Ukraine", Dnipro, Ukraine

CHANGES OF PARAMETERS OF CARBONYL-OXIDATIVE STRESS IN RATS WITH EXPERIMENTAL MYOCARDIAL ISCHEMIA UNDER THE INFLUENCE OF DOXYCYCLINE

Heart diseases, especially acute myocardial infarction (AMI), belong to the most severe illnesses that often lead to death. Despite a large number of studies, the biochemical mechanisms of AMI and post-infarction myocardial remodeling are poorly understood. Carbonyl-oxidative stress (COS) is one of the more important triggers of the post-infarction complications in these patients, so the neutralizing of the intermediates and final products of COS are a perspective direction in the treatment of AMI. Flavonoid antioxidants as well as inhibitors of carbonylation and glycation of proteins shown the cardioprotective effects but their use have some limitations. Recently, new studies have appeared concerning the cardioprotective action of the doxycycline (DC). This tetracycline antibiotic can inhibit matrix metalloproteinases and proteolysis in extracellular matrix. At the same time, the presence of a multiple-substituted phenol ring can provide the ability of DC to neutralize free

radicals, so we hypothesized that it can inhibit the COS. This article compares the effects of small (4,2 mg/kg) and of large (16.8 mg/kg) doses of DC with the effects of classical antioxidants, corvutin and aminoguanidine. The COS-markers and activity of antioxidant enzymes were determined in the blood and subcellular heart fractions of the rats with pituitrin-isoproterenol-induced myocardial damage. It has been established that DC exhibits cardioprotective properties, reducing the formation of products of carbonyl and oxidative modification of biomolecules TBA-active substances, fluorescent end products of glycation (fAGE), aldehyde phenylhydrazones (AFH) and ketone phenylhydrazones (CPH), and a more pronounced effect was shown for the low doses of this drug. Simultaneously, the DC activates enzymes of antioxidant protection, first of all, glutathione peroxidase. Effects of small doses of DC are comparable or exceed the action of aminoguanidine and corvutin, so DC can be useful in the treatment of postinfarction heart failure.

Key words: carbonyl-oxidative stress, antioxidant system, doxycycline, pituitrin-isoproterenol myocardial damage.

УДК 571.27

Є. Гурмач, асп., М. Рудик, канд. біол. наук,
В. Святецька, інж. 1-ї кат., Л. Сківка, д-р біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

ФУНКЦІОНАЛЬНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЦИРКУЛЮЮЧИХ ФАГОЦИТІВ ЩУРІВ ІЗ ГЛІОМОЮ С6

Гліоми – пухлини центральної нервової системи - являють собою гетерогенну групу новоутворень, що мають нейроектодермальне походження. Гліоми є найпоширенішими первинними пухлинами головного мозку і складають близько 80% усіх злоякісних новоутворень цієї локалізації. Ріст злоякісних гліом супроводжується формуванням глибокої локальної і системної імуносупресії, котра є відмітною характеристикою цього захворювання. На ранніх стадіях росту злоякісного новоутворення клітини гліоми виділяють численні хемокіни, цитокіни та інші біологічно активні медіатори, котрі сприяють інфільтрації пухлиної тканини клітинами імунної системи: резидентними мікрогліальними клітинами, а також рекрутованими з циркулюючої крові моноцитами, гранулоцитами, Т-клітинами, В-клітинами тощо. Найбільш значну частку серед імуніцитів у мікрооточенні злоякісних гліом складають пухлино-асоційовані фагоцити. Саме цим клітинам належить лідоюча роль у формуванні локальної імуносупресії. Тригерні чинники системної імуносупресії, а також взаємозв'язок між локальною та системною імуносупресією в умовах росту злоякісних гліом практично не досліджені і потребують поглибленого вивчення функціональних та фенотипових характеристик циркулюючих клітин імунної системи. Метою цієї роботи було визначити фенотипово-функціональні характеристики циркулюючих фагоцитів у щурів з гліомою С6. Метаболічні та фенотипові показники циркулюючих фагоцитів досліджували в динаміці росту пухлини. Встановлено, що на пізніх термінах росту пухлини асоціюються зі змінами функціональних характеристик як моно-, так і поліморфнонуклеарних фагоцитів периферичної крові: зниженням окисдативного метаболізму, посиленням фагоцитарної активності у поєднанні зі збільшенням експресії фенотипового маркера альтернативної поляризації CD206. Загалом, зазначені характеристики властиві альтернативно поляризованим фагоцитам, які можуть бути важливими чинниками системної імуносупресії за росту злоякісних гліом.

Ключові слова: циркулюючі фагоцити, гліома, реактивні форми кисню, фагоцитоз.

Вступ. Гліома є найбільш поширеною первинною пухлиною головного мозку з високим рівнем летальності: середня виживаність пацієнтів з цією онкологічною патологією становить 12–18 місяців [1, 2]. У пацієнтів з гліомою розвивається глибока локальна і генералізована імуносупресія, котра є відмітною характеристикою цього захворювання. Причинами локальної (в межах головного мозку) імуносупресії за умов розвитку гліоми вважають паракринну дію синтезованих пухлинними клітинами імуносупресивних цитокінів та простагландинів, котрі викликають функціональну поляризацію пухлино-асоційованих фагоцитів до проти-запального, пропухлинного фенотипу. Клітини імунної системи з таким функціональним профілем сприяють пухлинному ангіогенезу, підтримують життєздатність стовбурових пухлинних клітин, забезпечують формування лікарської резистентності злоякісного новоутворення [3]. Тригерні механізми і характер системної імуносупресії в умовах розвитку гліом практично не досліджені, оскільки цитокіновий профіль сироватки крові за розвитку цих злоякісних новоутворень найчастіше не відрізняється від такого у здоровому організмі. Виявлено значні порушення кількісних і функціональних характеристик Т-клітинної ланки імунореактивності: відносна кількість циркулюючих CD4+ Т-лімфоцитів знижена до показників, властивих хворим з набутим імунodefіцитом, а серед субпопуляцій значну частину становлять регуляторні Т-клітини [4]. Ще одним типовим критерієм системної імуносупресії за розвитку гліом є нейтрофілія. Збільшена частка циркулюючих нейтрофілів, а також збільшення кількісного співвідношення циркулюючих нейтрофілів і лім-

фоцитів (≥ 4) вважаються негативними прогностичними критеріями розвитку цього захворювання [5, 6]. Однак, функціональні властивості циркулюючих нейтрофілів за умов розвитку гліом не охарактеризовані. Істотних змін зазнають також кількісні характеристики циркулюючих моноцитів. Саме збільшення частки циркулюючих мононуклеарних фагоцитів з фенотипом незрілих клітин вважають однією з причин зростання кількості регуляторних Т-лімфоцитів, особливо на пізніх стадіях розвитку гліом [7]. При цьому дані стосовно функціонального профілю моноцитів периферичної крові в організмі з гліомою в літературі практично відсутні. Виявлено, що співкультивування моноцитів з клітинами гліоми *in vitro* спричиняє їх диференціювання на мієлоїдні супресорні клітини (Myeloid-Derived Suppressor Cells, MDSC). Зважаючи на відсутність змін цитокінового профілю у сироватці крові в умовах росту гліом, висловлюється припущення, що на ранніх стадіях росту злоякісного новоутворення циркулюючі фагоцити рекрутуються у ділянку пухлинного росту, де під впливом екзосом, що виділяються стовбуровими пухлинними клітинами, набувають пропухлинного функціонального профілю і далі повертаються у циркуляцію й ініціюють системну імуносупресію [8, 9].

Метою цієї роботи було визначити фенотипово-функціональні характеристики циркулюючих фагоцитів у щурів з гліомою С6.

Матеріали та методи досліджень. Дослідження проведені на білих нелінійних статевозрілих щурах масою 40–50 г розведення віварію ННЦ "Інституту біології та медицини" КНУ імені Тараса Шевченка. Після ран-

домізації за вагою тварини були поділені на дві групи по вісім тварин у кожній: 1 група – інтактні тварини, 2 група – тварини, яким перещеплювали пухлину. Усі дослідження на тваринах здійснювали згідно з нормами, визначеними законом України №3447-IV "Про захист тварин від жорстокого поводження" і норм, прийнятих в Європейській конвенції із захисту хребетних тварин, яких використовують для експериментальних і наукових цілей від 20.09.1985 [10].

Культуру клітин гліоми щурів С6 було отримано з Національного банку клітинних ліній людини та тварин при ІЕПОР ім. Р.Є. Кавецького НАН України. Клітини лінії гліоми щурів С6 культивували у культуральному пластику (Sarsted, Німеччина) у повному культуральному середовищі DMEM у CO₂-інкубаторі за С. Перещеплення гліоми С6 щурам робили після загальної анестезії із застосуванням в/ч кетаміну (0,1 мг/г тварини) і седазину (0,02 мг/г тварини) методом інтрацеребральної інюкації 50 мкл клітинної суспензії (500 тис. клітин на тварину) у праву тім'яну зону (передній ріг правого бокового шлуночку) на відстані 3 мм від для уникнення інтракраніальної кровотечі. Тваринам також безпосередньо перед операцією вводили 0,25 % маркаїну в дозі 0,04 мл/г для полегшення болю протягом 6–8 годин.

Як матеріал для дослідження функціональних характеристик циркулюючих фагоцитів використовували гепаринізовану периферичну кров щурів. Для оцінки функціональних показників методом проточної цитофлюориметрії досліджували продукцію реактивних форм кисню (РФК) та фагоцитарну активність, як фенотиповий маркер. Моноцити й гранулоцити ґейтували за прямим і бічним розсіюванням. Рівень експресії клітинами CD206 молекул оцінювали використовуючи специфічні первинні моноклональні антитіла (Becton Dickinson, США). Продукцію реактивних форм кисню (РФК) визначали з використанням дихлородигідрофлуоресцеїндиацетату (ДФХ-ДА) ("Sigma Aldrich", USA), який під дією РФК перетворюється на флуоресцентну похідну [11]. Рівень продукції РФК характеризували за інтенсивністю флуоресценції клітин. Фагоцитарну активність досліджували з використанням як об'єкт ендоситозу мічені флуоресцеїнізотіоціанатом клітини *S.aureus*. Розраховували відносну кількість фагоцитуючих клітин (коефіцієнт фагоцитозу) та кількість поглинутих мікробних клітин за рівнем флуоресценції фагоцита (фагоцитарний індекс).

Статистичну обробку результатів здійснювали методами варіаційної статистики з розрахунком середнього значення, середнього квадратичного відхилення (σ) та середньої квадратичної похибки (m). Для визначення вірогідної відмінності показників використовували *t*-критерій Стьюдента [12].

Результати та їх обговорення. Клітини імунної системи, особливо фагоцити, відіграють виключну роль у біології пухлинного росту і в активації протипухлинного

імунітету. Пухлино-асоційовані фагоцити формують імуносупресивне пухлинне мікрооточення і сприяють пухлинній прогресії. З іншого боку, саме фагоцити ініціюють реакції протипухлинного імунітету і з огляду на це є перспективним об'єктом для розробки таргетних методів імунотерапії онкологічної патології [13, 14, 15]. Як зазначено вище, ріст гліом супроводжується розвитком системної імуносупресії. При цьому взаємозв'язок між локальною і генералізованою імуносупресією практично недосліджений і потребує поглибленого вивчення функціональних характеристик циркулюючих клітин імунної системи. Як модель пухлинного росту нами була обрана гліома С6, оскільки ця перещеплювана пухлина головного мозку щурів найбільшою мірою відтворює біологічні властивості гліобластоми людини – високо агресивної форми злоякісних гліом, ріст якої супроводжується розвитком генералізованої імуносупресії [16]. Для оцінки функціональних характеристик циркулюючих фагоцитів у щурів з гліомою ми досліджували продукцію ними РФК, фагоцитарну активність та експресію рецептора CD206.

Посилення генерації РФК є однією з функціональних характеристик класично активованих фагоцитів (як моно-, так і поліморфнонуклеарних), які є дієвими ефекторними клітинами протипухлинного імунітету. Зниження рівня продукції РФК властиве протизапальному пропухлинному зсуву метаболізму фагоцитів [17]. З іншого боку, продукція РФК є одним з ключових імуносупресивних механізмів MDSC. Однак при цьому активація синтезу РФК MDSC зазвичай асоційована з протизапальним зсувом метаболізму цих клітин, наприклад, з посиленням синтезу аргінази І, яка має імуносупресивні властивості [6, 18]. З огляду на те, що згідно з літературними даними [7] РФК-продукуючі MDSC та інші гліома-асоційовані фагоцити з'являються у циркуляції організму з гліомою під час росту злоякісного новоутворення, ми дослідили оксидативний метаболізм моно- та поліморфнонуклеарних фагоцитів периферичної крові щурів в динаміці росту гліоми С6 (на 14 та 24 добу після інюкації пухлинних клітин). За результатами наших досліджень, на 14 добу пухлинного росту показник оксидативного метаболізму циркулюючих гранулоцитів у щурів з гліомою був незначно підвищений порівняно з інтактними тваринами (рис. 1А). Рівень синтезу РФК мононуклеарними фагоцитами периферичної крові тварин-пухлиноносіїв не відрізнявся від такого у інтактних тварин. На більш пізній стадії росту пухлини ми зареєстрували статистично вірогідне зниження рівня генерації РФК як гранулоцитами, так і моноцитами периферичної крові щурів з гліомою (рис. 1Б). Таким чином, істотні зміни функціональних характеристик циркулюючих фагоцитів спостерігаються на пізніх стадіях росту гліоми С6.

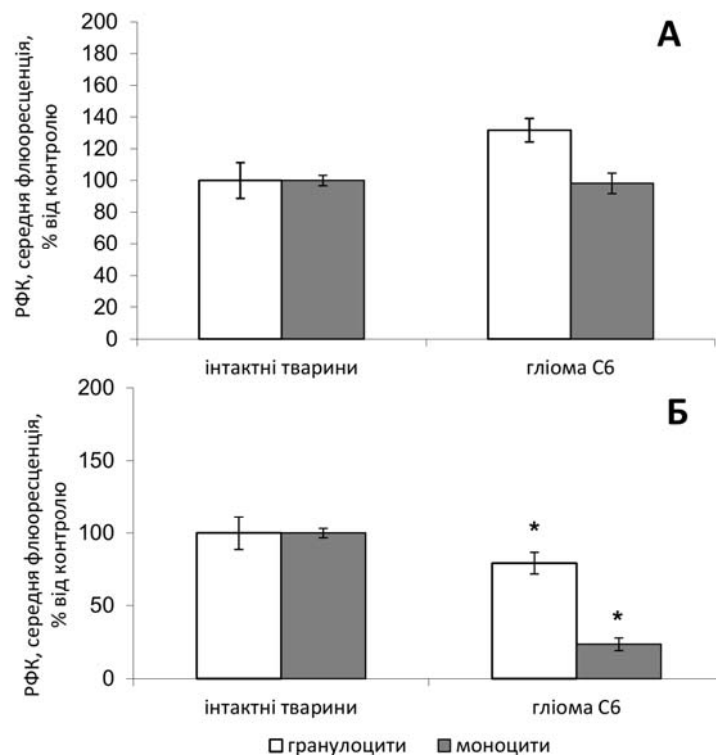


Рис. 1. Продукція реактивних форм кисню циркулюючими фагоцитами щурів на 14 добу (А) та 24 добу (Б) після перещеПЛення гліоми С6 (n = 8 у всіх групах)

* – $p < 0,05$ стосовно показників інтактних щурів. Результати представлені як відсоток від відповідного показника інтактних тварин.

Фагоцитарна активність є однією з найважливіших функцій як моноцитів, так і гранулоцитів. Ендоцитоз властивий фагоцитам прозапальної функціональної спрямованості і клітинам з протизапальним метаболічним профілем. Однак посилення фагоцитарної функції характерне для альтернативної метаболічної поляри-

зації фагоцитів і особливо притаманне фагоцитам з пропухлинною активністю [19]. За результатами наших досліджень, на 24 добу пухлинного росту спостерігалось статистично вірогідне збільшення частки фагоцитуючих поліморфно- та мононуклеарних мієлоїдних клітин у периферичній крові щурів з гліомою С6 (рис. 2).

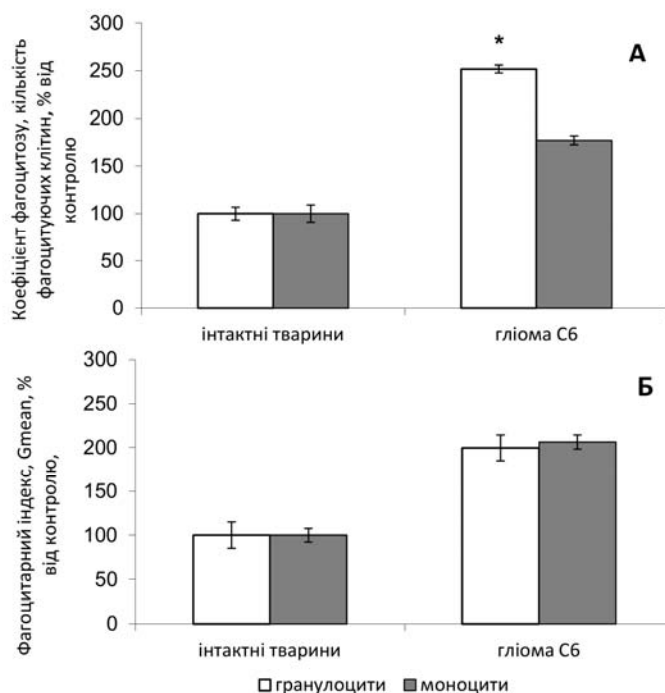


Рис. 2. Коефіцієнт фагоцитозу (А) та фагоцитарний індекс (Б) циркулюючих фагоцитів щурів з гліомою С6. (n = 8 у всіх групах)

* – $p < 0,05$ стосовно показників інтактних щурів. Результати представлені як відсоток від відповідного показника інтактних тварин.

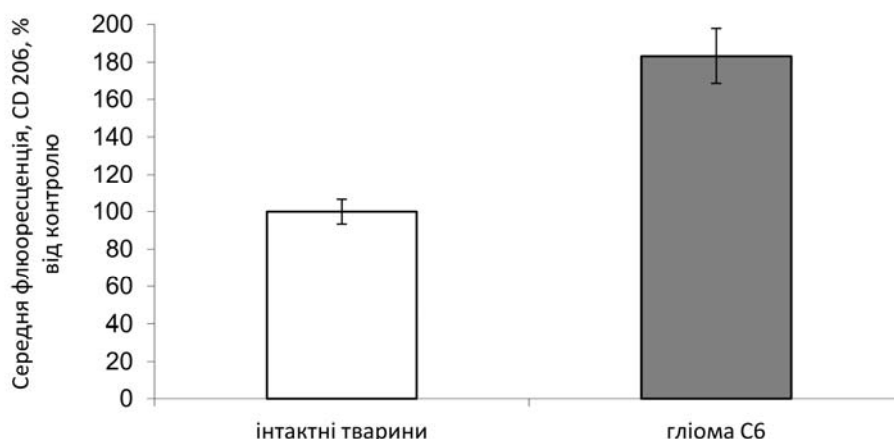


Рис. 3. Експресія CD206 циркулюючими фагоцитами щурів із гліомою C6 (n = 8 у всіх групах)

Результати виражені як відсоток від кожного контролю.

Одним із рецепторів мієлоїдних клітин, залучених у фагоцитарну функцію, є рецептор CD206. Цей рецептор є одним із загально визнаних фенотипових маркерів аальтернативної (пропухлинної) метаболічної поляризації фагоцитів різних популяцій [13]. Крім того, підвищена експресія CD206 властива MDSC [20]. Згідно з результатами наших досліджень, рівень експресії CD206 циркулюючими фагоцитами щурів з гліомою C6 на 24 добу пухлинного росту статистично вірогідно перевищував аналогічний показник у інтактних тварин (рис. 3).

Висновок. Пізні стадії гліоми C6 у щурів асоціюються зі змінами функціональних характеристик моноцитарно-лімфоцитарних фагоцитів периферичної крові: зниженням окислювального метаболізму, посиленням фагоцитарної активності у поєднанні зі збільшенням експресії фенотипового маркера альтернативної (пропухлинної) поляризації CD206. У сукупності зазначені характеристики властиві альтернативно поляризованим фагоцитам, які можуть бути основним джерелом формування системної імуносупресії за розвитку злоякісних гліом.

Список використаних джерел:

1. Epidemiology of Intracranial Gliomas / Q. Ostrom, H. Gittleman, L. Stetson et al. // *Prog. Neurol. Surg.* – 2018. – Vol. 30. – P. 1–11.
2. Multiple high-grade gliomas: epidemiology, management, and outcome. A systematic review and meta-analysis / D. Di Carlo, F. Cagnazzo, N. Benedetto et al. // *Neurosurg. Rev.* – 2017.
3. Mangani D. The network of immunosuppressive pathways in glioblastoma / D. Mangani, M. Weller, P. Roth // *Biochem. Pharmacol.* – 2017. – Vol. 130. – P. 1–9.
4. Gustafson M. Systemic immune suppression in glioblastoma: the interplay between CD14+HLA-DR^{lo}/neg monocytes, tumor factors and dexamethasone / M. Gustafson, Y. Lin, K. New // *Neuro. Oncol.* – 2010. – Vol. 12. – P. 631–644.
5. Neutrophilia as a biomarker for overall survival in newly diagnosed high-grade glioma patients undergoing chemoradiation / A. Schernberg, A. Nivet, F. Dhermain et al. // *Clin. Transl. Radiat. Oncol.* – 2018. – Vol. 10. – P. 47–52.
6. Neutrophils in Gliomas / Matteo Massara, Pasquale Persico, Ornella Bonavita et al. // *Front Immunol.* – 2017. – Vol. 8. – P. 1349.
7. Cells Immunosuppression of Glioma Stem Cell-Derived Exosomes Is Mediated by Monocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells / R. Domenis, D. Cesselli, B. Toffoletto et al. // *PLoS One.* – 2017. – Vol. 12, № 1:e0169932.
8. Increasing glioma-associated monocytes leads to increased intratumoral and systemic myeloid-derived suppressor cells in a murine model / M. Chae, T. Peterson, A. Balgeman et al. // *NeuroOncol.* – 2015. – Vol. 17, № 7. – P. 978–991.
9. Systemic T Cells Immunosuppression of Glioma Stem Cell-Derived Exosomes Is Mediated by Monocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells

/ R. Domenis, D. Cesselli, B. Toffoletto et al. // *PLoS One.* – 2017. – Vol. 12, № 1:e0169932.

10. Резников О. Проблеми етики при проведенні експериментальних медичних і біологічних досліджень на тваринах / О. Резников // *Вісн. НАН України.* – 2001. – № 1. – С. 5–7.

11. Classen Andrea. Macrophage Activation: Classical Vs. Alternative / Andrea Classen // *Macrophages and Dendritic Cells. Methods and Protocols.* – New York : Humana press. – 2009. – P. 29–43.

12. Реброва О. Ю. Статистический анализ медицинских данных / О. Ю. Реброва. – М. : Медиа Сфера. – 2002. – С. 312.

13. Mantovani A. Tumor-associated macrophages as a paradigm of macrophage plasticity, diversity, and polarization: lessons and open questions / A. Mantovani, M. Locati // *Arterioscler. Thromb. Vasc Biol.* – 2013. – Vol. 33, № 7. – P. 1478–83.

14. Petty A. Tumor-associated macrophages: implications in cancer immunotherapy / A. Petty, Y. Yang // *Immunotherapy.* – 2017. – Vol. 9, № 3. – P. 289–302.

15. Suyang Hao. Detection of immune suppressive neutrophils in peripheral blood samples of cancer patients / Hao Suyang, Mary Andersen, Hongbo Yu. *Am J. Blood Res.* – 2013. – Vol. 3, № 3. – P. 239–245.

16. Grobden B. Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion / B. Grobden, P. De Deyn, H. Slegers // *Cell Tissue Res.* – 2002. – Vol. 10, № 3. – P. 257–70.

17. Mills C. Anatomy of adiscovery: m1 and m2 macrophages. *Front. Immunol.* / C. Mills. – 2015. – Vol. 6. – P. 212.

18. Mechanism regulating reactive oxygen species in tumor-induced myeloid-derived suppressor cells / C. Corzo, M. Cotter, P. Cheng et al. // *J. Immunol.* – 2009. – Vol. 182, № 9. – P. 5693–701.

19. Modulation of macrophage antitumor potential by apoptotic lymphoma cells / J. Voss, C. Ford, S. Petrova et al. // *Cell Death Differ.* – 2017. – Vol. 24, № 6. – P. 971–983.

20. Tumor-infiltrating myeloid-derived suppressor cells are pleiotropically-inflamed monocytes/macrophages that bear M1- and M2-type characteristics / N. Umemura, M. Saio, T. Suwa et al. // *J. Leukoc. Biol.* – 2008. – Vol. 83, № 5. – P. 1136–44.

References:

1. Ostrom Q., Gittleman H., Stetson L., Virk S., Barnholtz-Sloan J. Epidemiology of Intracranial Gliomas. *Prog Neurol Surg.* 2018;30:1-11. doi: 10.1159/000464374
2. Di Carlo D., Cagnazzo F., Benedetto N., Morganti R., Perrini P. Multiple high-grade gliomas: epidemiology, management, and outcome. A systematic review and meta-analysis. *Neurosurg. Rev.* 2017. doi: 10.1007/s10143-017-0928-7
3. Mangani D., Weller M., Roth P. The network of immunosuppressive pathways in glioblastoma. *Biochem Pharmacol.* 2017;130:1-9. doi: 10.1016/j.bcp.2016.12.011
4. Gustafson M., Lin Y., New K. Systemic immune suppression in glioblastoma: the interplay between CD14+HLA-DR^{lo}/neg monocytes, tumor factors, and dexamethasone. *Neuro Oncol.* 2010;12(7):631-644.
5. Schernberg A., Nivet A., Dhermain F., Ammari S., Escande A., Pallud J., Louvel G., Deutsch E. Neutrophilia as a biomarker for overall survival in newly diagnosed high-grade glioma patients undergoing chemoradiation. *Clin Transl Radiat Oncol.* 2018;10:47-52. doi: 10.1016/j.ctro.2018.04.002
6. Matteo Massara, Pasquale Persico, Ornella Bonavita, Valeria Mollica Poeta, Massimo Locati, Matteo Simonelli, Raffaella Bonocchi. Neutrophils in Gliomas. *Front Immunol.* 2017;8:1349. doi: 10.3389/fimmu.2017.01349

7. Domenis R., Cesselli D., Toffoletto B., Bourkoulas E., Caponnetto F., Beltrami A., Lus T., Skrap M., Di Loreto C., Gri G. Systemic T Cells Immunosuppression of Glioma Stem Cell-Derived Exosomes Is Mediated by Monocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells. *PLoS One*. 2017;12(1):e0169932. doi: 10.1371/journal.pone.0169932
8. Chae M., Peterson T., Balgeman A., Chen S., Zhang L., Renner D., Johnson A., Parney I. Increasing glioma-associated monocytes leads to increased intratumoral and systemic myeloid-derived suppressor cells in a murine model. *Neuro Oncol*. 2015;17(7):978-91. doi: 10.1093/neuonc/nou343
9. Domenis R., Cesselli D., Toffoletto B., Bourkoulas E., Caponnetto F., Manini I., Beltrami A., Lus T., Skrap M., Di Loreto C., Gri G. Systemic T Cells Immunosuppression of Glioma Stem Cell-Derived Exosomes Is Mediated by Monocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells. *PLoS One*. 2017;12(1):e0169932. doi: 10.1371/journal.pone.0169932
10. Reznikov A. Problemy etiki pri provedenii eksperimental'nykh medicinskih i biologicheskikh issledovanii na zhivotnykh. *Vestn. NAN Ukrainy*. 2001;1:5-7. Russian.
11. Classen Andrea. Macrophage Activation: Classical Vs. Alternative. In: Reiner, Neil E., editors. *Macrophages and Dendritic Cells. Methods and Protocols*. New York: Humana press; 2009:29-43.
12. Rebrova O. Statisticheskij analys medicine danuch. *Media sfera*. 2002;312. Russian.
13. Mantovani A., Locati M. Tumor-associated macrophages as a paradigm of macrophage plasticity, diversity, and polarization: lessons and open questions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;33(7):1478-83.
14. Petty A., Yang Y. Tumor-associated macrophages: implications in cancer immunotherapy. *Immunotherapy*. 2017;9(3):289-302. doi: 10.2217/imt-2016-0135

15. Suyang Hao., Mary Andersen., Hongbo Yu. Am. Detection of immune suppressive neutrophils in peripheral blood samples of cancer patients. *J Blood Res*. 2013; 3(3):239-245.
16. Grobden B., De Deyn P., Slegers H. Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion. *Cell Tissue Res*. 2002;310(3):257-70.
17. Mills C. Anatomy of a discovery: m1 and m2 macrophages. *Front. Immunol*. 2015;6:212.
18. Corzo C., Cotter M., Cheng P., Cheng F., Kusmartsev S., Sotomayor E., Padhya T., Mc Caffrey T., Mc Caffrey J., Gabrilovich D. Mechanism regulating reactive oxygen species in tumor-induced myeloid-derived suppressor cells. *J Immunol*. 2009;182(9):5693-701. doi: 10.4049/jimmunol.0900092
19. Voss J.J., Ford C., Petrova S., Melville L., Paterson M., Pound J., Holland P., Giotti B., Freeman T., Gregory C. Modulation of macrophage antitumor potential by apoptotic lymphoma cells. *Cell Death Differ*. 2017;24(6):971-983. doi: 10.1038/cdd.2016.132
20. Umemura N., Saio M., Suwa T., Kitoh Y., Bai J., Nonaka K., Ouyang G., Okada M., Balazs M., Adany R., Shibata T., Takami T. Tumor-infiltrating myeloid-derived suppressor cells are pleiotropic-inflamed monocytes/macrophages that bear M1- and M2-type characteristics. *J Leukoc Biol*. 2008;83(5):1136-44. doi: 10.1189/jlb.0907611

Надійшла до редколегії 30.08.2018

Отримано виправлений варіант 1.10.2018

Підписано до друку 1.10.2018

Received in the editorial 30.08.2018

Received a revised version on 1.10.2018

Signed in the press on 1.10.2018

Е. Гурмач, асп., М. Рудик, канд. биол. наук,
В. Святецкая, инж. 1-й кат., Л. Скивка, д-р биол. наук
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ФАГОЦИТОВ КРЫС С ГЛИОМОЙ С6

Глиомы - опухоли центральной нервной системы – представляют собой гетерогенную группу новообразований, имеющих нейроэктодермальное происхождение. Глиомы являются наиболее распространенными первичными опухолями головного мозга и составляют около 80% всех злокачественных новообразований этой локализации. Рост злокачественных глиом сопровождается формированием глубокой локальной и системной иммуносупрессии, которая является отличительной характеристикой этого заболевания. На ранних стадиях роста злокачественного новообразования клетки глиомы выделяют многочисленные хемокины, цитокины и другие биологически активные медиаторы, которые способствуют инфильтрации опухолевой ткани клетками иммунной системы: резидентными микроглиальными клетками, а также рекрутированными из циркулирующей крови моноцитами, гранулоцитами, Т-клетками, В-клетками и т.п. Наиболее значительную часть среди иммунных клеток в микроокружении злокачественных глиом составляют опухоле-ассоциированные фагоциты. Именно этим клеткам принадлежит лидирующая роль в формировании локальной иммуносупрессии. Триггерные факторы системной иммуносупрессии, а также взаимосвязь между локальной и системной иммуносупрессией в условиях роста злокачественных глиом практически не исследованы и требуют углубленного изучения функциональных и фенотипических характеристик циркулирующих клеток иммунной системы. Целью настоящей работы было определить фенотипические и функциональные характеристики циркулирующих фагоцитов у крыс с глиомой С6. Метаболические и фенотипические показатели циркулирующих фагоцитов исследовали в динамике роста опухоли. Установлено, что поздние сроки роста опухоли ассоциируются с изменениями функциональных характеристик как моно-, так и полиморфноядерных фагоцитов периферической крови: снижением оксидативного метаболизма, усилением фагоцитарной активности в сочетании с увеличением экспрессии фенотипического маркера альтернативной поляризации CD206. В целом, указанные характеристики свойственны альтернативно поляризованным фагоцитам, которые могут быть важными факторами системной иммуносупрессии при росте злокачественных глиом.

Ключевые слова: циркулирующие фагоциты, глиома, реактивные формы кислорода, фагоцитоз.

Y. Hurmach, PhD stud., M. Rudyk, PhD,
V. Svyatetska, master, L. Skivka, DSc
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF CIRCULATING PHAGOCYTES IN RATS WITH C6 GLIOMA

Gliomas, tumors of the central nervous system, are a heterogeneous group of neoplasms of neuroectodermal origin. Gliomas are the most common primary brain tumors and comprise about 80% of all malignant neoplasms of this location. The growth of malignant glioma is accompanied by the development of local and systemic immunosuppression that is a distinctive characteristics of the disease. At the early stages of tumor growth, glioma cells secrete numerous chemokines, cytokines and other biologically active mediators that contribute to the infiltration of tumor tissue by immune cells: resident microglial cells, as well as monocytes, granulocytes, T-cells, B-cells etc. Tumor-associated phagocytes comprise most significant part of the immunocytes in the microenvironment of malignant gliomas. These cells play a leading role in the development of local immunosuppression. The triggers of systemic immunosuppression, as well as the relationship between local and systemic immunosuppression is virtually unexplored and requires an in-depth study of the functional characteristics of circulating cells of the immune system. The aim of this work was to determine the phenotypic and functional characteristics of circulating phagocytes in rats with C6 glioma. Metabolic and phenotypic indices of circulating phagocytes were examined at different time point of tumor growth. It has been established that the late stages of C6 glioma growth in rats are associated with changes in the functional characteristics of peripheral blood mono- and polymorphonuclear phagocytes: a decrease in oxidative metabolism, an increase in phagocytic activity along with an increase CD206 expression. Taken together these alteration are characteristic for alternatively activated phagocytes that can participate in the development of glioma-associated systemic immunosuppression.

Keywords: circulating phagocytes, glioma, reactive oxygen species, phagocytosis.

УДК 58.018+581.48

С. Ковтун-Водяницька, канд. біол. наук, наук. співроб.
Національний ботанічний сад імені М. М. Гришка НАН України, Київ, Україна

УЛЬТРАСКУЛЬПТУРА ЕРЕМІВ ПРЕДСТАВНИКІВ РОДУ *ISODON* (SCHRAD. EX BENTH.) SPACH (*LAMIACEAE* LINDL.)

Досліджено ультраскульптуру поверхні насінної шкірки еремів двох представників роду *Isodon* (Schrad. Ex Benth.) Spach з родини *Lamiaceae* Lindl. – *I. japonicus* (Burman) H. Nara та *I. japonicus* var. *glaucocalyx* (Maxim.) H. W. Li, інтродукованих в Національному ботанічному саду ім. М. М. Гришка НАН України (Правобережний Лісостеп). Представники роду поширені в азіатському регіоні з найбільшим видовим різноманіттям у Китаї; два види трапляються в тропічних областях Африки. Скринінг літературних іноземних джерел показав, що мікроскопічні дослідження еремів цих видів та різновидів не здійснювались, принаймні інформації з цього питання ми не виявили. Це спонукало нас дослідити макро- та мікро морфологію еремів. У роботі використовували СЕМ. Методично спиралась на відому роботу W. Barthlott. Описова частина задокументована фотографічно. У результаті експерименту виявлено особливості в морфології та структурі, спільні та відмінні ознаки еремів, надано морфологічні описання їхньої форми, забарвлення, первинної та вторинної скульптури спермодерми. Визначено, що для еремів виду і різновиду характерні різні типи зовнішнього рельєфу: для *I. japonicus* характерний щільно горбкуватий рельєф, а для *I. japonicus* var. *glaucocalyx* – нерегулярно-сітчастий. Також виявлено відмінності в будові зовнішніх периклінальних і антиклінальних стінок. Зовнішні периклінальні стінки виду опуклі, антиклінальні ввігнуті, а в різновиду – ввігнуті і виступаючі відповідно. Для спермодерми еремів *I. japonicus* var. *glaucocalyx* характерні наявність різних типів папіл в апікальній області та продихових клітин, значення та функція яких ще потребують додаткових досліджень. Виявлені відмінності в мікрорельєфі еремів можуть бути використані як допоміжні діагностичні ознаки на видовому таксономічному рівні для рослин роду *Isodon*, які отримані в умовах інтродукції з насіння системи Index Seminum.

Ключові слова: інтродуцент, *Isodon*, ереми, ультраскульптура.

Вступ. На сучасному етапі розвитку інтродукції рослин невід'ємним компонентом є морфологічні дослідження. Адже комплексний підхід в інтродукційних випробуваннях дозволяє надати всебічну характеристику рослині, як об'єкту наукового і прикладного використання. Особливо прискіпливого ставлення потребують рослини тих видів, які презентують зарубіжні флори і практично не відомі чи мало поширені на території України.

Рід *Isodon* (Schrad. ex Benth.) Spach родини *Lamiaceae* Lindl. майже в повному обсязі є представником азіатської флори з центром різноманіття в південно-західному Китаї, проте два види трапляються в тропічній Африці [1]. Види роду вважаються традиційними лікарськими рослинами в Китаї. Широко використовуються в народній медицині Японії та Кореї. Завдяки вмісту цілого ряду біологічно активних сполук (БАС) у надземній частині рослин, застосування сировини досить різнобічне: як антибактеріального, протипухлинного, протиалергічного, протизапального, гепатопротекторного, ларвіцидного і глистогінного засобу [2, 3].

Із доступних оприлюднених матеріалів, якими ми послуговувалися під час ознайомлення із рівнем дослідження видів роду *Isodon*, помічено, що тотальна їх кількість присвячена вивченню складу і структури БАС, з'ясуванні ступеню їх впливу на канцерогенні клітини. Також є публікації з питання сучасного погляду на філогенію роду *Isodon* в цілому. Щодо визначення особливостей морфології органів та їх частин, виконаних на мікроскопічному рівні, то на жаль публікацій з цієї тематики нами не виявлено. Зазначимо, що під час скринінгу літератури виникає певна плутанина, оскільки на сьогодні частина видів із роду *Plectranthus* L'Her віднесена до роду *Isodon*, тоді як із роду *Ocimum* L. – до роду *Plectranthus*. Окремі зарубіжні автори продовжують використовувати застарілі латинські власні назви рослин, тому в публікаціях, присвячених *Plectranthus* часто розглядаються види *Isodon* або ж навпаки – види роду *Ocimum*.

Для повноти інтродукційних досліджень двох представників роду *Isodon* – *I. japonicus* (Burman) H. Nara та *I. japonicus* var. *glaucocalyx* (Maxim.) H. W. Li, які здійснюються в Національному ботанічному саду ім. М. М. Гришка НАН України (НБС), ми вважали за доцільне дослідити макро- та мікроморфологію їхнього насіння.

Матеріали і методи. Для роботи використано насінний матеріал власної репродукції *I. japonicus* та

I. japonicus var. *glaucocalyx*, інтродукованих в НБС (Правобережний Лісостеп). Зазначимо, що сезонна ритміка розвитку цих видів та різновидів за інтродукції відрізняється від ритміки в природних місцезростаннях, а саме – квітання і плодоношення рослин в НБС відбувається пізніше на 1–1,5 місяця, восени. Ураховуючи чутливість цих рослин до низьких плюсових температур, у зв'язку з чим припиняється вегетація, отримання дозрілих ценобіїв є проблематичним. Попри це, останні кілька років різняться за характером кліматичних умов восени, що дозволило отримати незначну кількість виповненого насіння (еремів).

За мету під час досліджень ми мали наміри виявити та описати ознаки морфологічної будови ультраскульптури еремів *I. japonicus* і *I. japonicus* var. *glaucocalyx* і визначити їх діагностичну значущість як допоміжну для ідентифікації цих таксонів.

Морфологічні дослідження особливостей еремів виконано з допомогою приладів – біокуляру МБС-9 та сканувального (растрового) електронного мікроскопу (СЕМ) JSM-6060 LA. Вибірка кожного виду насіння дорівнювала 10. Для дослідження на електронному мікроскопі повітряно-сухі ереми попередньо кріпили на лапунний столик та напильовали у вакуумному напильовачі шаром золота.

Охарактеризовано розмір, форму, колір еремів кожного таксону. Для описання скульптури поверхні насінної шкірки послуговувалися класифікацією та термінологією W. Barthlott [4]. До уваги приймали первинну і вторинну скульптуру. Для описання первинної скульптури враховано загальну форму (абрис) клітин, рельєф їх сукупної поверхні, тип антиклінальних стінок, кривизна зовнішніх переклінальних стінок; для вторинної скульптури – морфологічні особливості спермодерми.

Результати та їх обговорення. *Isodon japonicus* (рис. 1). Ереми 1–1,3 мм завдовжки, округлої ниркоподібної форми, зеленкувато-сірого кольору. Поверхня насінної шкірки виразно скульптурована, рельєф щільногорбкуватий, горбики конічні, пласковершинні. Вентральна сторона дещо увігнута, мікропілярна зона відтягнута, розміщена медіально, рубчик округлий, втягнутий. Клітини екзотести полігональні, нерегулярні, на верхівках горбиків розміщені радіально навколо однієї центральної. Зовнішні периклінальні стінки опуклі, складчасті, декотрі з них можуть мати 2–3 ввігнутості, що надає їм певної кривизни. Антиклінальні стінки ввігнуті, клітинні межі заглиблені.

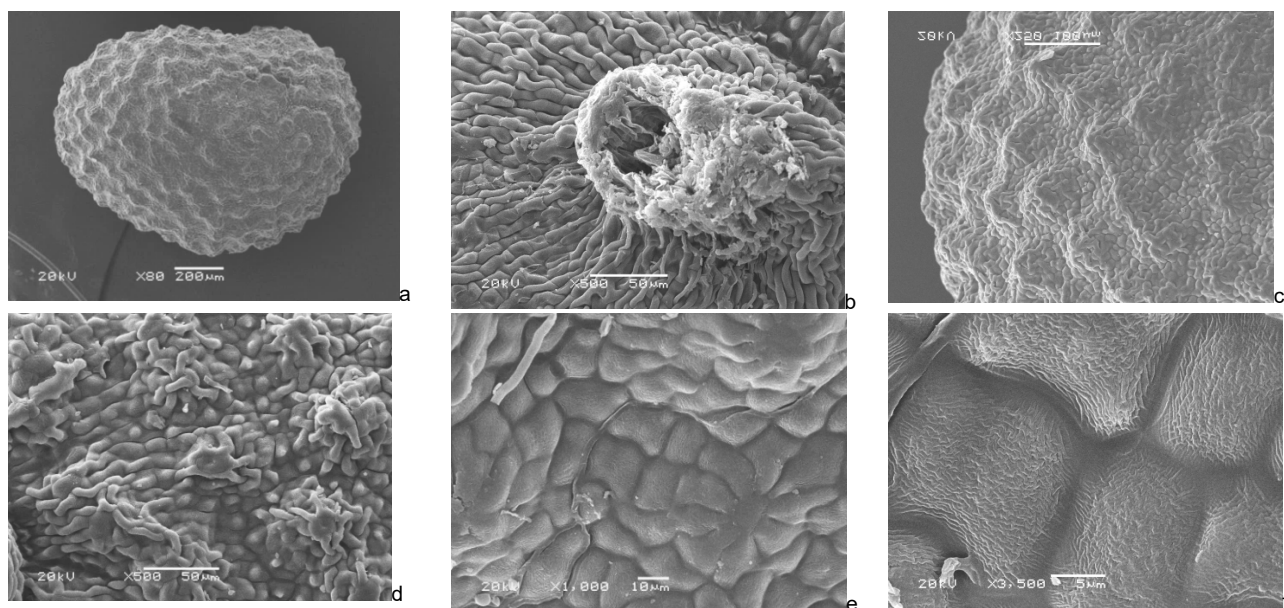


Рис. 1. Мікроскульптура поверхні еремів *Isodon japonicus* (Burman) H. Nara:

а – загальний вигляд, б – зона мікропіле, с – рельєф, d, e – структура горбиків, f – загальна форма клітин

Isodon japonicus* var. *glaucoalyx (рис. 2). Ереми 1,3–1,6 мм завдовжки, яйцеподібної форми, коричневого чи сіро-коричневого кольору. Іноді поверхня еремів може мати кольоровий орнамент – мережку у вигляді неправильних ліній більш темного, бурого, забарвлення. Поверхня слабо скульптурована, рельєф нерівномірний, сітчастий. Вапікальний зоні еремів присутнє скупчення папіл різних типів: стрічкоподібні, кулясті, гребенеподі-

бні, ременеподібні. Рубчик округлий, фунікулус має добре перфоровані діляки. У базальній частині помічено розвинений міцелій сапротрофних грибів. Зовнішні периклінальні стінки увігнуті, текстура зморшувата, з напливами. Антиклінальні стінки клітин різні за товщиною, виступаючі: містяться вище рівня периклінальних стінок, подекуди можуть мати гребені. Клітинні межі невиразні. На одному з еремів виявлені продишові клітини.

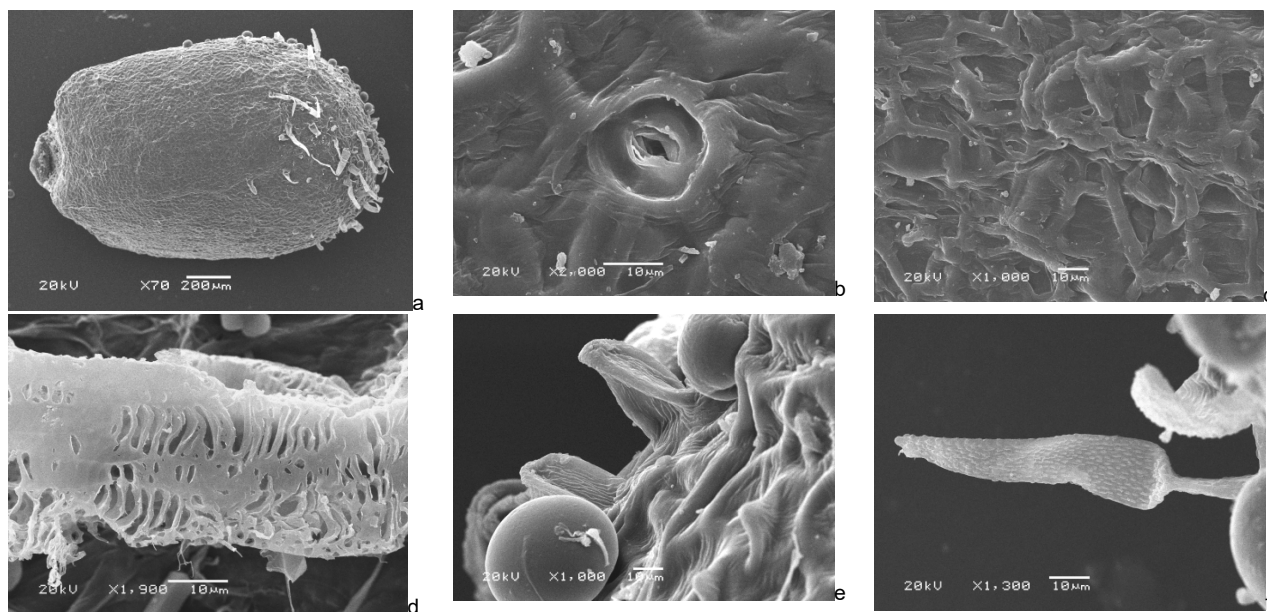


Рис. 2. Мікроскульптура поверхні еремів *Isodon japonicus* (N. Z. Burm) Haravar. *glaucoalyx* (Maxim.) H. W. Li:

а – загальний вигляд, б – продишові клітини, с – рельєф, d – фрагмент перфорацій фунікулусу, e, f – папіли

Висновки. У результаті дослідження насіння (еремів) *Isodon japonicus* та *I. japonicus* var. *glaucoalyx* репродукції Національного ботанічного саду ім. М. М. Гришка НАН України виявлено, що мікрорельєф, а саме первинна і вторинна скульптура, мають суттєві відмінності у виду і різновиду. Більш розмаїтий за морфологічними ознаками рельєф притаманний еремам різновиду, до того ж виявлено продишові клітини. Цей факт потребує додаткових досліджень для з'ясу-

вання частоти, з якою вони зустрічаються, та ролі в життєдіяльності насінини. Отримані дані придатні до використання для систематичної вивірки рослин роду *Isodon*, що можуть бути отримані в умовах інтродукції з насіння системи Index Seminum.

Подяка. Автор висловлює глибоку подяку науковим співробітникам Інституту ботаніки ім. М. Г. Холодного

В. І. Сапсаю та О. М. Царенко за допомоги у виконанні мікроскопічних досліджень.

Список використаних джерел:

1. Phylogeny and historical biogeography of *Isodon* (Lamiaceae): Rapid radiation in south-west China and Miocene overland dispersal into Africa / X.-Q. Yu, M. Maki, B. T. Drew, A. J. Paton et al. // Molecular Phylogenetics and Evolution. – 2014. – Vol. 77. – P. 183–194.
2. Study on the immunomodulation effect of *isodonjaponicus* extract via solenocyte function and NK anti-tumor activity / Y. Hwang, J. Kim, D.-S. Park et al. // International Journal of Molecular Sciences. – 2012. – Vol. 13(4). – P. 4880–4888.
3. *Rabdosia japonica* var. *glaucoalyx* flavonoids fraction attenuates lipopolysaccharide – induced acute lung injury in mice / C.-J. Chu, N.-Y. Xu, X.-L. Li, L. Xia et al. // Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. – 2014.
4. Barthlott W. Epidermal and seed surface characters of plants: systematic applicability and some evolutionary aspects / W. Barthlott // Nordic Journal of Botany. – 1981. – Vol. 1. – P. 345–355.

References:

1. Yu X.-Q., Maki M., Drew B., Paton A et al. Phylogeny and historical biogeography of *Isodon* (Lamiaceae): Rapid radiation in south-west China

and Miocene overland dispersal into Africa // Molecular Phylogenetics and Evolution. – 2014. – Vol. 77. – P. 183–194.

2. Hwang Y., Kim J., Park D.-S., Hwang K. Study on the immunomodulation effect of *isodonjaponicus* extract via solenocyte function and NK anti-tumor activity / Y. Hwang, J. Kim, D.-S. Park, K. Hwang // International Journal of Molecular Sciences. – 2012. – Vol. 13(4). – P. 4880–4888.

3. *Rabdosia japonica* var. *glaucoalyx* flavonoids fraction attenuates lipopolysaccharide – induced acute lung injury in mice / Chu C.-J., Xu N.-Y., Li X.-L., Xia L., et al. // Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. – 2014.

4. Barthlott W. Epidermal and seed surface characters of plants: systematic applicability and some evolutionary aspects / W. Barthlott // Nordic Journal of Botany. – 1981. – Vol. 1. – P. 345–355.

Надійшла до редакції 20.08.2018

Отримано виправлений варіант 24.09.2018

Підписано до друку 24.09.2018

Received in the editorial 20.08.2018

Received a revised version on 24.09.2018

Signed in the press on 24.09.2018

С. Ковтун-Водяницька, канд. биол. наук, науч. сотр.
Национальный ботанический сад им. Н. Н. Гришко НАН Украины, Киев, Украина

УЛЬТРАСКУЛЬПТУРА ЗРЕМОВ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *Isodon* (Schr. ex Benth.) Spach (LAMIACEAE LINDL.)

Изучена ультраскульптура поверхности семенной кожуры двух представителей рода *Isodon* (Schr. ex Benth.) Spach из семейства Lamiaceae Lindl. – *I. japonicus* (Burman) H. Hara и *I. japonicus* (N. Z. Burm) Hara var. *glaucoalyx* (Maxim.) H. W. Li, интродуцированных в Национальном ботаническом саду им. Н. Н. Гришко НАН Украины (Правобережная Лесостепь). Представители рода распространены в азиатском регионе с наибольшим разнообразием видов в Китае; два вида встречаются в тропических областях Африки. Скрининг литературных зарубежных источников показал, что микроскопические исследования зремов вида и вариации не проводились, по крайней мере, мы не нашли никакой информации по этому вопросу. Это побудило нас исследовать макро- и микроморфологию зремов. В работе использовали СЭМ. Методически руководствовались хорошо известной работой W. Barthlott. Описательная часть задокументирована фотографически. В результате эксперимента выявлены особенности морфологии и структуры, общие и отличительные особенности зремов, представлены морфологические описания их формы, цвета, первичной и вторичной скульптуры спермодермы. Установлены различные виды внешнего рельефа для вида и вариации: для *I. japonicus* характерен плотно-холмистый рельеф, а для *I. japonicus* var. *glaucoalyx* – нерегулярно-сетчатый. Также выявлены различия в структуре наружных периклиальных и антиклиальных стенок. Внешние периклиальные стенки вида выпуклые, антиклиальные вогнутые, а у вариации – вогнутые и выступающие соответственно. Спермодерма семян *I. japonicus* var. *glaucoalyx* характеризуется наличием различных типов папилл в апикальной области и устьичных клеток, важность и функция которых еще нуждается в дальнейшем исследовании. Различия в микрорельефе зремов могут быть использованы в качестве вспомогательных диагностических признаков на таксономическом уровне видов для растений рода *Isodon*, полученных в условиях интродукции из семян системы Index Seminum.

Ключевые слова: интродуцент, *Isodon*, зремы, ультраскульптура.

S. Kovtun-Vodyanitska, PhD, sct.
M. M. Gryshko National Botanical Garden National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

ULTRASCULPTURES OF SEEDS OF REPRESENTATIVES OF A GENUS *ISODON* (SCHRAD EX BENTH.) SPACH (LAMIACEAE LINDL.)

The studied was ultrasculpture of seed surface of 2 representatives of the genus *Isodon* (Schr. ex Benth.) Spach from the family Lamiaceae Lindl. – *I. japonicus* (Burman) H. Hara and *I. japonicus* (N. Z. Burm) Hara var. *glaucoalyx* (Maxim.) H. W. Li, introduced in the M. M. Gryshko National Botanical Garden National Academy of Sciences of Ukraine (Right-bank Forest-steppe). Representatives of the genus are common in the Asian region with the greatest species diversity in China; 2 species are found in the tropical regions of Africa. Screening of literary foreign sources showed that microscopic studies of the seeds of the species and variate did not occur, at least we did not find any information on this issue. This prompted us to investigate the macro- and micromorphology of the seeds. SEM was used in the work. Methodically guided by the well-known work of W. Barthlott. The descriptive part is documented photographically. As a result of the experiment, features in morphology and structure, common and distinctive features of seeds, morphological descriptions of their shape, color, primary and secondary sculpture of spermoderm are revealed. It has been established different types of external relief for species and the variate: for *I. japonicus*, a characteristic densely hilly relief, and for *I. japonicus* var. *glaucoalyx* – irregularly-mesh. Also revealed differences in the structure of the outer periclinal and anticlinal walls. The outer periclinal walls of the species are convex, anticlinal concave, and in the variate – concave and protruding respectively. The spermoderm of the seeds *I. japonicus* var. *glaucoalyx* is characterized by the presence of various types of papillomas in the apical region and stomatal cells, the significance and function of which still need to be further investigated. Differences in the microrelief of the seeds can be used as auxiliary diagnostic features at the species taxonomic level for plants of the genus *Isodon*, obtained under conditions of introduction from the seeds of the Index Seminum system.

Key words: introducents, *Isodon*, seeds, ultrasculpture.

УДК: 581.1:631.8

І. Хоменко, асп., О. Косик, канд. біол. наук, Н. Таран, д-р біол. наук, проф.
Навчально-науковий центр "Інститут біології та медицини",
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

ПАРАМЕТРИ ВОДНОГО ОБМІНУ РОСЛИН САЛАТУ ПОСІВНОГО ЗА ДІЇ ІОНІВ КАДМІЇ

Досліджено вплив іонів кадмію на показники водного обміну рослин салату *Lactuca sativa* L. двох відмінних за здатністю до накопичення вторинних метаболітів сортів (Лоло та Лоло Росса). Було використано одномісячні рослини, в середовище живлення яких додавали 0,1 мМ кадмію у формі сульфату протягом чотирнадцяти діб. Досліджували параметри містили: показник водного дефіциту, відносної тургесцентності, вмісту вільної води, концентрації клітинного соку, щільності та стану продихів, а також індексу толерантності. У роботі використано вагові, рефрактометричні, мікроскопічні та аналітичні методи дослідження. Згідно з отриманими результатами було виявлено різноспрямованість рослинної відповіді на дію іонів кадмію у цих сортів салату. Зокрема, для зеленого сорту Лоло зафіксовано зростання водного дефіциту протягом експозиції, зниження параметрів оводненості, вільної води та концентрації клітинного соку від рівня контролю до чотирнадцятої доби експозиції, тоді як для червоного сорту Лоло Росса помічено зниження водного дефіциту, зростання параметрів відносної тургесцентності та вільної води до чотирнадцятої доби експозиції на фоні відсутності достовірної різниці параметру концентрації клітинного соку. Крім того, в обох сортах спостерігалось зростання ксероморфності листових пластинок та особливо щільності продихів. Але в зеленого сорту Лоло більшість зафіксовано у закритому стані, на відміну від червоного сорту Росса. У підсумку виявлено, що зелений та червоний сорти салату мають відмінні стратегії пристосування до наявності важких металів у середовищі зростання. Згідно з характеристикою параметрів водного обміну та стоматографічного аналізу можна стверджувати про вищі адаптивні можливості сорту Лоло Росса до цього стресового фактора порівняно із сортом Лоло.

Ключові слова: іони кадмію, індекс толерантності, водний обмін, стоматографія, *Lactuca sativa* L.

Вступ. Однією з важливих проблем сучасного індустріального світу є зростання рівня накопичення комплексів та кон'югатів важких металів, що в природних умовах переважно недоступні для рослин, проте в ґрунтах важкі метали техногенного походження здатні легко переходити в харчові ланцюги. Крім того, на відміну від органічних забруднювачів, вони здатні існувати в ґрунті протягом тривалого часу [1]. Ураховуючи прогресуючі темпи антропогенного навантаження на довкілля, посилюється акумуляція сполук кадмію, одного з найпоширеніших полутантів першого класу токсичності, на земельних угіддях України, [2]. Існує доволі велика кількість джерел надходження кадмію в довкілля [3], проте здебільшого акумуляція кадмію в сільськогосподарських ґрунтах відбувається внаслідок нерозбірливої та неостаточної утилізації побутових та промислових відходів, використання забруднених стічних вод для іригації та застосування мінеральних добрив [1]. Традиційно як в Україні, так і в світі для збільшення виходу врожаю застосовуються підвищені кількості мінеральних добрив, збагачених солями важких металів та хелатних комплексів, що мало засвоюються і не відповідають біологічним потребам вирощуваних рослин. Щорічно в світі використовується понад 30 млн тонн фосфорних добрив, куди солі кадмію входять у вигляді мікрододмішок [4].

Листові овочі, зокрема салат (*Lactuca* L.), дають швидкий приріст біомаси і виступають у ролі дієтичних полівітамінних культур щоденного харчування людини, дуже чутливі до присутності токсичних металів у ґрунті [1] і здатні накопичувати їх у їстівних надземних органах [2, 5]. Зорріг зі співавт. [6] виявили, що салат, вирощений у присутності 15,0 мкМ CdCl₂, мав концентрацію листового Cd, у 100 разів вищу, ніж визначено законодавчими нормами для овочевих продуктів харчування людини. Водночас загальне глобальне комерційне виробництво салату тільки в 2010 році досягло 23,6 млн тонн, тому комерційна цінність салату робить необхідним його захист від забруднення сполуками кадмію [1].

Присутність підвищеного рівня Cd у середовищі живлення рослини може викликати ряд морфологічних, біохімічних та фізіологічних змін рослин, що призводить до затримки росту і навіть загибелі рослин [5, 6]. Висока концентрація Cd призводить до утворення активних форм кисню (супероксид-аніон, гідроксил-радикал, пероксид водню), які викликають окислювальний стрес та пошкодження мембран, про що свідчить зростання вмісту гідропероксидів ліпідів, тіобарбітурат-активних сполук

та інших маркерів ліпопероксидації [7, 8]. Активні форми кисню мають високу реакційну здатність, тому виступають загрозою структурної цілісності ряду макромолекул, таких як ДНК, РНК, пігменти, білки, ліпіди тощо [3]. Повідомляється про зниження ефективності шляхів асиміляції вуглецю, порушення транспірації, ультраструктури хлоропластів та складу тилакоїдних мембран за токсичного впливу іонів кадмію [3, 8]. Поряд із цим зафіксовано активізацію ензиматичних та неензиматичних систем антиоксидантного захисту рослинної клітини, посилення процесів дихання та білкового синтезу [9].

Необхідною умовою росту клітин, а також важливим фізіологічним фактором адаптивного потенціалу рослини у несприятливих умовах зростання є їхній водний статус. Підтримання рослиною певного водного балансу є важливою умовою стійкості за дії несприятливих чинників антропогенно трансформованого середовища [10].

Тому метою роботи було оцінити вплив іонів кадмію на загальну адаптаційну реакцію рослин салату посівного (*Lactuca sativa* L.) двох сортів, відмінних за здатністю до накопичення вторинних метаболітів, за інтегральними параметрами росту та водного режиму.

Матеріали і методи. У роботі досліджували вплив іонів кадмію у концентрації 0,1 мМ на одномісячні рослини *Lactuca sativa* зеленого сорту Лоло та антоціанового Лоло Росса. Насіння рослин обох сортів піддавали передпосівній обробці методом барботування у дистильованій воді протягом доби. Надалі залежно від віку проростки вирощували на 25 %-му, 50 %-му та 100 %-му середовищі Хогленда. У середовище живлення одномісячних рослин дослідних варіантів додавали 0,1 мМ кадмію у формі сульфату. Рослини, що вирощувались у попередніх умовах системи, були використані як контрольні варіанти. Для визначення впливу сублетальних доз Cd²⁺ зразки листків одного віку відбирали на першу, сьому та чотирнадцяту добу експозиції.

Індекс толерантності (ІТ) як один з основних інтегральних показників стійкості рослини оцінювали на основі параметру абсолютного росту: ІТ = Показник маси сухої речовини досліджуваного зразку / Показник маси сухої речовини контрольного зразку × 100 %.

Параметри водного обміну – водний дефіцит, відносну тургесцентність – досліджували за ваговим методом висічок [11, 12], вміст вільної води та концентрацію клітинного соку визначали за допомогою рефрактомет-

ричного методу [11]. Стоматографічний аналіз адаксіальної та абаксіальної поверхні листкових пластинок робили за методом відбитків з використанням світлового мікроскопу Ломо (Росія) [13].

Результати опрацьовано статистично за допомогою стандартного пакета програми "Microsoft Excel 2010". Розбіжності між вибірками вважали значущими при $p \leq 0,05$.

Результати та їх обговорення. Основним раннім візуальним симптомом прояву негативного впливу іонів важких металів є пригнічення росту рослини. Ріст рослин є найбільш показовим інтегральним показником фізіологічного стану під час зміни складу середовища та формує системну відповідь рослини на підвищений вміст важких металів. Тому стабільність ростових параметрів рослин забруднених територій вважається одним із маркерів стійкості до умов середовища [2].

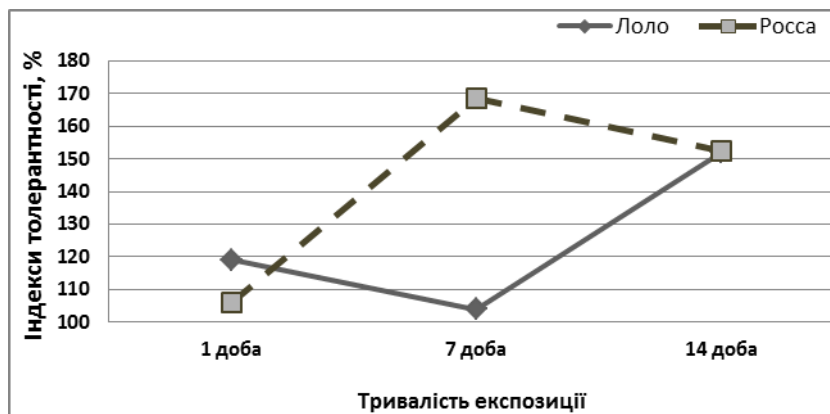


Рис. 1. Індекси толерантності *L. sativa* зеленого сорту Лоло та червоного Лоло Росса за дії $0,1 \text{ мМ Cd}^{2+}$

Використавши масу сухої речовини як інтегральний показник абсолютного росту, нами було досліджено індекси толерантності, що базуються на прирості біомаси і проявляють відмінності у відповіді рослин до експозиції в присутності Cd^{2+} . Отримані нами дані (рис. 1) свідчать про різницю у рівнях адаптаційної спроможності сортів салату, відмінних за рівнем накопичення антоціанів, до дії іонів кадмію. Зокрема, у дослідних рослин червоного сорту Лоло Росса зафіксовано зростання рівня резистентності вже на 7-му добу експозиції порівняно з дослідними рослинами зеленого сорту Лоло, які досягали відповідного рівня лише на 14 добу, що може пояснюватись залученням у процеси адаптивної відповіді рослини низькомолекулярних ендогенних антиоксидантів та хелаторів – антоціанів. Відомо, що ця група фенольних сполук має здатність утворювати хелатні комплекси з важкими металами [14], транспортуючи їх у вакуолю для детоксикації, а також впливати на плинність мембран, зменшуючи надходження небезпечних іонів у клітину [15]. Кадмій на початкових етапах надходження в рослину здатний

накопичуватись у клітинах кореневого чохла, що веде до його поступового відмирання [5, 16]. Це супроводжується появою некрозів темно-коричневого кольору та загальним потемнінням коренів рослини. Постійне їх ослизнення, починаючи з першої доби експозиції, свідчить про системний захист рослини від дії важкого металу через зв'язування з пектатами виділюваного слизу.

Надалі помітне значне гальмування росту коренів рослин обох сортів порівняно з контролем, що свідчить про надходження поллютанту до надземної частини та зниження рівня водозабезпечення атрофованими коренями (рис. 2). Через високу електрохімічну активність та здатність кадмію до заміщення життєво необхідних двовалентних іонів значно знижується продуктивність фотосинтезу та загальний метаболізм рослинної клітини. Також накопичення кадмію перешкоджає поглинанню клітинами рослин інших двовалентних іонів, симптоми нестачі яких здатні проявлятися некрозами коренів, їх побурінням, хлорозом листків та загальним гальмуванням росту [3, 17]. У разі підвищення їх концентрації в середовищі можна домогтися знешкодження шкідливої дії Cd^{2+} .

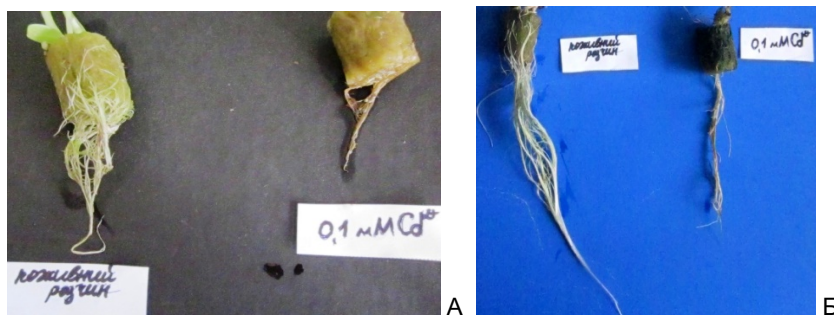


Рис. 2. Стан коренів рослин *L. sativa* (контрольний та дослідний варіант) сортів Лоло (а) та Лоло Росса (б) на чотирнадцяту добу дії $0,1 \text{ мМ Cd}^{2+}$

Здатність рослин підтримувати певний рівень водного балансу вважається обов'язковою умовою як росту й розвитку за звичних умов так і стійкості до впливу несприятливих факторів середовища [10]. Будь-які змі-

ни середовища відображають показники водного статусу рослинних клітин – водний дефіцит, відносна тургесцентність та вміст вільної води.

Для зеленого сорту Лоло дефіцит вологи помічено вже на першу добу впливу кадмію з подальшим зростанням протягом експозиції (рис. 3). Це свідчить про негативний вплив кадмію на процеси надходження води через інгібування росту та галушення коренів. Візуально помічено зниження росту та нормального розвитку ко-

рення вже на першу добу експозиції. Надалі (рис. 2) зменшилась кількість бічних коренів – відповідно, значно знизилась всисна здатність підземних органів. Оскільки дія металу лише посилювалася – показники водного дефіциту дослідних рослин зеленого салату зростали до 33 % на 14 добу експозиції.

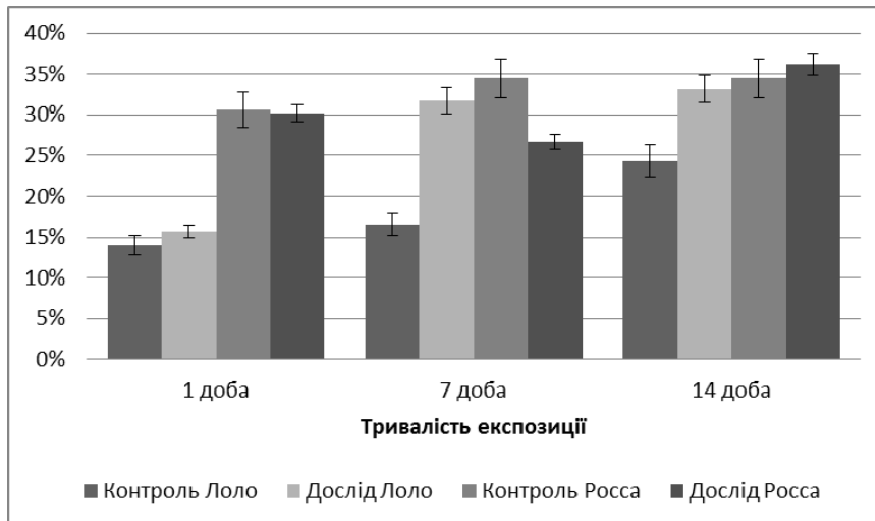


Рис. 3. Показники водного дефіциту рослин *L. sativa* сорту Лоло та Лоло Росса за дії 0,1 мМ Cd²

Візуально помічено зниження росту та нормально-го розвитку кореня вже на першу добу експозиції. Надалі (рис. 2) зменшення кількості бічних коренів очевидно призводить до зниження сисної сили тканин підземних, а надалі й надземних органів. Оскільки дія металу лише посилювалася – показники водного дефіциту дослідних рослин зеленого салату зростали до 33 % на 14 добу експозиції.

На відміну від зеленого, показники водного дефіциту антоціанового сорту салату значно відрізнялися. На першій добі експозиції показники дослідних рослин дос-

товірно не відрізнялися від стану контролю, а до сьомої доби помічено значно нижчі (на 23 %) від контролю показники нестачі води дослідних зразків. Наприкінці досліду зафіксовано вирівнювання результатів (рис. 3).

Отримані дані характеризують водний статус рослин в умовах кадмієвого забруднення та вказують на розвиток водного дефіциту в умовах стресу. Показник відносної тургесцентності характеризує рівень оводненості рослинних клітин та є підґрунтям для визначення вмісту вільної, метаболічно активної води, яка вказує на загальний стан метаболізму рослини [19].

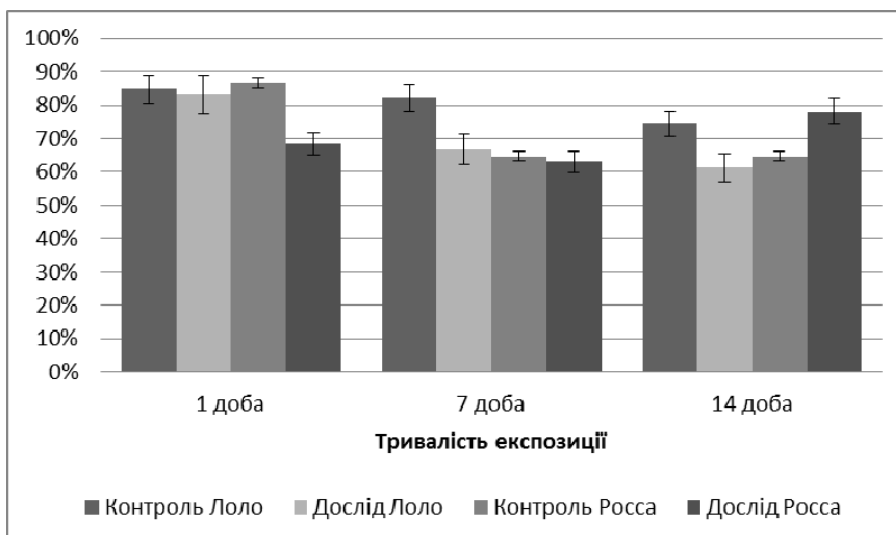


Рис. 4. Параметр відносної тургесцентності рослин *L. sativa* сорту Лоло та Лоло Росса за дії 0,1 мМ Cd²

Протягом експозиції у дослідних рослин зеленого салату помічено поступове зниження рівня оводненості та вмісту вільної води. Пік зниження тургесцентності припадав на сьому добу та мав значення на 15 % нижче контролю (рис. 4), а вільної води – на 14-ту добу зі зниженням на 28 % від контрольних значень.

У червоного (антоціанового) салату помічено зниження відносної тургесцентності на 22 % на першу добу, з подальшим зростанням до 20 % значень контролю на 14-ту добу. Також для червоного салату відзначено зростання показника вмісту вільної води на 26 % на першу добу експозиції з подальшим зрівнянням з контролем (рис. 5).

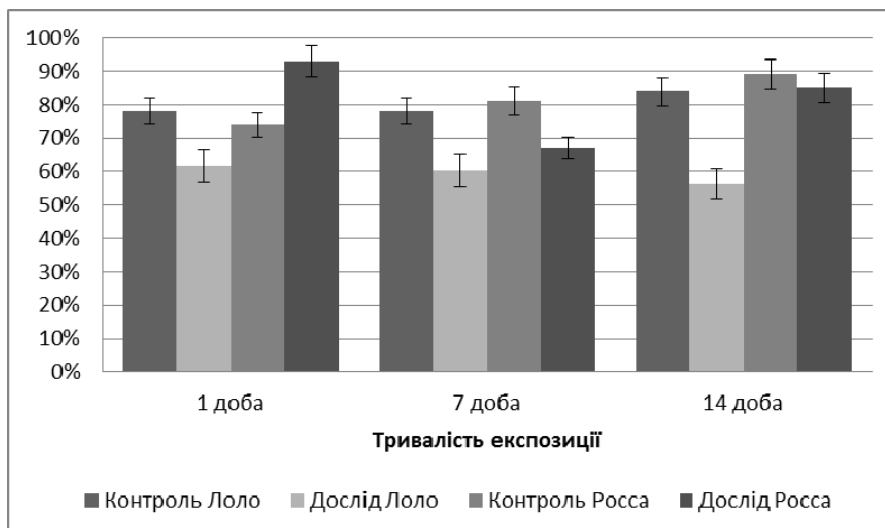


Рис. 5. Вміст вільної води в рослин *L. sativa* сорту Лоло та Лоло Росса за дії 0,1 мМ Cd²

Наведені характеристики водного статусу можуть бути ознакою зменшення водоутримувальної здатності клітин дослідних зразків сорту Лоло та збігаються з даними про зменшення сирової біомаси рослин за дії токсиканту, на відміну від червоного сорту Росса, де показники водного обміну зрівнювались із контрольними значеннями до 14-ї доби експозиції в 0,1 мМ кадмію.

Серед адаптивних стратегій щодо зниження токсичного ефекту кадмієвого забруднення також виділяють накопичення в клітинному соку осмотично активних речовин – фруктових та амінокислот (бетаїн, пролін),

мінеральних солей, сполук фенольної природи та особливо цукрів [8]. Згідно з отриманими даними, зростання концентрації клітинного соку на 20 % зафіксовано в дослідних зразках сорту Лоло на першу добу дії поллютанту, проте з тривалістю експозиції показник знижувався на 31 % від рівня контролю на 14-ту добу (рис. 6). Очевидно зміна водного статусу листків зеленого сорту у поєднанні з токсичним впливом кадмію на параметри продуктивності фотосинтезу [7, 15] призвели також до зниження вмісту цукрів.

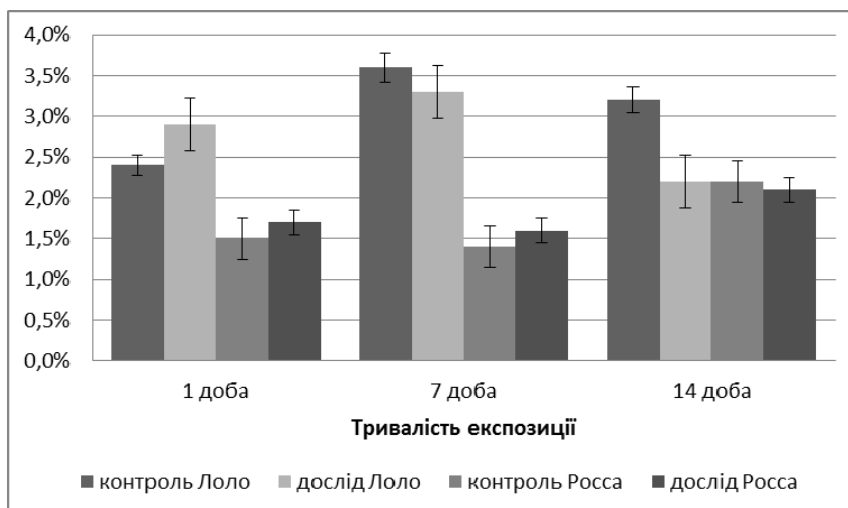


Рис. 6. Показник концентрації клітинного соку рослин *L. sativa* сорту Лоло та Лоло Росса за дії 0,1 мМ Cd²

Для дослідних зразків антоціанового сорту Лоло Росса не помічено достовірної різниці показника концентрації клітинного соку з контрольними значеннями протягом експозиції в 0,1 мМ кадмію.

Однією із адаптивних змін у відповідь на спрямовану дію важких металів першого класу токсичності є модифікації продигового апарату листків рослин [13]. Тому, окрім прямих обчислень параметрів водного обміну, було здійснено стоматографічний аналіз щіль-

ності та стану продигов епідерми листків досліджуваних рослин (рис. 7). Епідерміс складається з поліфункціональної покривної тканини, що відображає пристосувальні зміни рослини до несприятливих факторів середовища на анатомо-морфологічному рівні [18]. Листки *L. sativa* амфістоматичні, проте більшість продигових клітин зосереджено на абаксальній (нижній) поверхні листової пластинки.

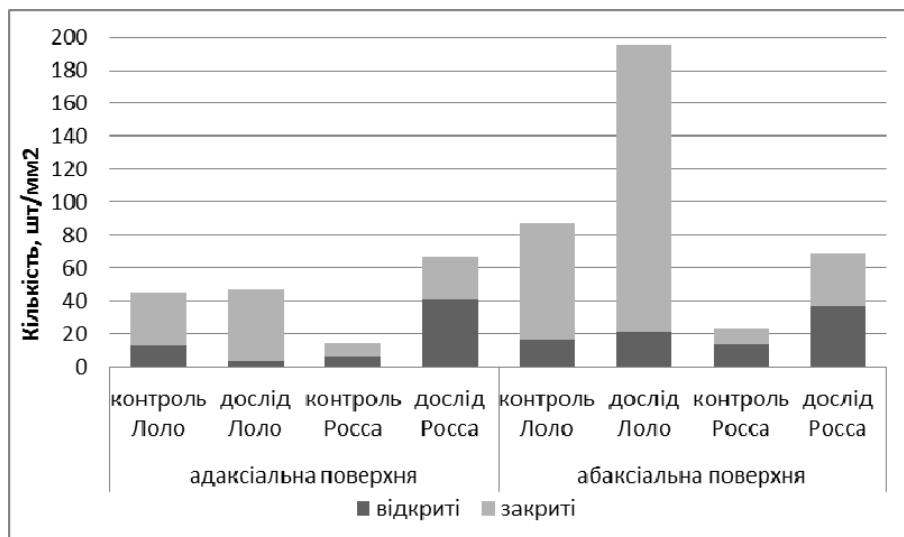


Рис. 7. Кількість та співвідношення продихів рослин *L. sativa* сорту Лоло та Лоло Росса на 14-ту добу експозиції в 0,1 мМ Cd²

Протягом експерименту для рослин сорту Лоло не помічено значних змін кількості та стану продихових апаратів на адаксіальній поверхні листків дослідних зразків, проте на абаксіальній поверхні станом на 14-ту добу експозиції помічено двократне зростання кількості продихів дослідних зразків з яскравим проявом ксероморфності ознак, що співвідноситься зі зростанням показників водного дефіциту. Більшість продихів була в закритому стані.

Під час здійснення стоматографічного аналізу рослин червоного салату Росса було виявлено протилежну до зеленого сорту тенденцію. У зразках червоного салату помічено менш щільне розташування протягом дослідів та відсутність значної різниці в кількості продихів на 1 мм² обох поверхонь листової пластинки дослідних рослин до 14-ї доби експозиції. Зафіксовано також двократне зростання кількості продихів порівняно з контрольними листками на 14 добу впливу металу; більшість продихів зафіксовано у відкритому стані на момент аналізу, що може свідчити про інтенсивні процеси метаболізму рослини, що проявлялось у зростанні вмісту вільної води, а отже, і активізації процесу транспірації.

Отже, за отриманим результатами, зелений та червоний сорти салату мають відмінні стратегії пристосування до забруднення наявності важких металів у середовищі зростання. Згідно з характеристикою параметрів водного обміну та стоматографічного аналізу можна стверджувати про вищі адаптивні можливості сорту Лоло Росса до певного стресового фактора порівняно із сортом Лоло.

Висновки. Згідно з отриманими результатами, виявлено значний вплив іонів важкого металу на оводненість клітин, що проявляється у нестачі вільної води, закритті та зменшенні продихів, в'ялості та зменшенні вегетативної маси і свідчить про перебування рослини у стресовому стані. Проте, високий індекс толерантності, незначне зростання показників відносної тургесцентності на фоні зниження водного дефіциту дослідних рослин червоного сорту салату Лоло Росса свідчить про інтенсивне залучення ними адаптаційних процесів для детоксикації іонів кадмію порівняно з дослідними рослинами зеленого сорту Лоло. Результати також вказують на зниження рівня вільної води та концентрації клітинного соку дослідних рослин сорту Лоло порівняно з червоним Росса.

За дії кадмію у дослідних рослин обох сортів відзначено ксероморфність листової пластинки і значне зростання кількості продихів. Однак більшість продихів у дослідних рослин зеленого салату перебувала у закритому стані, тоді як у червоного – половина з них була відкритою.

Список використаних джерел:

1. Cadmium uptake in above-ground parts of lettuce (*Lactuca sativa* L.) / X. Tang, Y. Pang, P. Ji et al. // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. – 2016. – № 125. – С. 102–106. doi: 10.1016/j.ecoenv.2015.11.033.
2. The uptake and bioaccumulation of heavy metals by food plants, their effects on plants nutrients, and associated health risk: a review / A. Khan, S. Khan, M. A. Khan et al. // *Environ Sci Pollut Res*. – 2015. – № 22. – С. 13772 (15). doi: 10.1007/s11356-015-4881-0.
3. Гончарук Е. А. Тяжелые металлы: поступление, токсичность и защитные механизмы растений (на примере ионов кадмия) / Е. А. Гончарук, Н. В. Загоскина // *Вісн. Харк. нац. аграрн. ун-ту. Серія Біологія*. – 2017. – № 1 (40). – С. 35–49.
4. Trace metals in phosphate fertilizers used in Eastern Mediterranean countries / V. Azzi, V. Kazpard, B. Lartiges et al. // *Clean Air Soil Water*. – 2017. – № 45. – Forthcoming.
5. Akhter Fardausi. Cadmium Accumulation and Distribution in Lettuce and Barley. Electronic Thesis and Dissertation Repository / Fardausi Akhter. – 2012. – P. 756.
6. Lettuce (*Lactuca sativa*): a species with a high capacity for cadmium (Cd) accumulation and growth stimulation in the presence of low Cd concentrations / W. Zorrig, A. El Khouni, T. Ghnaya et al. // *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. – 2013. – № 88(6). – С. 783–789. doi: 10.1080/14620316.2013.11513039.
7. Хоменко І. М. Вплив іонів кадмію та есенціальних нанометалів на фізіолого-біохімічні параметри рослин салату посівного / І. М. Хоменко, О. І. Косик, Н. Ю. Таран // *Вісн. Київ. ун-ту. Серія Біологія*. – 2018. – № 1(75). – С. 37–45.
8. Exogenous proline mediates alleviation of cadmium stress by promoting photosynthetic activity, water status and antioxidative enzymes activities of young date palm (*Phoenix dactylifera* L.) / M. Zouari, Ch. Ben Ahmed, W. Zorrig et al. // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. – 2016. – № 128. – С. 100–108. doi: 10.1016/j.ecoenv.2016.02.015.
9. Phenylalanine ammonia-lyase activity and anthocyanin content in different varieties of lettuce under the cadmium influence / О. І. Косик, І. М. Хоменко, Л. М. Батманова et al. // *The Ukrainian Biochemical Journal*. – 2017. – № 89 (2). – С. 85–91. doi: 10.15407/ubj89.02.085.
10. Стимулююча дія низьких концентрацій алюмінію на фізіологічний стан рослин грецької татарської (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) / О. Є. Смірнов, Н. Ю. Таран, А. М. Косян та ін. // *Вісн. Харків. нац. ун-ту імені В. Н. Каразіна, Серія Біологія*. – 2014. – № 23. – С. 107–116.
11. Паршикова Т. В. Фізіологія рослин. Практикум / Т. В. Паршикова. – Луцьк: ВМА "Терен", 2010. – 416 с.
12. Alleviation of cadmium toxicity in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants by the exogenous application of salicylic acid / M. Semida Wael, M. Rady Mostafa, A. Abd El-Mageed Taia et al. // *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. – 2015. – № 90(1). – С. 83–91. doi: 10.1080/14620316.2015.11513157.
13. Морфологічні показники *Fagopyrum esculentum* в умовах алюмокислого стресу / О. Є. Смірнов, А. М. Косян, О. І. Косик та ін. // *Укр. бот. журн.* – 2014. – № 71 (4). – С. 511–516.

14. Fedenko V. S. Complexation of cyanidin with cadmium ions in solution / V. S. Fedenko, S. A. Shemet, V. S. Struzhko // Ukrainian Biochem. J. – 2005. – № 77. – С. 104–109. doi: 10.13140/RG.2.1.1461.8647.

15. A critical review on effects, tolerance mechanisms and management of cadmium in vegetables / M. Rizwan, Sh. Ali, M. Adrees et al. // Chemosphere. – 2017. – № 182. – С. 90–105. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.05.013.

16. Effect of cadmium uptake on growth and physiology of water lettuce / M. Varun, C. O. Ogunkunle, C. Sarathambal et al. // Indian Journal of Weed Science. – 2017. – № 49(1). – С. 102–104. doi: 10.5958/0974-8164.2017.00028.4.

17. Кавулич Я. Вплив саліцилової кислоти на пігментну систему рослин гречки за токсичного впливу кадмію хлориду / Я. Кавулич, М. Кобилецька, О. Терек // Вісн. Львів. ун-ту. Серія біологічна. – 2016. – Вип. 72. – С. 210–217.

18. Овруцька І. І. Анатомо-морфологічні ознаки листків у різних умовах зростання / І. І. Овруцька // Укр. бот. журн. – 2012. – № 69(1). – С. 125–133.

References:

1. Tang X et al. Cadmium uptake in above-ground parts of lettuce (*Lactuca sativa* L.). Ecotoxicology and Environmental Safety. 2016;125:102–106. doi:10.1016/j.ecoenv.2015.11.033

2. Khan A, Khan S, Khan MA, et al. The uptake and bioaccumulation of heavy metals by food plants, their effects on plants nutrients, and associated health risk: a review. Environ Sci Pollut Res. 2015;22:13772. doi:10.1007/s11356-015-4881-0

3. Goncharuk EA, Zagorskina NV. Heavy metals: uptake, toxicity and protective mechanisms in plants (for example of cadmium). Bulletin of Kharkiv national agrarian university named after V.V. Dokuchayev. Biology. 2017;1 (40):35-49. Russian.

4. Azzi V, Kazpard V, Lartiges B, et al. Trace metals in phosphate fertilizers used in Eastern Mediterranean countries. Clean Air Soil Water. 2017 Jan 13;45(1). Epub Sept 2016. doi:10.1002/clen.201500988

5. Akhter Fardausi. Cadmium Accumulation and Distribution in Lettuce and Barley. Electronic Thesis and Dissertation Repository. 2012; paper 756

6. Zorrig W, El Khouni A, Ghnaya T, Davidian JC, Abdely Ch, Berthomieu P. Lettuce (*Lactuca sativa*): a species with a high capacity for cadmium (Cd) accumulation and growth stimulation in the presence of low Cd concentrations. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology. 2013; 88(6):783-789. doi:10.1080/14620316.2013.11513039

7. Khomenko I, Kosyk O, Taran N. The influence of cadmium and essential nanometals on the physiological and biochemical parameters of lettuce plants. Visnyk of Taras Shevchenko National University of Kyiv. Series: biology. 2018; 1(75):37-45. Ukrainian.

8. Zouari M et al. Exogenous proline mediates alleviation of cadmium stress by promoting photosynthetic activity, water status and antioxidative enzymes activities of young date palm (*Phoenix dactylifera* L.). Ecotoxicology and Environmental Safety. 2016;128:100–108. doi: 10.1016/j.ecoenv.2016.02.015

9. Kosyk OI, Khomenko IM, Batsmanova LM, et al. Phenylalanine ammonia-lyase activity and anthocyanin content in different varieties of lettuce under the cadmium influence. The Ukrainian Biochemical Journal. 2017;89(2):85-91. doi:10.15407/ubj89.02.085.

10. Smirnov OE, Taran NYu, Kosyan AM, et al. Challenging action of low-dose aluminium on physiological condition of Tartary Buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) plants. The Journal of V.N. Karazin Kharkiv National University. Series: biology. 2014;23:107-116. Ukrainian.

11. Parshykova T.V. Fiziologhiia roslin. Praktykum. Lutsk: VMA Teren; 2010. 416 p. Ukrainian.

12. Semida Wael M, Rady Mostafa M, Abd El-Mageed Taia A, Howladar Saad M, Abdelhamid Magdi T. Alleviation of cadmium toxicity in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants by the exogenous application of salicylic acid. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology. 2015; 90(1): 83-91, doi: 10.1080/14620316.2015.11513157

13. Smirnov OE, Kosyan AM, Kosyk OI, Taran N.Yu. Morphophysiological traits of *Fagopyrum esculentum* in response to aluminium-acid stress. Ukr. Botanical J. 2014; 71 (4): 511-516. Ukrainian.

14. Fedenko VS, Shemet SA, Struzhko VS. Complexation of cyanidin with cadmium ions in solution. Ukrainian Biochem. J. 2005; 77:104-109. doi: 10.13140/RG.2.1.1461.8647

15. Rizwan M et al. A critical review on effects, tolerance mechanisms and management of cadmium in vegetables. Chemosphere. 2017; 182:90-105. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.05.013

16. Varun M et al. Effect of cadmium uptake on growth and physiology of water lettuce. Indian Journal of Weed Science. 2017;49(1):102–104. doi: 10.5958/0974-8164.2017.00028.4

17. Kavylych J, Kobyletska M, Terek O. Influence salicylic acid on content of photosynthetic pigments in plants buckwheat for toxic effects of cadmium chloride. Visnyk of the Lviv University. Series Biology. 2016; 72: 210–217. Ukrainian.

18. Ovrutskaya II. Anatomical and morphological characters of leaves of *Sium latifolium* L. under different growth conditions. Ukr. Botanical J. 2012; 69(1):125-133. Ukrainian.

Надійшла до редколегії 20.08.2018

Отримано виправлений варіант 24.09.2018

Підписано до друку 24.09.2018

Received in the editorial 20.08.2018

Received a revised version on 24.09.2018

Signed in the press on 24.09.2018

И. Хоменко, асп., О. Косык, канд. биол. наук, Н. Таран, д-р биол. наук, проф.
Учебно-научный центр "Институт биологии и медицины",
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

ПАРАМЕТРЫ ВОДНОГО ОБМЕНА РАСТЕНИЙ САЛАТА ПОСЕВНОГО ПРИ ДЕЙСТВИИ ИОНОВ КАДМИЯ

Согласно цели работы исследовано влияние ионов кадмия на показатели водного обмена в растениях *Lactuca sativa* L. двух сортов с различным содержанием антоциановых пигментов (Лоло и Лоло Росса). В работе были использованы однемесячные растения в среду питания которых добавляли 0,1 ммоль кадмия в форме сульфата в течение четырнадцати суток. Исследуемые параметры включали: показатель водного дефицита, относительной туресценции, содержания свободной воды, концентрации клеточного сока, плотности и состояния устьиц, а также индекса толерантности. В работе использованы весовые, рефрактометрические, микроскопические и аналитические методы исследования. Согласно полученным результатам было обнаружено разнонаправленность ответа растений данных сортов салата на действие ионов кадмия. В частности, для зеленого сорта Лоло зафиксировано возрастание водного дефицита в течение экспозиции, снижение параметров оводненности, свободной воды и концентрации клеточного сока от уровня контроля на 14 сутки экспозиции, тогда как для красного сорта Лоло Росса отмечено снижение водного дефицита, рост параметров относительной туресценции и свободной воды на 14 сутки экспозиции на фоне отсутствия достоверной разницы в концентрации клеточного сока. Кроме того, у обоих сортов наблюдалось развитие ксероморфных признаков листьев и особенно плотности устьиц. Однако у зеленого сорта Лоло большинство из них зафиксировано в закрытом состоянии, в отличие от красного сорта Росса. В итоге выявлено, что зеленый и красный сорта салата имеют отличные стратегии приспособления к наличию тяжелых металлов в среде питания. Согласно характеристике параметров водного обмена и стоматографического анализа можно утверждать о более высоких адаптивных возможностях сорта Лоло Росса к данному стрессовому фактору по сравнению с сортом Лоло.

Ключевые слова: ионы кадмия, индекс толерантности, водный обмен, стоматография, *Lactuca sativa* L.

I. Khomenko PhD-stud., O. Kosyk, Associate prof., N. Taran., Dr. Sc., Prof.
Educational and Scientific Center "Institute of Biology and Medicine",
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

WATER EXCHANGE PARAMETERS OF LETTUCE PLANTS UNDER THE ACTION OF CADMIUM IONS

According to the purpose of the work, the effect of cadmium ions on the water exchange parameters in green Lolo and red Lolo Ross varieties of *Lactuca sativa* L. was investigated. In the experiment one-month plants grown on the medium where 0.1 mM cadmium was added in the sulfate form for fourteen days were used. The investigated parameters included: water deficit index, relative turgescence, free water content, cellular juice concentration, stomatal density and condition, and tolerance index. The weighable, refractometric, microscopic and analytical methods of research were used during the investigation. Due to the results, the various plant response to the cadmium ions action in these lettuce varieties was revealed. In particular, the water deficit growth, reduction of the relative turgescence parameter, the free water content and concentration of cellular juice compared with the control level during the exposure was recorded in the green Lolo variety. Whereas, the water deficit decrease, an increase in the parameters of relative turgescence and free water content to the fourteenth day of exposure was noted for the red Lolo Ross variety. And also the absence of a reliable difference in the parameter of the concentration of cell juice. In addition, in both varieties, there was an increase in xeromorphism of the leaf blades, and in particular the stomata density. But in Lolo variety, most were locked in, unlike the Ross variety. According to the characteristics of the water exchange and stomatal analysis, it can be argued about the higher adaptive capacities of the Lolo Ross variety to this stress factor, compared with the Lolo variety.

Key words: Cadmium ions, tolerance index, water exchange, stomata, *Lactuca sativa* L.

УДК 577.25

В. Стецька, студ., Н. Шуставецька, студ., Т. Сергійчук, канд. біол. наук,
Т. Довбинчук, молод. наук. співроб., Г. Толстанов, д-р біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

КІЛЬКІСНИЙ ТА ЯКІСНИЙ СКЛАД МІКРОБІОТИ ДИСТАЛЬНОГО ВІДДІЛУ ТОВСТОЇ КИШКИ ЩУРІВ У РІЗНІ ТЕРМІНИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО 6-ОНДА-ВИКЛИКАНОГО ПАРКІНСОНІЗМУ (ПІЛОТНІ ДОСЛІДЖЕННЯ)

В аспекті існування осі "кишечник–мозок" розглянуто кількісні зміни мікробіоти дистального відділу товстої кишки за умов експериментального паркінсонізму. Дослідження здійснено на лабораторних нелінійних щурах-самцях (140–160 г, $n = 7$). Паркінсонізм моделювали шляхом однобічного руйнування дофамінергічних нейронів компактною частиною чорної субстанції головного мозку, що викликали шляхом стереотаксичних мікроін'єкцій 12 мкг нейротоксина 6-ОНДА (Sigma-Aldrich, Німеччина) у лівий латеральний висхідний пучок. Зміни кількісного складу мікробіоти визначали бактеріологічним методом, висіваючи 10-кратні розведення фекального біоптату на елективні середовища (HiMedia, Індія) через 1, 1.5, 2 місяці після моделювання паркінсонізму. Дослідження показали, що у складі просвітної мікробіоти щурів протягом 2 місяців від початку експерименту достовірні зміни було виявлено лише для *E.coli*. Кількість лак(+) *E.coli* зростала через 1,5 місяця на 2 порядки (з $lg\ 4.65 \pm 0.80$ КУО/г до $lg\ 6.08 \pm 0.70$ КУО/г), а через 2 місяці – з $lg\ 4.39 \pm 0.55$ КУО/г до $lg\ 6.24 \pm 1.26$ КУО/г. Водночас кількість лак(-) *E.coli* знижувалась на 2-3 порядки. Кількість *Bifidobacterium* та *Lactobacillus* залишалась у межах контрольних значень. Через 2 місяці після моделювання паркінсонізму спостерігали тенденцію до збільшення кількості представників роду *Clostridium*. Отримані дані свідчать про незначні зміни мікробіоти за розвитку 6-ОНДА-викликаного паркінсонізму. Наведені результати є попередніми і потребують більш детального вивчення.

Ключові слова: мікробіота, хвороба Паркінсона, нейродегенерація.

Вступ. Хвороба Паркінсона (ХП) – це повільно прогресуюче нейродегенеративне захворювання, для якого характерна загибель дофамінергічних нейронів чорної субстанції (substantia nigra) головного мозку [1]. За статистичними даними Міністерства охорони здоров'я, нині в Україні на ХП страждають понад 75 тисяч чоловік. Ця хвороба діагностується з частотою 145 випадків на 100 тис. населення. Незважаючи на традиційні уявлення про віковий характер ХП, трапляються випадки захворювань у більш молодому віці: приблизно кожен десятий пацієнт хворіє на ХП у віці до 50 років, а кожен двадцятий – до 40 років [2].

Протягом останнього десятиліття стало відомо про двонаправлений взаємозв'язок між шлунково-кишковим трактом (ШКТ) та центральною нервовою системою (ЦНС), або так звану вісь "кишечник–мозок", яка в свою чергу стимулювала перегляд концепцій, щодо патогенезу захворювань ЦНС, в тому числі ХП [3, 4].

Одним з механізмів регуляторного впливу кишкової мікробіоти, що регулює стан ЦНС є активація чотирьох типів *toll*-подібних рецепторів (TLR-2, TLR-3, TLR-4, TLR-7) [5]. Ці рецептори зв'язуються з бактеріальними пептидами і викликають активацію нейронів ШКТ, в тому числі аферентних. З іншого боку бактерії здатні виробляти серотонін, мелатонін, γ -аміномасляну кислоту (ГАМК), гістамін та ацетилхолін, які відомі, як медіатори ЦНС та периферійної нервової системи. Порушення синтезу цих молекул потенційно може викликати зміни в стані ЦНС і сприяти ускладненню захворювання [6].

На сьогодні існує дві позиції щодо першопричин розвитку ХП: одні схиляються до гіпотези Браака, що ХП є багатоцентровим нейродегенеративним процесом, який впливає на кілька нейрональних структур за межами чорної субстанції, серед яких – ентєральна нервова система (ЕНС). Тому помітні розлади з боку ШКТ розвиваються на ранній стадії захворювання (раніше залучення ЦНС), через токсичні та прозапальні субстанції, які проникають у системну циркуляцію з просвіту товстої кишки, в результаті підвищення проникності його епітелію. Інша частина науковців схиляється до того, що зміни у функціонуванні кишечника та кишкової мікробіоти не є центральним чинником в розвитку ХП, а є вторинними причинами нейродегенерації, які приєднуються згодом. Тому ретельне дослідження механізму патогенезу ХП не втрачає своєї актуальності [7].

Було виявлено, що 20–77 % пацієнтів з ХП ще задовго до прояву моторних симптомів страждають на дисфункції ШКТ, такі як гастропарези, анорексії, відчуття переповнення шлунку, нудоти; патологію дистального відділу кишечника (у вигляді закріпів, зниження швидкості кишкового транзиту) [8, 9]. Ці розлади є серйозною супутньою патологією даної хвороби [10]. Недавні дослідження показали високу поширеність (54–67 %) надмірної колонізації тонкої кишки в разі ХП та можливу їх асоціацію із симптомами запалень ШКТ і зниженою моторикою шлунку [11, 12].

Таким чином, визначення змін нормобіоти кишечника може бути прогностичним фактором та критерієм для формування груп ризику розвитку ускладнень перебігу ХП, а також основою для розробки нових пробіотичних препаратів, що підтримують інтегративну цілісність кишкового бар'єру і нормального функціонування осі "кишечник-мозок", на основі специфічних змін мікробіоти ШКТ в разі ХП.

Метою цієї роботи було дослідження кількісного та якісного складу просвітної мікробіоти товстої кишки в різні терміни після моделювання 6-гідроксидофаміні (6-ОНДА)-викликаного паркінсонізму у щурів.

Матеріали та методи. Об'єктом дослідження була просвітна мікробіота товстої кишки щурів. Дослідження проведені на лабораторних білих нелінійних щурах-самцях (140–160 г, $n = 7$), які утримувались за стандартних умов щодо температури (21–23 °C), освітлення (12/12 год), вологості (30–35 %) та раціону харчування (повнораціонний корм для лабораторних тварин K-12-4) віварію ННЦ "Інститут біології та медицини". Експерименти здійснювали згідно з вимогами біоетичної комісії Київського національного університету імені Тараса Шевченка.

Паркінсонізм моделювали в 4 щурів шляхом однобічного руйнування дофамінергічних нейронів компактною частиною чорної субстанції, що викликали шляхом стереотаксичних мікроін'єкцій 12 мкг селективного нейротоксина 6-ОНДА (Sigma-Aldrich, Німеччина) в лівий латеральний висхідний передньомозговий пучок [13]. Контрольній групі тварин ($n = 3$) вводили фізіологічний розчин. Через 2 тижні після операції у щурів з 6-ОНДА-ХП оцінювали відсоток зруйнованих нейронів відповідно до результатів апоморфінового тесту [13]. Тваринам вводили апоморфін в дозі 0,5 мг/кг, внутрішньочеревинно

(Sigma-Aldrich, Німеччина) та спостерігали за їх обертальною поведінкою протягом 30 хв. У щурів, що мали чітку циркуляторну активність з інтенсивністю < 180 об/30 хв, у результаті дії 6-OHDA було зруйновано в середньому 86 % дофамінергічних нейронів ($n = 2$), а з інтенсивністю > 180 об/30 хв – майже 100 % ($n = 2$).

Для дослідження просвітної мікробіоти, відбирали 1 г фекалій та гомогенізували їх в 9 мл стерильного 0,5 % розчину хлориду натрію. З отриманого гомогенату готували робочі десятикратні розведення (10^{-1} – 10^{-8}). Кількісний та якісний склад мікробіоти визначали посівом робочих розведень на диференційно-діагностичні середовища з селективними властивостями (HiMedia, Індія). Культивували при 37°C, обрахунок колоній здійснювали через 24–48 год. Ідентифікацію виділених мікроорганізмів робили за морфологічними та тинкторіальними властивостями. Результати представляли у вигляді Іг колонієутворюючих одиниць (КУО) в 1 г фекалій (Іг КУО/г).

Динаміка рухових розладів у щурів з 6-OHDA-індукованою моделлю ХП свідчить про те, що ступінь вираження симптомів хвороби досягає максимуму через 1 місяць після хірургічного втручання. Тому, дослідження здійснювали через 1, 1,5 та 2 місяці після моделювання ХП. Початком експерименту вважали перший день введення 6-OHDA або контрольної речовини.

Статистичний аналіз даних здійснювали з використанням програми Statistica 8.0. Для кожної з вибірок перевіряли чи є нормальним розподіл досліджуваного показника, застосовуючи критерій Шапіро–Вілка. Для порівняння вибірок підраховували середнє арифметичне та середнє статистичне відхилення. Достовірність різниці між порівнюваними групами оцінювали за допомогою t-критерію Стюдента. Статистично значущою для всіх показників вважали різницю $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення. Під час бактеріологічного аналізу змін мікробіоти передусім звертали увагу на кількісні зміни представників анаеробно-цукролітичної мікробіоти (табл. 1). Оскільки відомо, що *Bifidobacterium* та *Lactobacillus* здатні синтезувати ГАМК, яка є основним гальмівним нейромедіатором ЦНС і мішенню для великого арсеналу ліків. На відміну від його ролі в ЦНС, ГАМК залучається до ЕНС, зокрема через GABA_A-рецептори. ГАМК стимулює моторику ШКТ, а також забезпечує перистальтичний рефлекс товстої кишки. Слід відміти, що ГАМК не перетинає гематоенцефалічний бар'єр, проте її участь в осі "кишечник-мозок" є доведеною [14]. У наших дослідженнях кількісні показники представників родів *Bifidobacterium* та *Lactobacillus* залишалися в межах контрольних значень протягом усього експерименту.

Таблиця 1. Зміни просвітної мікробіоти дистального відділу товстої кишки щурів у різні терміни 6-OHDA-індукованого паркінсонізму

Група мікроорганізмів	1 місяць		1,5 місяця		2 місяці	
	Контроль $n = 3$	Паркінсонізм $n = 4$	Контроль $n = 3$	Паркінсонізм $n = 4$	Контроль $n = 3$	Паркінсонізм $n = 4$
<i>Bifidobacterium spp.</i>	8,10±0,17	8,05±0,09	8,74±2,46	8,20±0,40	8,96±0,22	8,67±0,32
<i>Lactobacillus spp.</i>	8,47±0,29	8,47±0,12	7,35±0,92	7,55±0,71	7,04±0,79	7,25±0,75
<i>Clostridium spp.</i>	2,73±0,37	2,95±0,00	2,95±0,00	2,95±0,00	2,95±0,00	3,21±0,53
<i>E. coli</i> лактозопозитивна	5,10±0,17	5,02±1,70	4,65±0,80	6,08±0,70*	4,39±0,55	6,24±1,26*
<i>E. coli</i> лактозонегативна	3,10±0,17	0,58±1,15*	4,74±0,37	1,50±3,00*	2,50±2,83	0,00±0,00*
Умовно-патогенні ентеробактерії	0,00±0,00	0,00±0,00	1,24±1,75	1,86±1,24	1,35±1,90	0,00±0,00
<i>Staphylococcus aureus</i>	4,33±0,35	4,15±0,43	4,54±0,34	4,95±1,10	4,24±0,34	4,27±0,20
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3,63±0,32	3,40±0,89	2,74±0,37	2,50±3,00	3,75±0,07	4,52±0,33*
Дріжджі та дріжджеподібні гриби роду <i>Candida</i>	5,03±0,28	6,57±0,25	5,30±1,41	5,78±0,15	6,59±0,16	6,53±0,65

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

Роль представників роду *Clostridium* в організмі людини має досить суперечливий характер: з одного боку вони є одними з основних продуцентів бутирату, який є енергетичним субстратом для епітеліоцитів кишечника; з іншого боку, нещодавно виявлено, що *Clostridium sporogenes* здатен виробляти нейротрансмітерний триптамін через декарбоксілювання триптофану. У мозку триптамін відіграє важливу роль у пригніченні реакції на 5-HT-серотонінові рецептори через його дію на рецептор, пов'язаний з аміном, і може модулювати настрої та апетит. Хоча триптамін насправді може перетинати гематоенцефалічний бар'єр із сироватки, але поки невідомо, чи триптамін, що виробляється кишковою мікробіотою переноситься з травного тракту до ЦНС і чи потім впливає на неврологічні функції [15].

За модельованого нами паркінсонізму, у щурів достовірних змін у складі представників роду *Clostridium* зареєстровано не було, помічали лише тенденцію до їх збільшення через 2 місяці від початку експерименту.

Бактерії, що метаболізують лактозу, розглядалися як лактозопозитивні *Escherichia coli*, а бактерії, що не здатні до ферментації – як лактозонегативні *E.coli*. Наприклад, чисельність лактозопозитивної *E.coli* достові-

рно ($p < 0,05$) зростала через 1,5 та 2 місяці від початку експерименту. Водночас кількість лактозонегативної *E.coli* знижувалась на 2-3 порядки.

Тенденції до збільшення кількості *E.coli*, яка у своїй клітинній стінці має ліпополісахарид (ЛПС), здатна індукувати локальний синтез альфа-синуклеїну, що може сприяти розвитку нейродегенеративного процесу. З одного боку, доведеною є роль ЛПС, як ендотоксинів, що сприяють розвитку нейропорушень, зокрема – судомам, а з іншого боку, нещодавно (у 2017 році) вченими з Мічиганського університету та Імперського коледжу Лондона доведено, що *E.coli* продукує протеїн, здатний інгібувати токсичний амілоїд, що накопичується в разі ХП та інших нейродегенеративних захворювань. Амілоїд утворюється внаслідок накопичення протеїнів всередині клітин тканини, де він викликає загибель клітин і, як наслідок, порушення нормального функціонування органу. Кишкова паличка здатна продукувати амілоїд у вигляді волокон карліну, які відкладаються не у середині клітини, а ззовні, що не призводить до загибелі клітин [16].

У ході експерименту, також визначалися бактерії за своєю здатністю зброджувати маніт: патогенний *Staphylococcus aureus*, який здатний до ферментації, і сапро-

фітний *Staphylococcus epidermidis*, який маніт не ферментує. Було показано, що чисельність *Staphylococcus epidermidis* достовірно збільшувалася через 2 місяці після моделювання паркінсонізму в 1,5 раза порівняно з контролем. Водночас кількість *Staphylococcus aureus* залишалася незмінною протягом усього експерименту.

Ali Keshavarzian з колегами показали, що зміна мікробіоти товстої кишки та дисбактеріоз може бути механізмом нейрозапалення, що призводить до розвитку ХП. Вони також показали, що відбуваються зміни у кількісному складі таксонів бактерій. У хворих на ХП зменшується кількість бактерій родини *Bifidobacteriaceae* та збільшується чисельність *Bacteroidaceae*, *Clostridiaceae*, *Enterobacteriaceae* [12].

Отримані дані свідчать про незначні зміни мікробіоти за розвитку 6-OHDA-викликаного паркінсонізму. Проте, проведені нами дослідження мають ряд обмежень: по-перше, використаний нами метод бактеріологічного посіву дозволяє ідентифікувати лише 10 % мікроорганізмів здатних до культивування в стандартних умовах; по-друге – досліджували мікробіоту фекального біоптату, яка є наближеною до клінічної практики, тоді як склад приєпітальної мікробіоти та склад слизу є більш достовірним показником стану кишкового бар'єру.

Загалом, зміни мікробіоти ШКТ можна розглядати, як наслідок розвитку ХП. Оскільки, нервова система здатна впливати на кишечник та його нормобіоту через зміни моторики, секреції ферментів, гормонів, компонентів слизового бар'єру і т. д. У наших попередніх дослідженнях було виявлено, що у щурів з 6-OHDA-викликаним паркінсонізмом спостерігається затримка моторики товстої кишки [17]. Ці зміни можуть бути використані як ранній біомаркер розвитку ХП, коли нейро-моторні симптоми ще не проявляються.

Висновки. Нами виявлено, що розвиток експериментального паркінсонізму асоціюється зі змінами складу просвітної мікробіоти, які прогресують у часі. Зокрема, з другого місяця від початку експерименту помічали тенденцію до зростання представників роду *Clostridium*; кількість *E.coli*, що ферментує лактозу, достовірно зростала на 2 порядки, і зовсім не висівалися її лактозонегативні представники; реєстрували помірне зростання манітонегативних представників роду *Staphylococcus*.

Список використаних джерел:

1. *Cacabelos R.* Parkinson's Disease: From Pathogenesis to Pharmacogenomics // *R. Cacabelos*. // *Int. J. Mol. Sci.* – 2017. – Vol. 18, № 3. – 551 p.
2. Хольба М. Ю. Досягнення у вивченні та лікуванні хвороби Паркінсона в Україні / М. Ю. Хольба, І. О. Погорілова, В. М. Грінкевич // 36. наук. пр. VIII Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю "Біологічні дослідження-2017". – 2017. – 312 с.
3. Gut microbiota and brain function: an evolving field in neuroscience / J. A. Foster et al. // *Int. J. Neuropsychopharmacol.* – 2016. – Vol. 19, № 5. – P. 1–7.
4. Sherwin E. Recent developments in understanding the role of the gut microbiota in brain health and disease // E. Sherwin, T. G. Dinan, J. F. Cryan // *Ann N Y Acad Sci.* – 2017. – Vol. 1420, № 1. – P. 5–25.
5. Toll-like receptors 3, 4, and 7 are expressed in the enteric nervous system and dorsal root ganglia / I. Barajon, G. Serrao, F. Amaboldi et al. // *J. Histochem. Cytochem.* – 2009. – Vol. 57 (11). – P. 1013–1023.
6. Oleskina A. V. Role of Neuromediators in the Functioning of the Human Microbiota: "Business Talks" among Microorganisms and the Microbiota-Host Dialogue / A. V. Oleskina, G. I. El'Registan, B. A. Shenderov // *Microbiology.* – 2016. – № 1. – P. 1–22.
7. The second brain and Parkinson's disease / T. Lebouvier et al. // *Eur J Neurosci.* – 2009. – Vol. 30, № 5. – P. 735–741.
8. Рабаданова Е. А. Немоторные симптомы болезни Паркинсона, их структура и влияние на качество жизни пациентов / Е. А. Рабаданова, М. А. Гельпей, З. А. Гончарова // *Практическая медицина.* – 2015. – Т. 90, № 5. – С. 111–115.

9. Sveinbjornsdottir S. The clinical symptoms of Parkinson's disease / S. Sveinbjornsdottir // *J. of Neurochemistry.* – 2016. – Vol. 139. – P. 318–324.
10. Constipation: an emerging risk factor for Parkinson's disease? / P. Stirpe et al. // *Eur J Neurol.* – 2016. – Vol. 23, № 11. – P. 1606–1613.
11. Gastrointestinal dysfunction in Parkinson's disease / A. Fasano et al. // *Lancet Neurol.* – 2015. – Vol. 14, № 6. – P. 625–639.
12. Colonic Bacterial Composition in Parkinson's Disease / A. Keshavarzian et al. // *Mov. Disord.* – 2015. – Vol. 30, № 10. – P. 1351–1360.
13. Pharmacoprotective Influences on Different Links of the Mechanism Underlying 6-Hydroxydopamine-Induced Degeneration of Nigro-Striatal Dopaminergic Neurons / S. A. Talanov et al. // *Neurophysiology.* – 2006. – Vol. 38, № 2. – P. 150–156.
14. Neurotransmitters: The critical modulators regulating gut-brain axis / R. Mittal et al. // *J Cell Physiol.* – 2017. – Vol. 232, № 9. – P. 2359–2372.
15. Control of Brain Development, Function, and Behavior by the Microbiome / T. R. Sampson et al. // *Cell Host Microbe.* – 2015. – Vol. 17, № 5. – P. 565–576.
16. Evans M. L. The bacterial curli system possesses a potent and selective inhibitor of amyloid formation / M. L. Evans et al. // *Mol Cell.* – 2015. – Vol. 57, № 3. – P. 445–455.
17. The disturbance of central dopaminergic neurons in rat model of parkinson's disease increases susceptibility to colonic inflammation / T. Chervinska et al. // *23rd United European Gastroenterology Week.* – 2015. – Barcelona, Spain. – 444 p.

References:

1. *Cacabelos R.* Parkinson's Disease: From Pathogenesis to Pharmacogenomics. *Int. J. Mol. Sci.* 2017. 7(12):1261-72. doi: 10.3390/ijms18030551.
2. Kholba M. Yu., Pohorilova I. O., Hrinkevych V. M. [Dosiagnennia u vyvchenni ta likuvanni khvoroby Parkinsona v Ukraini]. *Zbirnyk naukovykh prats VIII Vseukrainskoi naukovo-praktychnoi konferentsii z mizhnarodnoiu uchastiu "Biologichni doslidzhennia-2017"*; 2017 March 14-16; Zytomyr.
3. Foster JA, Lyte M, Meyer E, Cryan JF. Gut microbiota and brain function: an evolving field in Neuroscience. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2016. 19(5). pii: pyv114. doi: 10.1093/ijnp/pyv114.
4. Sherwin E, Dinan TG, Cryan JF. Recent developments in understanding the role of the gut microbiota in brain health and disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2017. 1420(1):5-25. doi: 10.1111/nyas.13416.
5. Barajon I, editors. Toll-like receptors 3, 4, and 7 are expressed in the enteric nervous system and dorsal root ganglia. *J Histochem Cytochem.* 2009 Nov;57(11):1013-23. doi: 10.1369/jhc.2009.953539.
6. Oleskina AV, El'Registan GI, Shenderov BA. Role of Neuromediators in the Functioning of the Human Microbiota: "Business Talks" among Microorganisms and the Microbiota-Host Dialogue. *Microbiology.* 2016. 85(1):1–22.
7. Lebouvier T., editors. The second brain and Parkinson's disease. *Eur J Neurosci.* 2009 Sep;30(5):735-41. doi: 10.1111/j.1460-9568.2009.06873.x.
8. Rabadanova EA. Gel'pej MA, Goncharova ZA. [Nemotornye simptomy bolezni Parkinsona, ih struktura i vlianie na kachestvo zhizni pacientov]. *Prakticheskaja medicina.* 2015. 90(5):111-115. Russian.
9. Sveinbjornsdottir S. The clinical symptoms of Parkinson's disease. *J. of Neurochemistry.* 2016. 1:318-324. doi: 10.1111/jnc.13691.
10. Stirpe P, Hoffman M, Badiali D, Colosimo C. Constipation: an emerging risk factor for Parkinson's disease? *Eur J Neurol.* 2016. 23(11):1606-1613. doi: 10.1111/ene.13082.
11. Fasano A, Visanji NP, Liu LW, Lang AE, Pfeiffer RF. Gastrointestinal dysfunction in Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 2015. 14(6):625-39. doi: 10.1016/S1474-4422(15)00007-1.
12. Keshavarzian A, editors. Colonic Bacterial Composition in Parkinson's Disease. *Mov. Disord.* 2015. 30(10):1351-60. doi: 10.1002/mds.26307.
13. Talanov S. A., Oleshko N. N., Tkachenko M. N., Sagach V. F. Pharmacoprotective Influences on Different Links of the Mechanism Underlying 6-Hydroxydopamine-Induced Degeneration of Nigro-Striatal Dopaminergic Neurons *Neurophysiology.* 2006 March-April; 38(2):150-156.
14. Mittal R, editors. Neurotransmitters: The critical modulators regulating gut-brain axis. *J Cell Physiol.* 2017. 232(9): 2359–2372. doi: 10.1002/jcp.25518.
15. Timothy R. Sampson, Sarkis K. Mazmanian. Control of Brain Development, Function, and Behavior by the Microbiome. *Cell Host Microbe.* 2015. 17(5): 565–576. doi: 10.1016/j.chom.2015.04.011
16. Evans M.L., editors. The bacterial curli system possesses a potent and selective inhibitor of amyloid formation. *Mol Cell.* 2015 Feb 5;57(3):445-55. doi: 10.1016/j.molcel.2014.12.025.
17. Chervinska T., editors. The disturbance of central dopaminergic neurons in rat model of Parkinson's disease increases susceptibility to colonic inflammation. *23rd United European Gastroenterology Week;* Oct 15-19; Barcelona, Spain; 2015.

Надійшла до редколегії 15.08.2018

Отримано виправлений варіант 17.09.2018

Підписано до друку 17.09.2018

Received in the editorial 15.08.2018

Received a revised version on 17.09.2018

Signed in the press on 17.09.2018

В. Стецкая, студ., Н. Шуставецкая, студ., Т. Сергийчук, канд. биол. наук, Т. Довбинчук, мл. науч. сотр., Г. Толстанова, д-р биол. наук
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ И КАЧЕСТВЕННЫЙ СОСТАВ МИКРОБИОТЫ ДИСТАЛЬНОГО ОТДЕЛА ТОЛСТОЙ КИШКИ КРЫС В РАЗНЫЕ СРОКИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО 6-OHDA-ВЫЗЫВАЕМОГО ПАРКИНСОНИЗМА (ПИЛОТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

В аспекте существования оси "кишечник-мозг" рассмотрено количественные изменения микробиоты дистального отдела толстой кишки экспериментальному паркинсонизму. Исследования проведены на лабораторных нелинейных крысах-самцах (140–160 г, n = 7). Паркинсонизм моделировали путем одностороннего разрушения дофаминергических нейронов компактной части черной субстанции головного мозга, вызывали путем стереотаксическим микроинъекций 12 мкг нейротоксина 6-OHDA (Sigma-Aldrich, Германия) в левый латеральный восходящий пучок. Изменения количественного состава микробиоты определяли бактериологическим путем при посеве 10-кратных разведений фекального биоптата на элективные среды (HiMedia, Индия) через 1, 1.5, 2 месяца после моделирования паркинсонизма. Исследования показали, что в составе просветной микробиоты крыс в течение 2 месяцев с начала эксперимента, достоверные изменения были выявлены только для *E.coli*. Количество лак (+) *E.coli* вырастала с 1,5 месяцев на 2 порядка (с 4.65 ± 0.80 КОЕ/г до 6.08 ± 0.70 КОЕ/г, а через 2 месяца – 4.39 ± 0.55 КОЕ/г до 6.24 ± 1.26 КОЕ/г. В то же время количество лак(-) *E.coli* снижалась на 2-3 порядка. Количество *Bifidobacterium* и *Lactobacillus* оставалась в пределах контрольных значений. Через 2 месяца после моделирования паркинсонизма наблюдалась тенденция к увеличению количества представителей рода *Clostridium*. Полученные нами данные свидетельствуют о незначительных изменениях микробиоты при развитии 6-OHDA-вызванного паркинсонизма. Данные результаты являются предварительными и требуют более подробного изучения.

Ключевые слова: микробиота, болезнь Паркинсона, нейродегенерация.

V. Stetska, stud., N. Shystavetska, stud., T. Serhiychuk, PhD, T. Dovbynychuk, JRF, G. Tolstanova, Dr. Sc.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

QANTITATIVE AND QUALITATIVE MICROBIOTA COMPOSITION OF THE DISTAL COLON OF RATS IN DIFFERENT TERMS OF EXPERIMENTAL 6-OHDA-INDUCED PARKINSONISM (PILOT STUDY)

In the aspect of the existence of the gut brain axis are considered quantitative changes of the distal part of colon's microbiota (Mb) under conditions of experimental parkinsonism. Studies were done on laboratory non-linear male rats (140–160 g, n = 7). Parkinsonism was modeled by one-sided destruction of the dopaminergic neurons of a compact part of the substantia nigra of brain, causing by stereotaxic microinjections 12 mg neurotoxin 6-OHDA (Sigma-Aldrich, Germany) in the left lateral ascending bundle. Changes in the quantitative Mb composition were determined bacteriologically by sowing 10-fold dilutions of fecal biopsy on differential diagnostic media (HiMedia, India) in 1, 1.5, 2 months after induced parkinsonism. Research has been shown that within the fecal Mb of rats, within 2 months from the beginning of the experiment, significant changes were detected only for *E.coli*. The amount of lac(+) *E.coli* increased from 1.5 months to 2 folds (from 4.65 ± 0.80 CFU/g to 6.08 ± 0.70 CFU/g (1.5 months), after 2 months – from 4.39 ± 0.55 CFU/g to 6.24 ± 1.26 CFU/g. At the same time, the amount of *E.coli* lac(-) decreased by 2-3 folds. The number of the genus *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* remained within the control values. After 2 months after induced parkinsonism, there was a tendency to increase the number of *Clostridium* species. These results suggest minor microbiota changes of 6-OHDA-induced parkinsonism in rats. These results are preliminary and require more detailed study.

Key words: microbiota, Parkinson's disease, neurodegeneration.

УДК 577.217.5

Л. Коломієць, в. о. наук. співроб.
Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ, Україна,
В. Засць, канд. біол. наук, О. Цуварєв, мол. наук. співроб.
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна,
О. Корнелюк, чл.-кор. НАН України, д-р біол. наук, проф.
Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ, Україна

ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ НАНОКОМПОЗИТНОГО КОМПЛЕКСУ ЦИТОКІНУ ЕМАР II З ДЕКТРАНОМ 70 НА ОРГАНІЗМ МИШЕЙ ЛІНІЇ BALB/C

Цитокін ЕМАР II – ендотеліальний та моноцитарноактивуючий поліпептид II, попередником якого є компонент високомолекулярного комплексу аміноацил-тРНК-синтетази вищих еукаріот білок p43, здатен модулювати властивості ендотеліальних клітин, моноцитів та лейкоцитів. У малих концентраціях цитокін стимулює, а у великих – пригнічує міграцію ендотеліальних клітин, стимулює їх апоптоз, впливає на активність моноцитів, нейтрофілів, макрофагів, сприяючи таким чином запальним та некротичним процесам у злоякісних пухлинах. Одним із перспективних напрямів таргетної терапії онкозахворювань є використання антиангіогенних, прокоагулятивних та проапоптичних лікарських засобів, що стало основою для вибору об'єктом досліджень протипухлинного цитокіну ЕМАР II.

В Інституті молекулярної біології і генетики НАН України розроблено біотехнологію експресії рекомбінантного ЕМАР II у клітинах *E.coli* BL21(DE3) та виділення високоочищених препаратів цитокіну в препаративних кількостях. Для підвищення стабільності та зниження агрегації рекомбінантного ЕМАР II розроблено науково-методичні основи створення та отримано наноконкомпозитний комплекс цитокіну ЕМАР II з біосумісними полімерами циклодекстринами та декстраном 70. У цій експериментальній роботі досліджено вплив наноконкомпозитного комплексу ЕМАР II з декстраном-70 на організм тварин із метою визначення безпечності його застосування. Як об'єкт досліджень було використано мишей лінії BALB/C. Експериментальні дослідження показали, що в разі гострого та хронічного введення препарату тваринам в дозах 300–10 000 мкг/кг не спостерігається загальнотоксичної дії наноконкомпозитного комплексу на організм мишей. Отримані дані відкривають перспективу подальшого дослідження протипухлинних властивостей наноконкомпозитного комплексу ЕМАР II з декстраном-70 з метою можливого подальшого впровадження в фармакологічну практику.

Ключові слова: наноконкомпозитний комплекс ЕМАР II, гостра токсичність, хронічна токсичність.

Створення нових біомедичних препаратів на основі рекомбінантних білків є одним з пріоритетних напрямів сучасної біотехнології [1]. На сьогодні для отримання функціонально активних рекомбінантних білків розроблено декілька гетерологічних систем, які містять клітинні лінії ссавців, клітини дріжджів і бактерій, а також бакуловірусні системи на основі клітинних ліній комах [2,

3]. Найбільш вживаною серед них є бактеріальна система на основі *E.coli* завдяки наявності великої кількості ефективних експресуючих векторів, можливості швидкого та дешевого отримання великої кількості рекомбінантних білків в нативному стані, простоті їх виділення та очищення, що є необхідною умовою впровадження в біотехнологічне виробництво [4].

Розроблений в Інституті молекулярної біології і генетики НАН України протипухлинний нанокмпозитний комплекс ЕМАР ІІ (endothelial monocyte-activating polypeptide ІІ) з декстраном 70, у якому активним компонентом виступає білок із протипухлинними властивостями ЕМАР ІІ, є перспективним біотехнологічним продуктом для досліджень [5].

Білок ЕМАР ІІ є мультифункціональним цитокінподібним білком, який утворюється у злоякісних пухлинах ссавців завдяки альтернативному сплайсингу та посттрансляційному процесингу його попередника – білка р43 [6, 7]. Виявлено здатність ЕМАР ІІ у малих концентраціях стимулювати, а у великих – пригнічувати міграцію ендотеліальних клітин, стимулювати їх апоптоз та аутофагію [8–10], впливати на активність моноцитів, нейтрофілів і макрофагів, сприяючи запальним процесам в пухлинах [11]. Відоме застосування цитокіну ЕМАР ІІ як засобу, який проявляє протипухлинну дію на ріст карциноми передміхурової залози [12], аденокарциноми підшлункової залози [13] та гліом [10, 13]. Реконбінантний ЕМАР ІІ виявляє ті самі властивості, що й нативний білок. Для нього характерні протипухлинна активність, гальмування проліферації клітин, стимулювання апоптозу, участь в ангіогенезі та ембріогенезі [12–14].

Нанокмпозитний комплекс ЕМАР ІІ з декстраном 70 створено з метою стабілізації реконбінантного білка в процесі ліофілізації, зниженню його агрегації, та пролонгації терапевтичної дії препарату. На трансформованих лінійних клітин L929 (фібробласти зі сполучної тканини миші С3Н/Ап, сублінія "а"), отриманих з клітинного банку Інституту експериментальної онкології та радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України, та ліній клітин РСТ (тестикули поросяти), отриманих з колекції Інституту ветеринарної медицини УААН, було показано, що в разі концентрації нанокмпозитного комплексу ЕМАР ІІ 50 мкг/мл спостерігається зниження кількості клітин в моношарі порівняно з контролем [15]. У зв'язку з цим метою нашої роботи було дослідження впливу нанокмпозитного комплексу ЕМАР ІІ на організм тварин.

Матеріали і методи. Експресія, виділення та очищення реконбінантного білка ЕМАР ІІ з клітин *E.coli*. У роботі використано штам-продуцент реконбінантних білків, отриманий на основі реципієнта *E.coli* BL21(DE3)pLysE. Клітини були трансформовані за загальноприйнятою методикою плазмідною конструкцією рЕТ30а-ЕМАР ІІ, що містила ген, який кодує синтез цільового білка ЕМАР ІІ під контролем промотора фага Т7. Селективним маркером плазміди рЕТ30а є ген *kan*, який забезпечує стійкість трансформованих клітин до антибіотика канаміцина.

Штам-продуцент *E.coli* BL21(DE3)pLysE вирощували на середовищі Luria-Bertani (LB) з додаванням антибіотика канаміцина до кінцевої концентрації 30 мкг/мл. Культуру *E.coli* інкубували при температурі 37 °С та інтенсивному струшуванні (250 об/хв.) до досягнення нею оптичної густини 0,5–0,7 опт. од. Оптичну густину (ОГ₆₀₀) визначали спектрофотометрично (спектрофотометр BioMate-5, Велика Британія) за довжини хвилі 600 нм.

Для індукції синтезу реконбінантного білка до культурального середовища додавали індуктор ІПТГ (ізопропіл-β-тіогалактопіранозид, Sigma, США) до кінцевої концентрації 1,25 мМ та інкубували культуру при 37 °С протягом 4 годин після індукції експресії.

Реконбінантний білок отримували із супернатанту клітин *E.coli* після їх лізису ультразвуком методом метал-хелатуючої хроматографії на колонці з Ni-NTA агарозою (Qiagen, Germany) [16]. Аналіз бактеріальних білків виконували за допомогою SDS-гель-

електрофорезу за методом Леммлі в денатуруючих умовах у 12 % розділяючому гелі [17], використовуючи суміш маркерних білків виробництва Thermo Scientific (Литва). Гелі фарбували Coomassie blue R-250.

Нанокмпозитний комплекс ЕМАР ІІ отримували шляхом додавання до реконбінантного білка ліганду полісахариду декстран-70 у концентрації 1,5 % [2]. Для дослідження використовували нанокмпозитний комплекс ЕМАР ІІ у вигляді ліофілізованого порошку білого кольору в ампулі з концентрацією 0,1 мг. Нанокмпозитний комплекс добре розчиняється у дистильованій воді та фізіологічному розчині протягом декількох секунд з утворенням прозорого розчину.

Токсикологічні випробовування. Токсикологічні випробовування нанокмпозитного комплексу здійснювали на лабораторних самцях мишей лінії Balb/c, вирощених у віварії Інституту молекулярної біології і генетики НАН України згідно зі стандартними вимогами щодо доклінічних досліджень лікарських засобів. Тварини утримувались в умовах віварію в стандартних клітках на підстилці з тирси дерев згідно з правилами групового тримання тварин. Харчовий раціон містив зерно, овочі, брикети з вітамінами та мінеральними складовими. Доступ до води був вільним, світловий режим природний. Для досліду відбирали здорових тварин з гладким шерстним покривом, нормальною активністю. Із загальної кількості відібраних тварин формували рівноцінні групи й розміщували по окремих клітках. Для приготування робочих розчинів використовували стерильну воду для ін'єкцій. Препарат тваринам вводили внутрішньом'язово в обсязі 0,1 мл/10 г маси тіла. Дози розраховували в мкг/кг маси тіла тварини. Як плацебо використовували воду для ін'єкцій. Експериментальні дослідження виконували на 24 мишах вагою 20–25 г. Нанокмпозитний комплекс вводили одноразово мишам в дозах 300 мкг/кг, 1000 мкг/кг та 10000 мкг/кг, які перевищують очікувану терапевтичну дозу в 30–1000 разів. В експерименті оцінювали такі показники: 14-добову летальність (реєструвалася щоденно), загальний стан, поведінку, збудливість та рухову активність тварин, динаміку зростання маси тіла, порушення пози та координації рухів, макроскопічні зміни внутрішніх органів.

Для оцінки можливості хронічного впливу нанокмпозитного комплексу на організм тварин використовували самців мишей лінії BALB, віком 2–3 місяці. Нанокмпозитний препарат ЕМАР ІІ підшкірно вводили мишам в дозах 300, 1000 мкг/кг маси тіла, що перевищує терапевтичну дозу в 30 та 100 разів відповідно протягом 30 діб. Загальну дію нанокмпозитного комплексу ЕМАР ІІ оцінювали за динамікою маси тіла тварин під час зважування 2 рази на тиждень. Вегетативний статус оцінювали по стану слизових, шерстяного покриву, наявності саливації, діареї, охайності тварин. Контрольна група мишей отримувала воду для ін'єкцій.

Результати та їх обговорення. Експресія, виділення та очистка реконбінантного білка АІМР1/р43 з клітин *E.coli*. Білок ЕМАР ІІ було експресовано в клітинах *E.coli* BL21(DE3)pLysE, як описано вище. Після здійснення бактеріальної експресії виконували афінне очищення реконбінантного білка ЕМАР ІІ металхелатуючою хроматографією на Ni-NTA-агарозі. У результаті очищення отримано препарат білка ЕМАР ІІ високого ступеня чистоти (близько 95 %, рис. 1).

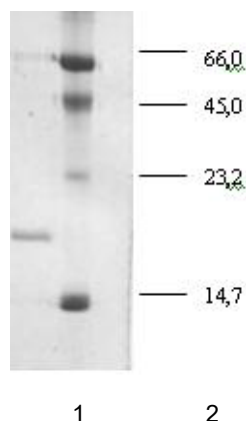


Рис. 1. Електрофоретичний контроль чистоти отриманого препарату ЕМАРІІ.

1 – препарат ЕМАР ІІ після хроматографічного очищення;
2 – білкові маркери (Thermo Scientific)

Дослідження токсичного впливу нанокм-позитного комплексу ЕМАР ІІ на тварин. Раніше під час дослідження *in vivo* впливу рекомбінантного ЕМАР ІІ на розвиток ксенографтів аденокарциноми простати людини в організмі дорослих мишей лінії СВА було показано, що препарат в дозах 10, 100 та 200 мкг/кг ваги тварин у разі систематичного введення протягом 3 днів інгібує дозозалежним чином розвиток пухлини, але не виявляє токсичного ефекту на організм контрольних тварин [12]. Аналогічні дані були отримані під час вивчення дії ЕМАР ІІ на розвиток клітин С₆ гліоми криси в організмі мишей у разі щоденного введення препарату цитокіну протягом 12 днів у дозах 8 та 80 мкг/кг [14]. Було показано, що період напіввиведення ЕМАР ІІ з плазми піддослідних мишей у разі внутрішньовенного введення дорівнює 47 хвилин [9].

Оскільки ЕМАР ІІ, як і більшість цитокінів, є нестабільним білком, то для його стабілізації ми використали декстран 70, який, як відомо, під час взаємодії з білками

призводить до їх стабілізації та можливого підвищення біологічної активності.

Вивчення впливу комплексу ЕМАР ІІ з декстраном 70 на клітини раку простати людини лінії LNCaP вперше виявило цитотоксичну дію препарату на ракові клітини *in vitro* в дозах 1 та 10 мкг на мл середовища. Було показано, що інгібуючий ефект комплексу пов'язаний з розвитком апоптозу ракових клітин в культурі [18]. Цитотоксичний вплив комплексу ЕМАР ІІ з декстраном 70 був показаний також під час дослідження його дії на культури трансформованих клітинних ліній L929 фібробластів миші та PST тестикул поросяти [15].

Водночас вплив комплексу ЕМАР ІІ з декстраном 70 на організм тварин ще невідомий. Тому було вирішено протестувати його дію на тварин на модельному об'єкті та визначити межі можливої токсичності препарату. Як модельний об'єкт у роботі було взято мишей лінії Balb/c. Для вивчення дії цитокінового комплексу на організм мишей ми виходили з активно діючої на ракові клітини, згідно з літературними даними, дози 10 мкг/кг, яку перевищували до 1000 разів у разових дозах і до 100 раз перевищували для визначення хронічного впливу комплексу на тварин.

Експериментальні дослідження токсичного впливу нанокм-позитного препарату ЕМАР ІІ на мишах показали, що в разі введення препарату в разових дозах 300–10 000 мкг/кг не спостерігається загальнотоксичної дії препарату, і він не спричинює загибель тварин. Одразу після введення препарату спостерігалася спонтанна рухлива збудливість. При цьому миші зберігали координацію рухів. Не було порушень дефекації, сечовипускання та інших ознак нейротоксичності. Стан слизових, шерстяний покрив та охайність залишалися без змін. Протягом наступних 14 днів спостереження за тваринами не виявлено змін в поведінці та загальному стані тварин. Спостерігалася і позитивна динаміка маси тіла. Зважування робили на 1, 7 та 14-ту добу після введення препарату. Результати зважування трьох піддослідних груп мишей, кожна з яких складалася з 6 особин, наведені в табл. 1

Таблиця 1. Динаміка маси тіла тварин у різних групах після введення нанокм-позитного комплексу ЕМАР ІІ

	група I (300 мкг/кг)	група II (1000 мкг/кг)	група III (10 000 мкг/кг)	контроль
1 доба	23,57 ± 2,3	24,17 ± 1,4	24,23 ± 0,8	24,07 ± 1,2
7 доба	24,67 ± 2,5	25,58 ± 1,2	25,82 ± 1,5	25,73 ± 1
14 доба	27,62 ± 1,2	27,2 ± 0,9	28,33 ± 1,1	27,77 ± 0,6

Аутопсія після завершення дослідження впливу нанокм-позитного препарату на організм тварин включно до 10 000 мкг/кг ваги не виявила патологоанатомічних ознак токсичності препарату в органах мишей. Не спостерігалася також суттєвого впливу препарату і на подальшу життєдіяльність тварин.

Під час дослідження хронічної токсичності нанокм-позитного комплексу ЕМАР ІІ з декстраном 70 на ми-

шей було проаналізовано масові коефіцієнти внутрішніх органів тварин. Макроскопічне дослідження внутрішніх органів мишей показало, що препарат не викликає у піддослідних тварин патологічних декструктивних змін в їх органах. Різниця у вазі контрольних та піддослідних мишей не було виявлено. Дані експерименту наведено в табл. 2.

Таблиця 2. Дослідження ваги внутрішніх органів тварин після введення нанокм-позитного комплексу ЕМАР ІІ

	група I (300 мкг/кг)		група II (1000 мкг/кг)		контроль	
	1	2	1	2	1	2
серце	0,25	0,27	0,23	0,26	0,21	0,25
печінка	2,14	1,21	1,52	1,89	1,7	1,7
нирки	0,37-0,37	0,32-0,32	0,36-0,33	0,33-0,35	0,36-0,38	0,34-0,34
селезінка	0,14	0,14	0,14	0,12	0,17	0,17
легені	0,44	0,32	0,45	0,35	0,27	0,27

Таким чином, здійснені нами дослідження з визначення впливу комплексу ЕМАР II з декстраном на лабораторних мишах показали, що препарат не має вираженої токсичної дії на організм тварин. Ці дослідження відкривають можливості подальших біомедичних та структурно-функціональних досліджень нанокompatного комплексу ЕМАР II для застосування в перспективі в біомедицині.

Висновки. Нанокompatний комплекс ЕМАР II не виявляє вираженої токсичної дії на організм мишей лінії Balb/c в одноразовому введенні в досліджуваних дозах 300, 1000 та 10 000 мкг/кг, які перевищують активну дію дозу препарату 10 мкг/кг в 30, 100 та 1000 разів, та хронічному введенні протягом 30 днів в дозах 300 та 1000 мкг/кг. Препарат не виявляє суттєвого впливу на масовий приріст, стан та поведінку тварин.

Список використаних джерел:

1. Глик Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М.: Из-во Мир. 2002. – 589 с.
2. Adrio J. L. Recombinant organisms for production of industrial products / J. L. Adrio, A. L. Demain // Bioeng. Bugs. – 2010. – Vol. 1, № 2. – P. 116–131.
3. Sahdev S. Production of active eucariotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies / S. Sahdev, S. K. Khattar, K. S. Saini // Mol. Cell. Biochem. – 2008. – Vol. 307, № 2. – P. 249–264.
4. Rosano G. L. Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges / G. L. Rosano, E. A. Cessarelli // Frontiers in Microbiol. – 2014. – Vol. 5. – P. 1–17.
5. Application for Invention "Nanocomposite anti-cancer agent" / A. I. Kornelyuk, L. A. Babenko, A. V. Kozlov et al. UA. Patent 17851 / ZU / 11, August 29, 2011.
6. Endothelial monocyte activating polypeptide II. A novel tumor-derived polypeptide that activates host-response mechanisms / J. Kao, J. Ryan, G. Brett et al. // J. Biol. Chem. – 1992. – Vol. 267. – P. 20239–20247.
7. The EMAPII cytokine is released from the mammalian multisynthetase complex after cleavage of its p43/proEMAPII component / V. Shalak, M. Kaminska, R. Mitnacht-Kraus et al. // J. Biol. Chem. – 2001. – Vol. 276. – P. 23769–76.
8. Endothelial monocyte-activating polypeptide II, a tumor-derived monocyte-activating polypeptide II, that plays an important role in inflammation, apoptosis, and angiogenesis / A. C. Berger, G. Tang, H. R. Alexander, S. K. Libutti // J. Immunother. – 2000. – Vol. 23. – P. 519–527.
9. Endothelial-monocyte activating polypeptide II, a novel antitumour cytokine that suppresses primary and metastatic tumour growth and induces apoptosis in growing endothelial cells / M. A. Schwarz, J. Kandel, J. Brett et al. // J. Exp. Med. – 1999. – Vol. 190. – P. 341–54.
10. Lou-dose Endothelial monocyte activating polypeptide II induced autophagy by down-regulation miR-20a in U-87 and U-251 glioma cells / J. Chen, L. Liu, X. Liu et al. // Frontiers in Cellular Neuroscience. – 2016. – Vol. 10.
11. Van Horssen R. Endothelial monocyte-activating polypeptide II and its functions in (patho)physiological processes / R. van Horssen, A. M. Eggermont, T. L. ten Hagen // Cytokine Growth Factor Rev. – 2006. – Vol. 17. – P. 339–348.
12. Antitumor effect of endothelial monocyte-activating polypeptide-II on human prostate adenocarcinoma in mouse xenograft model / A. G. Reznikov, L. V. Chaykovskaya, L. I. Polyakova, A. I. Kornelyuk // Exp. Oncol. – 2007. – Vol. 29. – P. 267–271.
13. EMAP II-based antiangiogenic-antiendothelial in vivo combination therapy of pancreatic cancer / R. E. Schwarz, N. Awasthi, S. Konduri et al. // Ann. Surg. Oncol. – 2010. – Vol. 17, № 5. – P. 1442–1452.
14. Schwarz R. E. In vivo therapy of local tumor progression by targeting vascular endothelium with EMAP II / R. E. Schwarz, M. A. Schwarz // J. Surg. Res. – 2004. – Vol. 120. – P. 64–72.
15. Nanocomposite complex EMAP II influence on tumor necrosis factor and interferon in vitro / L. A. Kolomiets-Babenko, O. S. Bohorad-Kobelska, N. L. Kovalchuk et al. // Biotechnologia Acta. – 2016. – Vol. 9, # 5. – P. 18–23.
16. Bacterial expression optimization of EMAP II antitumor cytokine in E.coli BL21(DE3)pLys / L. A. Babenko, O. Y. Skorobogatov, O. L. Dubrovsky, O. I. Kornelyuk // Microbiology and Biotechnology – 2010. – Vol. 3. – P. 21–31.
17. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature / U. K. Laemmli. – 1970. – Vol. 227, № 5259. – P. 680–685.
18. Goloborodko T. A. Polypeptide EMAP II inhibits growth and stimulates apoptosis of the LnCaP prostate cancer cell line / T. A. Goloborodko, L. I. Polyakova, A. V. Sotkis // J. of the Nation Academy of Medical Sciences of Ukraine – 2010. – Vol. 16, № 4. – P. 681–690.

References:

1. Glick B, Pasternak J. Molecular biotechnology. Principles and applications. Moscow: Mir. 2002; 589.
2. Adrio JL, Demain AL. Recombinant organisms for production of industrial products. Bioeng. Bugs. 2010;1(2):116-131.
3. Sahdev S, Khattar SK, Saini KS. Production of active eucariotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. Mol Cell Biochem. 2008; 307 (2): 249-264.
4. Rosano GL, Cessarelli EA. Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges. Frontiers in Microbiol. 2014; 5 (): 1-17.
5. Kornelyuk AI, Babenko LA, Kozlov AV, Reznikov AG, Chaikovska LV, Polyakova LI. Application for Invention "Nanocomposite anti-cancer agent". UA. Patent 17851 / ZU / 11, August 29, 2011.
6. Kao J, Ryan J, Brett G, et al. Endothelial monocyte activating polypeptide II. A novel tumor-derived polypeptide that activates host-response mechanisms. J Biol Chem. 1992; 267 (): 20239-20247.
7. Shalak V, Kaminska M, Mitnacht-Kraus R, Vandanebee P, Clauss M, Mirande M. The EMAPII cytokine is released from the mammalian multisynthetase complex after cleavage of its p43/proEMAPII component. J Biol Chem. 2001; 276 (): 23769–76.
8. Berger AC, Tang G, Alexander HR, Libutti SK. Endothelial monocyte-activating polypeptide II, a tumor-derived monocyte-activating polypeptide II, that plays an important role in inflammation, apoptosis, and angiogenesis. J Immunother 2000; 23 (): 519–27.
9. Schwarz MA, Kandel J, Brett J et al. Endothelial-monocyte activating polypeptide II, a novel antitumour cytokine that suppresses primary and metastatic tumour growth and induces apoptosis in growing endothelial cells. J Exp Med. 1999; 190 (): 341-54.
10. Chen J, Liu L, Liu X, Qui C, Meng F, Ma J, Lin Y, Xue Y. Lou-dose Endothelial monocyte activating polypeptide II induced autophagy by down-regulation miR-20a in U-87 and U-251 glioma cells. Frontiers in Cellular Neuroscience. 2016; 10 ():
11. van Horssen R, Eggermont AM, ten Hagen TL. Endothelial monocyte-activating polypeptide II and its functions in (patho)physiological processes. Cytokine Growth Factor Rev. 2006; 17 (): 339-48.
12. Reznikov AG, Chaykovskaya LV, Polyakova LI, Kornelyuk AI. Antitumor effect of endothelial monocyte-activating polypeptide-II on human prostate adenocarcinoma in mouse xenograft model. Exp Oncol. 2007; 29 (): 267–71.
13. Schwarz RE1, Awasthi N, Konduri S, Cafasso D, Schwarz MA. EMAP II-based antiangiogenic-antiendothelial in vivo combination therapy of pancreatic cancer. Ann Surg Oncol. 2010; 17(5):1442-52.
14. Schwarz RE, Schwarz MA. In vivo therapy of local tumor progression by targeting vascular endothelium with EMAP II. J Surg Res 2004; J Surg Res 2004; 120 (): 64–72.
15. Kolomiets-Babenko LA, Bohorad-Kobelska OS, Kovalchuk NL, Spivak MJ, Kornelyuk AI. Nanocomposite complex EMAP II influence on tumor necrosis factor and interferon in vitro. Biotechnologia Acta. 2016; 9 (5):
16. Babenko LA, Skorobogatov OY, Dubrovsky OL, Kornelyuk OI. Bacterial expression optimization of EMAP II antitumor cytokine in E.coli BL21(DE3)pLys. Microbiology and Biotechnology. 2010; 3 (): 21-31.
17. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970; 227 (5259): 680-685
18. T.A. Goloborodko, L.I. Polyakova, A.V. Sotkis, A.I. Korneliuk, L.A. Babenko, Ya.M. Shuba, A.G. Reznikov. Polypeptide EMAP II inhibits growth and stimulates apoptosis of the LnCaP prostate cancer cell line J. of the Nation Academy of Medical Sciences of Ukraine. 2010; 16(4): 681-690.

Надійшла до редакції 03.09.2018

Отримано виправлений варіант 04.10.2018

Підписано до друку 03.10.2018

Received in the editorial 03.10.2018

Received a revised version on 04.10.2018

Signed in the press on 04.10.2018

Л. Коломиец, и. о. науч. сотр.

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев, Украина,

В. Заец, канд. биол. наук, А. Цуварев, мл. науч. сотр.

Киевский национальный университет имени Тараса Шевченка, Киев, Украина,

О. Корнелиук, чл.-кор. НАН Украины, д-р биол. наук, проф.

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев, Украина

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ НАНОКОМПОЗИТНОГО КОМПЛЕКСА ЦИТОКИНА ЕМАР II С ДЕКТРАНОМ 70 НА ОРГАНИЗМ МЫШЕЙ ЛИНИИ BALB/C

Цитокин ЕМАР II – эндотелиальный и моноцитарноактивирующий полипептид II, предшественником которого является компонент высокомолекулярного комплекса аминокислот-мРНК-синтетаза высших эукариот белок p43, способен модулировать свойства эндотелиальных клеток, моноцитов и лейкоцитов. В малых концентрациях цитокин стимулирует, а в больших – подавляет миграцию эн-

дотелиальных клеток, стимулирует их апоптоз, влияет на активность моноцитов, нейтрофилов, макрофагов, способствуя таким образом воспалительным и некротическим процессам в злокачественных опухолях. Одним из перспективных направлений таргетной терапии онкозаболеваний является использование антиангиогенных, прокоагулятивных и проапоптотических лекарственных средств, что послужило основой для выбора в качестве объекта исследований противоопухолевого цитокина ЕМАР II. В Институте молекулярной биологии и генетики НАН Украины разработана биотехнология бактериальной экспрессии рекомбинантного ЕМАР II в клетках *E.coli* BL21 (DE3) и выделения высокоочищенных препаратов цитокина в препаративных количествах. Для повышения стабильности и снижения агрегации рекомбинантного ЕМАР II разработаны научно-методические основы создания и получены наноконкомпозитные комплексы цитокина ЕМАР II с биосовместимыми полимерами циклодекстринами и декстраном 70. В данной экспериментальной работе исследовано влияние наноконкомпозитного комплекса ЕМАР II с декстраном-70 на организм животных с целью установления безопасности его применения. В качестве объекта исследований были использованы мыши линии BALB/C. Экспериментальные исследования показали, что при остром и хроническом введении препарата животным в дозах 300–10 000 мкг/кг не наблюдается общетоксического действия наноконкомпозитного комплекса на организм мышей. Полученные данные открывают перспективу дальнейшего исследования противоопухолевых свойств наноконкомпозитного комплекса ЕМАР II с декстраном-70 с целью возможного дальнейшего внедрения в фармакологическую практику.

Ключевые слова: наноконкомпозитный комплекс Эмар II, острая токсичность, хроническая токсичность.

L. Kolomiets, research assist.
Institute of Molecular Biology and Genetics of NASU, Kyiv, Ukraine,
V. Zayets, PhD, O. Tsuvariev research assist.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine,
A. Kornelyuk, Dr. Sc., Corresponding Member of NASU
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

INVESTIGATION OF INFLUENCE OF EMAP II CITOKIN NANOCOMPOSITE COMPLEX WITH DEXTRAN 70 THE BALB/C LINES MUSCLE ORGANISM

The cytokine EMAP II is endothelial and monocytic-activating polypeptide II, the precursor of which is the component of the high-molecular complex aminoacyl-tRNA synthetase of the higher eukaryotes of the protein p43, is capable of modulating the properties of endothelial cells, monocytes and leukocytes. In low concentrations the cytokine stimulates and in high concentrations it suppresses the migration of endothelial cells, stimulates their apoptosis, affects the activity of monocytes, neutrophils, macrophages, thus contributing to inflammatory and necrotic processes in malignant tumors. One of the promising directions of targeted therapy of oncological diseases is the use of antiangiogenic, procoagulative and proapoptotic drugs, which became the basis for the selection of an antitumor cytokine EMAP II as an object of research. In the Institute of Molecular Biology and Genetics of the National Academy of Sciences of Ukraine, the biotechnology of bacterial expression of recombinant EMAP II in *E.coli* BL21 (DE3) cells and isolation of highly purified cytokine preparations in preparative amounts have been developed. In order to increase the stability and reduce the aggregation of recombinant EMAP II, scientific and methodological foundations were created and nanocomposite complexes of the cytokine EMAR II with biocompatible polymers with cyclodextrin and dextran 70 were obtained. In this experimental work, the effects of the nanocomposite complex EMAR II and dextran-70 on the animal organism were investigated for the purpose of establishing safety of its use. BALB / C mice were used as an object of research. Experimental studies have shown that acute and chronic administration of the drug to animals at doses of 300 – 10 000 µg / kg does not show the general toxic effects of the nanocomposite complex on the organism of mice. The obtained data open the prospect of further investigation of antitumor properties of the nanocomposite complex EMAR II with dextran-70 with the aim of possible further introduction into pharmacological practice.

Key words: nanocomposite complex EMAP II, acute toxicity, chronic toxicity.

УДК 577.13: 581.198: 54.056

A. Revutska, PhD stud., V. Belava, PhD, A. Golubenko, PhD, N. Taran, DSc, Prof.
ESC "Institute of Biology and Medicine",
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

DETERMINATION OF XANTHONES IN PLANTS AND THE NUTRIENT MEDIUM UNDER *IN VITRO* CULTIVATION CONDITIONS

In recent years, xanthenes have received considerable attention from scientists due to their biological activity: anti-carcinogenic, antiviral, antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other properties. Therefore they are useful for prevention and treatment of different diseases: cancer, Alzheimer's and Parkinson's disease, cardiovascular disorders, diabetes, etc. Extracts of different species of plants containing xanthenes are components of chemotherapeutic and other medical drugs. In order to find the most sensitive and environmentally safe method of quantitative determination of xanthenes in the plant material and the nutrient medium, known methods were tested and selected for the prototype Vyisochina G. I. et al., 2011 method, which uses ethanol as an extractor. As the plant material we used plants of different species that were grown under *in vitro* cultivation conditions on the agarized nutrient medium. This agarized nutrient medium was also used for the xanthone content analysis. Based on the performed research, modifications of the method for determining the content of xanthenes were adapted to the *in vitro* conditions, which detail the specificity of extraction and quantitative calculation of the xanthone content in plant explants. Our own method of determination of these compounds in the agarized nutrient medium was developed as well. The method, that we proposed, will significantly speed up the process of xanthone detecting and will also increase their yield in biotechnological processes for obtaining the pharmacologically valuable secondary metabolites of phenolic nature.

Key words: xanthenes, chromatography, spectrophotometry, *in vitro*, plants, nutrient medium.

Introduction. Xanthenes – heterocyclic polyphenolic compounds, which are particularly valuable secondary metabolites. Vascular plants produce 79 % of all known xanthenes of natural origin, non-lichenized fungi – 16 %, lichens – the remaining 5 % [4, 9]. In recent years, these polyphenolic compounds have received considerable attention from scientists due to their biological activity, namely: anti-carcinogenic, antiviral, antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other properties. Therefore they are used to prevent and treat cancer, Alzheimer's and Parkinson's disease, cardiovascular disorders, diabetes, etc. [1, 10]. Extracts of different species of plants containing xanthenes

are components of chemotherapeutic and other medical drugs. These compounds perform a protective function in plants: provide resistance to stress and pathogens, participate in the allelopathic interactions, as well as in the processes of general development of the plant organism [3].

The massive collection of plants as a medicinal material, which is the source of xanthenes, destructively affects the species composition of natural phytocoenoses. Thus, the species of plants as sources of xanthenes from the families *Gentianaceae*, *Hypericaceae* and others already have a rare and endangered status [2, 6, 7]. Consequently, it is important to search for alternative sources of xanthenes, which

can be, for example, high-yielding plant tissues cultures *in vitro*. In our opinion, an additional source of xanthenes may also be the nutrient medium on which *in vitro*-plants were cultivated, whose roots are known to produce secondary metabolites, including a wide range of phenolic compounds.

Several methods for the extraction of xanthenes are proposed in the scientific works, but most of them are labor-intensive, have low selectivity or practical yield (a large amount of materials is needed) and, moreover, require the use of toxic organic solvents (acetone, hexane, chloroform, methanol) [8]. Such methods are ineffective in the researching of the content of plant xanthenes from *in vitro* tissue cultures and the nutrient medium.

Therefore, the aim of our study was to select the most sensitive and environmentally safe method for qualitative determination of xanthenes in plant material, as well as to develop a method for the extraction of these compounds from an agarized nutrient medium as an additional source of pharmacologically valuable secondary metabolites. The main task in developing the modification of the method was to minimize the amount of material needed for the effective detection of xanthenes.

Materials and methods.

Chemicals. The following reagents were used in the experiment:

1. For growing plants under *in vitro* conditions: Murazige-Skuga nutrient medium (mix of macro- and microsoles) (Sigma, Germany), agar (Spain), mesoinozit (China), thiamine (LLC UKRCHIMEXPO, Ukraine), pyridoxine (LLC UKRCHIMEXPO, Ukraine), nicotinic acid (LLC "UKRCHIMEXPO", Ukraine), ascorbic acid (LLC "UKRCHIMEXPO", Ukraine), Fe₂SO₄ (LLC "UKRCHIMEXPO", Ukraine), Na-EDTA (LLC "UKRCHIMEXPO", Ukraine), kinetin (Sigma, Germany), indolyl acetic acid (Sigma, Ger-

many), casein hydrolyzate (Sigma, Germany), yeast extract (LLC "UKRCHIMEXPO", Ukraine), sucrose (LLC "UKRCHIMEXPO", Ukraine).

2. For extraction of xanthenes, chromatography and spectrophotometry analysis: 70 % ethanol (v/v) (DKP Pharmaceutical Factory LLC, Ukraine), 40 % acetic acid (v/v) (LLC "UKRCHIMEXPO", Ukraine).

Plant material. For approbation of known methods for the xanthone determination in plant material, the roots of plants of the genus *Iris* L. were used.

For developing our own modifications of the method for the xanthone determination in *in vitro*-plants we used plants of the genus *Phalaenopsis* sp. [18] and *Acorus calamus* L. (various variants of explants originating from different localities) [17]. The investigated plants were grown under *in vitro* conditions for 3-5 months at a temperature of 24 °C, with a 16-hour photo period on the modified agarized Murassigu-Skooganutrient medium. *In vitro* cultivation of plants was performed in the research laboratory of "Introduced and natural phytodiversity" of O.V. Fomin Botanical Garden named of Taras Shevchenko National University of Kyiv.

Approbation of different extraction methods and quantitative determination of xanthenes were carried out in the research laboratory "Physiological bases of plant productivity" of the Department of Plant Biology at the Educational and Scientific Centre "Institute of Biology and Medicine" of the Taras Shevchenko National University of Kyiv.

The agarized nutrient medium on which the plants under study were grown were also used as a material for extraction and quantitative determination of xanthone content.

Extraction and quantitative determination of xanthone content. In order to select the most sensitive method for the xanthone determination in plant material, we have already tested the methods known in the scientific literature (Table 1).

Table 1. Extraction methods of xanthenes from the plant material

No	Weight of plant material, g	Volume of extractives, ml	Composition of the extraction solution	General time of extraction	References
1	1 (dry material)	30	methanol	2 hours	Krivut B. A. et al., 1976 [14]
2	1500 (dry material)	plant mat-I / ethanol = 1/12	1) 70 % ethanol (v/v); 2) chloroform (200 ml); 3) ethylacetate (300 ml)	360 hours (72 hours per cycles)	Mihaylova T. M. et al., 2005 [15]
3	dry material	–	1) 96 % ethanol (v/v); 2) 40 % ethanol (v/v); 3) hexane 4) chloroform	4 cycles (time is not specified)	Munzhargal N et al., 2008 [16]
4	1700 (dry material)	–	1) ethanol; 2) chloroform 3) butanol	6 cycles (time is not specified)	Tozhboev M. M. et al., 2010 [20]
5	0,5 (dry material)	50	60 % ethanol (v/v);	2 hours (1 hour for the 1-st cycle; for 0,5 hours for 2 subsequent cycles)	Vyisochina G. I. et al., 2011 [12].
6	1	plant mat-I / ethanol = 1/ 10	1) 96 % ethanol (v/v); 2) 40 % ethanol (v/v); 3) 96 % ethanol (v/v) + chloroform (5 ml)	4 cycles (time is not specified)	Tarasova N. S et al, 2012 [19].
7	0,2 (dry material)	50	80 % methanol (v/v)	1 hour	Liu X. et al., 2014 [5].

Quantitative analysis of xanthone content was carried out using paper chromatography and spectrophotometrically (SHIMADZU UV-1800, Japan) at $\lambda = 200-400$ nm.

Statistical analysis. Statistical processing of the results was carried out using common methods using the standard program Microsoft Office Excel 2007. The biological repetition of the experiments was 3 times, the analytical repetition – 9 times. In preparation of the method, the average values of the indices were analyzed, the differences between which were considered significant at $P \leq 0.05$ according to the Student's criterion [13].

Results and discussion. On the basis of the elaborated publications [5, 12, 14–16, 19, 20], we have developed our own modifications of methods for the xanthone determination in plants grown under *in vitro* conditions. Since in literary sources we did not find methods for xanthone extraction from agarized nutrient medium, we have developed our own method of isolating these compounds and determining their content in the agarized nutrient medium.

Extraction of xanthenes from plant material. The methods of extraction and determination of the xanthone con-

tent (see Table 1) presented in the literature are different in terms of the amount of dry plant material (from 0,2 g (№ 7) to 1,7 kg (№ 4)), by the composition of the extraction solution (methanol, ethanol, hexane, chloroform (№ 3), ethanol, chloroform, butanol (№ 4), ethanol, chloroform (№ 6)), as well as the duration extraction (from 1 hour (№ 7) to 360 hours (№ 2)). The presence of toxic solvents in solutions for extraction does not allow the use of extracts obtained without further purification.

Our analysis of the data of xanthone extraction methods has shown that method №5 is the most environmentally friendly and requires a small amount of materials. Therefore, this method became the basis for developing a modified version:

- weigh 0,1–0,3 g of raw plant material homogenise in a porcelain mortar with a small amount of 70 % ethanol (v/v);

- add 70 % ethanol (v/v) and transfer quantitatively into heat resistant conical flasks (volume 100 ml) with reflux condensers so that the total volume of the extract does not exceed 4–5 ml;

- extract in a boiling water bath for 3 hours;

- the cooled extract filter through a Shota-filter in a heat-resistant flask; add a 70 % ethanol (v/v) portionwise (0,3–0,5 ml) to the Shota-filter several times until the solution slips from the filter, does not become colorless; combine filtrate;

- heat-resistant flasks with the resulting total filtrate place on a water bath and drop the contents to dryness (if necessary, cooled flasks with a dry residue hermetically sealed with rubber stoppers and left for 24 hours at a temperature of 3–7 °C);

- add 0,5–1 ml of 70 % ethanol (v/v) to the dry residue (for better dissolution of the remainder of the flask can be heated to 60° C);

- to carry out paper chromatography in the ascending method, take a chromatographic paper 8 x 11 cm, marking the starting line at a distance of 1 cm from the lower edge; obtain the extract step by step on the marked line (at the same time at each stage it should be completely dried); add thrice (0,1–0,2 ml) 70 % ethanol (v/v) in small portions to wash the remainder of the extract from the flask, apply it to the starting line;

- upstream chromatography in a small chromatography chamber using 40 % acetic acid (v/v) as a mobile phase (the time required for chromatography is 15–20 minutes under normal conditions);

- dry the chromatograms, place under the UV-irradiation, bright orange spots of xanthenes circle with a pencil;

- cut blotted spots, grind, place in test tubes and add 4 ml of 60 % ethanol (v/v), seal the tubes with rubber stoppers and leave them for 6 hours;

- in the case of saturated bright orange color of the obtained eluates (which indicates the high concentration of xanthenes in the experimental plant material), they must be diluted with 60 % ethanol (v/v), and then multiplicity of this dilution should be taken into account during calculations;

- the eluates obtained should be used for spectrophotometric analysis (the range of wavelength to be used for the analysis is $\lambda = 200\text{--}400\text{ nm}$);

- to calculate the xanthone content in 1 g of raw plant material, use the formula:

$$C = \frac{D * z * 10}{P * l * M * E_{1cm}^{1\%}}, \text{ where}$$

C – content of xanthone in the sample, %; D – optical density of the investigated solution; M – molecular weight of xanthone compound; l – path length of sample (cuvette

thickness), cm; $E_{1cm}^{1\%}$ – specific absorption coefficient of xanthone compound; P – weight of plant material, g; z – multiplicity of dilution of the eluate used for spectrophotometric analysis.

Extraction of xanthenes from the agarized nutrient medium. In the vast majority of cases, extraction of secondary metabolites is carried out from a liquid nutrient medium in the cultivation of suspension cultures [20]. For the effective use of *in vitro*-cultures of plants grown on an agarized medium, along with the modification of the xanthone extraction from plant material, a method for extracting xanthenes from agarized nutrient medium was developed. In the process of developing the method, the weight of the initial weight gain of the agarized nutrient medium was 0,1 g. However, we failed to establish the statistically significant values of the studied parameters. With an increase in cravings of the nutrient medium up to 0,5 g, the determination of the xanthone content was successful.

Thus, the following sequence of analysis of agarized nutrient medium has been developed:

- homogenize the nutrient medium (0,5 g) and place it in a 100 ml flask;

- add 3 ml of 70 % ethanol (v/v) to the homogenate, mix thoroughly, close with rubber stoppers and withstand under the temperature of 5 °C for 24 hours;

- transfer the samples quantitatively to centrifuge tubes and centrifuge for 10 min. at 2000 rpm;

- take the supernatant carefully into the test tubes;

- add 1 ml of 70 % ethanol (v/v) to the precipitate remaining in the centrifuge tube, mix and centrifuge for 10 min.;

- take the supernatant obtained and combine with the previous extract (repeat the procedure 2 more times) and use for chromatographic analysis;

- the quantitative determination of xanthenes is carried out using the same method as in the plant material.

With the help of developed methods it was found that the xanthone content in *in vitro*-plants remained stable or increased during cultivation, and in the nutrient medium – decreased. Consequently, for the biosynthesis the maximum amount of xanthenes in the *in vitro*-plants, it is necessary to regulate the plant cultivation conditions, in particular the duration of cultivation [17, 18].

In conclusion, an ecologically safe and effective for a small amount of experimental material modification to the method for xanthone determination in plant material was selected and a method for their extraction from the agarized nutrient medium was developed. The method, that we have proposed, will significantly speed up the process of detecting xanthenes and also increase their yield in biotechnological processes for obtaining a pharmacologically valuable substance.

Список використаних джерел:

1. Xanthone and Flavone Derivatives as Dual Agents with Acetylcholinesterase Inhibition and Antioxidant Activity as Potential Anti-Alzheimer Agents / I. Cruz, P. Puthongking, S. Sara Cravo et al. // Journal of Chemistry. – 2017. – Article ID 8587260. – 16 p. doi: 10.1155/2017/8587260.
2. *Garcinia subelliptica* Merr. (Fukugi): A multipurpose coastal tree with promising medicinal properties: A review on Fukugi / T. Inoue, M. Kainuma, K. Baba et al. // Journal Intercultural Ethnopharmacology. – 2017. – Vol. 6, № 1. – P. 121–127. doi: 10.5455/jice.20161229060034.
3. Effect of elicitors on xanthone accumulation and biomass production in hairy root cultures of *Gentianadinarica*. / D. Krstić, Milošević, T. Janković, B. Uzelac et al. // Plant Cell Tissue Organ Culture. – 2017. – Vol. 130. – P. 631–640. doi: 10.1007/s11240-017-1252-1.
4. *Le Pogam P.* Xanthenes of Lichen Source: A 2016 Update / P. Le Pogam, J. Boustie // Molecules. – 2016. – Vol. 21, № 3. – 30 p. doi: 10.3390/molecules21030294.
5. Comparative analysis of flavonoids and polar metabolite profiling of Tanno-original and Tanno-high rutin buck wheat. / X. Li, J. K. Kim,

S. Y. Park et al. // Journal of Agriculture and Food Chemistry. – 2014. – Vol. 62, № 12. – P. 2701–2708. doi: 10.1021/jf4049534.

6. Medicinal, biological and phytochemical properties of *Gentiana* species / F. Mirzaee, A. Hosseini, H. B. Jouybaria et al. // Journal of Traditional and Complementary Medicine. – 2017. – Vol. 7, № 4. – P. 400–408. doi: 10.1016/j.jtcm.2016.12.013.

7. Chemical and Biological Research on Herbal Medicines Rich in Xanthones / J. Ruan, C. Zheng, Y. Liu et al. // Molecules. – 2017. – Vol. 22, № 1698. – 19 p. doi: 10.3390/molecules22101698.

8. Subcritical Water Extraction of Xanthone from Mangosteen (*Garcinia Mangostana* Linn) Pericarp / M. Siti, Q. Y. Ash Shiddiqi, A. Dw. Kh. Widiyastuti et al. // Journal of Advanced Chemical Engineering. – 2014. – Vol. 5, № 1. – 6 p. doi:10.4172/2090-4568.1000117.

9. Wezeman T. Xanthonedimers: a compound family which is both common and privileged. / T. Wezeman, S. Bråse, K.-S. Masters // Natural Products Reports–2015. – Vol. 32, № 1. – P. 6–28. doi: 10.1039/c4np00050a.

10. Advances in extraction and analysis of phenolic compounds from plant materials / C.-C. Xu, B. Wang, Y.-Q. Pu et al. // Chinese Journal of Natural Medicine. –2017. – Vol. 15, № 10. – P. 721–731. doi: 10.1016/S1875-5364(17)30103-6.

11. Xan thones from roots, hairy roots and cell suspension cultures of selected *Hypericum* species and their antifungal activity against *Candida albicans* / D. Zubrická, A. Mišianiková, J. Henzelyová et al. // Plant Cell Reports. – 2015. – Vol. 34, № 11. – P. 1953–1962. doi: 10.1007/s00299-015-1842-5.

12. Височина Г. И. Биологические активные вещества некоторых видов рода *Hedysarum* L. / Г. И. Височина, Т. А. Кукушкина // Химия растительного сырья. – 2011. – Т. 4. – С. 251–258.

13. Доспехов Б. А. Методика полевого опыта / Б. А. Доспехов. – М.: Агропромиздат. – 1985. – 350 с.

14. Спектрофотометрическое определение мангиферина. / Б. А. Кривут, Н. А. Федюнина, С. И. Кочерга и др. // Химия природных соединений. – 1976. – Т. 1. – С. 4–46.

15. Биологическая активность фенольных соединений, выделенных из Галени рогатой (*Haleniacorniculata* (L.) Cornaz) / Т. М. Михайлова, Э. Э. Шульц, Л. М. Тахнаева и др. // Химия в интересах устойчивого развития. – 2005. – Т. 13. – С. 411–415.

16. Мунхжаргал Н. Виды семейства *Gentianaceae*-перспективные источники экистероидов, ксантонов и иридоидов [Электронный ресурс] / Н. Мунхжаргал, Л. Н. Зибарева, А. Л. Эбель // Биоразнообразие, проблемы экологии горного Алтая и сопредельных регионов: настоящее, прошлое, будущее: материалы междунар. конф. Горно-Алтайск. – 2008. – Т. 9. – Режим доступа : e-lib.gasu.ru/konf/biodiversity/2008/2/28.pdf (дата обращения: 15.09.2015).

17. Вміст фенольних сполук у тканинах Аїру звичайного (*Acorus calamus* L.) та живильному середовищі за умов вирощування *in vitro* / А. З. Ревуцька, В. Н. Белав, А. В. Голубенко, Н. Ю. Таран // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2016. – Т. 14, № 2. – С. 210–215.

18. Екобіотехнологічні підходи для отримання *in vitro* ксантонів – фармакологічно цінних сполук / А. З. Ревуцька, В. Н. Белав, А. В. Голубенко, Н. Ю. Таран // "Екологія та екологічна безпека: Матеріали наук.-практич. конф. всеукр. студ. конкурсу". – Полтава : ПолтНТУ. – 2016. – С. 77.

19. Тарасова Н. С. Оценка количественного содержания иридоидов и ксантонов в Горечавке крупнолистной (*G. macrophylla* Pall.) / Н. С. Тарасова, Л. Н. Хлебникова, Е. К. Кайгина и др. // ФЭН-НАУКА. – 2012. – Т. 15, № 12. – С. 8–10.

20. Тожибоев М. М. Ксантоны и флавоноиды *Gentianaalga* Pall / М. М. Тожибоев, Э. Х. Ботиров, Г. А. Усманова // Химия растительного сырья. – 2010. – Т. 3. – С. 129–133.

References:

1. Cruz I., Puthongking P., Sara Cravo S. [et al.]. Xanthone and Flavone Derivatives as Dual Agents with Acetylcholinesterase Inhibition and Antioxidant Activity as Potential Anti-Alzheimer Agents. J of Chemistry. 2017; Article ID 8587260: 16 p. doi: 10.1155/2017/8587260.

2. Inoue T., Kainuma M., Baba K. [etal.]. *Garcinia subelliptica* Merr. (Fukugi): A multipurpose coastal tree with promising medicinal properties: A review on Fukugi. J Interclut Ethnopharmacology. 2017; 6 (1): 121-127. doi: 10.5455/jice.20161229060034.

3. Krstić- Milošević D., Janković T., Uzelac B., Vinterhalter D., Vinterhalter B. Effect of elicitors on xanthone accumulation and biomass production in hairy root cultures of *Gentianadinarica*. Plant Cell Tiss Organ Cult. 2017; 130: 631-640. doi: 10.1007/s11240-017-1252-1

4. Le Pogam P., Boustie J. Xanthones of Lichen Source: A 2016 Update Molecules.2016; 21: 30 p. doi: 10.3390/molecules21030294.

5. Li X., Kim J., Park S., Zhao S. [et al.]. Comparative analysis of flavonoids and polar metabolite profiling of Tanno-original and Tanno-high rutin buck wheat. J Agric Food Chem. 2014; 62(12): 2701-2708. doi: 10.1021/jf4049534.

6. Mirzaee F., Hosseini A., Jouybaria H. [et al.]. Medicinal, biological and phytochemical properties of *Gentiana* species. J of Traditional and Complementary Medicine. 2017; 7 (4): 400-408. doi: 10.1016/j.jtcm.2016.12.013.

7. Ruan J., Zheng C., Liu Y. [et al.]. Chemical and Biological Research on Herbal Medicines Rich in Xanthones. Molecules. 2017; 22 (1698): 19 p. doi: 10.3390/molecules22101698.

8. Siti M., Ash Shiddiqi Q. [et al.]. Subcritical Water Extraction of Xanthone from Mangosteen (*Garcinia Mangostana* Linn) Pericarp. J Adv Chem Eng. 2014; 5(1): 6 p. doi:10.4172/2090-4568.1000117

9. Wezeman T., Bråse S., Masters K. Xanthone dimers: a compound family which is both common and privileged. Nat. Prod. Rep.2015; 32 (1): 6-28. doi: 10.1039/c4np00050a.

10. Xu C., Wang B., Pu Y. [et al.]. Advances in extraction and analysis of phenolic compounds from plant materials. Chin. JNat Med. 2017; 15(10): 721-731. doi: 10.1016/S1875-5364(17)30103-6.

11. Zubrická D., Mišianiková A., Henzelyová J [et al.]. Xanthones from roots, hairy roots and cell suspension cultures of selected *Hypericum* species and their antifungal activity against *Candida albicans*. Plant Cell Reports. 2015; 34(11):1953-62. doi: 10.1007/s00299-015-1842-5.

12. Vyisochina G., Kukushkina T. Biologicheski aktivnye veschestva nekotorykh vidov roda *Hedysarum* L. Him rastsyrya. 2011; 4: 251-258. Russian.

13. Dospheov B. Metodika polevogo opyta. M.: Agropromizdat; 1985. 350 p. Russian.

14. Krivut B., Fedyunina N., Kocherga S., Rusakova S. Spektrofotometricheskoe opredelenie mangiferina. Him.prirodnih soedineniy. 1976; 1: 44-46. Russian.

15. Mihaylova T., Shults E., Tahnaeva L. [etal.]. Biologicheskaya aktivnost fenolnykh soedineniy, vydelennykh iz Galenii rogatoy (Haleniacorniculata (L.) Cornaz). Him. v interesah ustoychivogo razvitiya. 2005; 13: 411-415. Russian.

16. Munzhargal N., Zibareva L., Ebel A. Vidu semeystva Gentianaceae – perspektivnyye istochniki ekdisterooidov, ksantonov i iridoidov. Bioraznoobrazie, problemy ekologii gornogo Altaya i sopredelnykh regionov: nastoyashee, proshloe, budushee: mater. mezhd. konf. Gorno-Altaysk. 2008; 9; Available from: e-lib.gasu.ru/konf/biodiversity/2008/2/28.pdf (accessed, September, 2015). Russian.

17. Revutska A., Belava V., Golubenko A., Taran N. [Content of phenolic compounds in *Acoruscalamus* L. tissue culture and nutrient culture medium under *in vitro* conditions]. The Bulletin of Ukr. Society of Gen. and Breeders 2016;14 (2): 210-215. Ukrainian.

18. Revutska A., Belava V., Golubenko A., Taran N., editors. Eko biotekhnologichni pidkhody dlia otrymannia *in vitro* ksantoniv–farmakologichnykh spolk. "Ekologhiia ta ekolohichna bezpeka: Materialy naukovoi-praktychnoi konferentsii vseukrainskoho studentskoho konkursu".; 2016 March 16-18.; Poltava, Ukraine. Poltava: PolNTU.; 2016. p. 77. Ukrainian.

19. Tarasova N., Hlebnikova L., Kaygina E., Lyashevskaya N. Otsenka kolichestvennogo soderzhaniya iridoidov i ksantonov v Gorechavke krupnolistnoy (*G. macrophylla* Pall.). FEN-NAUKA. 2012; 15 (12): 8-10. Russian.

20. Tozhiboev M., Botirov E., Usmanova G. Ksantony i flavonoidy *Gentianaalga* Pall. Him.rastitelnogo syrya. 2010; 3: 129-133. Russian.

Надійшло до редакції 03.09.2018

Отримано виправлений варіант 04.10.2018

Підписано до друку 03.10.2018

Received in the editorial 03.10.2018

Received a revised version on 04.10.2018

Signed in the press on 04.10.2018

А. Ревуцька, асп., В. Белав, канд. біол. наук, А. Голубченко, канд. біол. наук, Н. Таран, д-р біол. наук, проф.

ННУ "Інститут біології та медицини",

Київського національного університету імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

ВИЗНАЧЕННЯ КСАНТОНІВ У РОСЛИНАХ ТА ЖИВИЛЬНОМУ СЕРЕДОВИЩІ ЗА УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ *IN VITRO*

В останні роки вторинні метаболіти, зокрема ксантони, отримали значну увагу науковців завдяки своїй біологічній активності: антиканцерогенним, противірусним, антибактеріальним, антиоксидантним, протизапальним та іншим властивостям. Тому вони використовуються для профілактики та лікування різних захворювань: раку, хвороб Альцгеймера та Паркінсона, порушень серцево-судинної системи, діабету тощо. Екстракти різних видів рослин, що містять ксантони, є компонентами хіміотерапевтичних та інших лікарських засобів. Щоб підібрати найбільш чутливий і екологічно безпечний метод якісного та кількісного визначення ксантонів у рослинних матеріалах та агаризованому живильному середовищі, було апробовано відомі методи та відібрано як прототип метод Vyisochina G. I. Et al., 2011, який застосовує етиловий спирт як екстрактор. Як рослинний матеріал ми використовували рослини різних видів, які вирощували в умовах культивування *in vitro* на агаризованому живильному середовищі. Це живильне середовище також було використане для аналізу вмісту ксантонів. На основі здійснених досліджень модифікації методу визначення вмісту ксантонів

було адаптовано до умов *in vitro*, що деталізують специфічність екстракції та кількісний розрахунок вмісту цих сполук у рослинних експлантах. Було також розроблено власний метод визначення ксантонів у агаризованому живильному середовищі. Запропонований нами метод значно прискорить процес детекції ксантонів, а також збільшить їх вихід у біотехнологічних процесах отримання фармакологічно цінних вторинних метаболітів фенольної природи.

Ключові слова: ксантони, хроматографія, спектрофотометрія, *in vitro*, рослини, живильне середовище.

А. Ревуцкая, асп., В. Белава канд. биол. наук, А. Голубченко, канд. биол. наук, Н. Таран, д-р биол. наук, проф. УНЦ "Институт биологии и медицины", Киевского национального университета имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КСАНТОНОВ В РАСТЕНИЯХ И ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЕ В УСЛОВИЯХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *IN VITRO*

В последние годы вторичные метаболиты, особенно ксантоны, получили значительное внимание ученых благодаря своей биологической активности: антиканцерогенным, противовирусным, антибактериальным, антиоксидантным, противовоспалительным и другим свойствам. Потому они используются для профилактики и лечения различных заболеваний: рака, болезней Альцгеймера и Паркинсона, сердечнососудистых заболеваний, диабета и т. д. Экстракты разных видов растений, содержащих ксантоны, входят в состав лекарственных препаратов. С целью подбора наиболее чувствительного и экологически безопасного метода качественного и количественного определения ксантонов в растительном материале и питательной среде были апробированы известные методы и отобран как прототип метод *Yvisochina G. I.* и др., 2011, который использует этанол как экстрактор. В качестве экспериментального материала мы использовали растения разных видов, выращенные в условиях *in vitro* на агаризованной питательной среде, которая также была использована для анализа. Основываясь на проведенных исследованиях, модификации метода определения содержания ксантонов были адаптированы к условиям *in vitro*, которые подробно описывают специфичность экстракции и количественного определения содержания ксантонов в эксплантах растений. Также был разработан наш собственный метод определения этих соединений в питательной среде. Предложенный нами метод значительно ускорит процесс детекции ксантонов, а также увеличит их выход в биотехнологических процессах получения фармакологически ценных вторичных метаболитов фенольной природы.

Ключевые слова: ксантоны, хроматография, спектрофотометрия, *in vitro*, растения, питательная среда.

УДК 577.151.042:616-056.52:615.322

А. Юрченко, асп., Д. Креницька, студ., М. Тимошенко, канд. біол. наук Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

СИСТЕМА ГЛУТАТИОНУ КРОВИ ЩУРІВ З ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЮ МОДЕЛЛЮ ОЖИРІННЯ В РАЗІ СПОЖИВАННЯ ЕКСТРАКТУ ЛУШПИННЯ КВАСОЛІ ЗВИЧАЙНОЇ (*PHASEOLUS VULGARIS*)

Досліджено стан глутатіонзалежної ланки антиоксидантної системи крові щурів з експериментальною моделлю ожиріння та на тлі споживання екстракту лушпиння квасолі звичайної *P. vulgaris*. Глутатіонова система є функціональною основою антиоксидантного захисту організму, а порушення її роботи може призвести до низки серйозних цитотоксичних та деструктивних ушкоджень. Складовими елементами цієї системи є власне глутатіон та ферменти, що каталізують реакції його зворотнього перетворення. До них належать глутатіонпероксидаза, глутатіонтрансфераза та глутатіонредуктаза.

Відомо, що водний екстракт лушпиння квасолі звичайної *P. vulgaris* володіє гіпоглікемічними властивостями. Однак комплексні дослідження щодо поліфункціонального впливу цього екстракту за умов ожиріння відсутні. Отримані результати свідчать про зниження загального потенціалу глутатіонової системи у тварин, що перебували на висококалорійній дієті. Виявлено, що в сироватці крові щурів за умов експериментального ожиріння знижується глутатіонпероксидазна активність (GP), а також спостерігається підвищення глутатіонтрансферазної (GT) та глутатіонредуктазної (GR) активностей порівняно з відповідними показниками в контрольних тварин. Показано зниження концентрації відновленого глутатіону (GSH) за споживання висококалорійної дієти (ВКД) порівняно з контролем.

Отримані дані після 6-тижневого споживання екстракту лушпиння квасолі звичайної *P. vulgaris* вказують на позитивний модулюючий вплив цього екстракту на вміст GSH і активність GP, GT та GR у щурів з розвитком ожиріння. Імовірно, споживання цього екстракту приводить до залучення досліджуваних компонентів антиоксидантної системи до реакцій знешкодження токсичних вільнорадикальних сполук, які утворилися на тлі розвитку ожиріння. Подальші дослідження можуть слугувати основою для розробки нових терапевтичних або лікарських препаратів на основі екстракту лушпиння квасолі звичайної *P. vulgaris*, оскільки одностайної думки щодо лікування ожиріння досі не існує.

Ключові слова: ожиріння, екстракт лушпиння квасолі звичайної, висококалорійна дієта, глутатіонова система.

Вступ. Ожиріння є однією з головних проблем XXI століття. На сьогодні поширення цього захворювання сягає значних відсотків у різних країнах світу. Ожиріння – це не тільки надлишкова маса тіла, цей патологічний стан характеризується низкою метаболічних порушень, які призводять до надлишкового накопичення жиру (тригліцеридів) у різних частинах тіла з подальшим розвитком ускладнень. Здебільшого ожиріння є не самостійним захворюванням, а складовою метаболічного синдрому, до якого також належать цукровий діабет 2 типу, артеріальна гіпертензія, гіперліпідемія (атеросклероз), гіперуринемія тощо. Доведено, що у значної кількості осіб ожиріння має аліментарний характер та є наслідком переважання їжі, надмірним вживанням легкозасвоюваних вуглеводів і тваринних жирів, порушенням складу й режиму харчування, зниженням рухової активності [1, 2, 3].

Науковий інтерес все частіше зосереджується на дослідженні властивостей екстрактів рослин через му-

льтифакторний характер їх терапевтичного впливу та менш токсичним впливом на організм на відміну від синтетичних препаратів [4]. Перспективною рослинною сировиною для отримання цукрознижувальних препаратів є квасоля звичайна (*Phaseolus vulgaris*) [5, 6, 7, 8]. Ця рослина є цінною культурою у харчовій промисловості, оскільки боби квасолі є джерелом незамінних амінокислот, зокрема лейцину, треоніну, серину, аспарагінової кислоти, аргініну [9]. За допомогою методу тонкошарової хроматографії було досліджено склад сухого екстракту ступок квасолі за вмістом флавоноїдів. В результаті було ідентифіковано такі фенольні сполуки як рутин, ізокверцитрин і ферулову кислоту [10].

Квасоля звичайна здавна використовується в народній медицині. Споживання екстракту квасолі зменшують потребу в їжі, здійснює гіпоглікемічну та гіполіпідемічну дію. [11, 12] Екстракти квасолі можуть пригнічувати активність ферментів таких як трипсин і амілаза. Ці властивості корисні для лікування та профілактики

цукрового діабету 2 типу, ожиріння та колоректального раку [13, 14, 15]. Існують свідчення, що квасоля виявляє ліпоксигеназну активність через наявність в своєму складі глікозиду соєвого сапоніну V. Відомо, що використання настою лушпиння квасолі призводить до підвищення рівня інсуліну в крові. Також доведено потужні антиоксидантні властивості різних відварів квасолі [16, 17]. Тому актуальними є подальші дослідження *Phaseolus vulgaris* як потенційного засобу для корекції метаболічних порушень за умов ожиріння.

Важливою ланкою в системі компенсаторно-приспосувальних реакцій організму є антиоксидантні механізми захисту [18]. Багато досліджень свідчать про важливу роль вільнорадикальних процесів окислення в патогенезі багатьох хронічних захворювань людини [19]. Причинами активації вільнорадикального окислення в тканинах є зниження надходження в організм екзогенних антиоксидантів аліментарним шляхом поряд з надмірним надходженням жирів і вуглеводів за недостатнього їх витрачання [20]. Функціональну основу системи антиоксидантного захисту формує глутатіонова система. Глутатіонова система відіграє значну роль у пригніченні патологічного процесу, а її виснаження може призводити до виникнення серйозних цитотоксичних і деструктивних ушкоджень [21].

Таким чином, **метою цієї роботи** було дослідити стан глутатіонової системи, а саме оцінити вміст відновленого глутатіону (GSH), активності глутатіонзалежних ензимів: глутатіонтрансферази (GT) і глутатіонпероксидази (GP) та глутатіонредуктази (GR) у сироватці крові щурів як за умов споживання висококалорійної дієти (ВКД), так і під час сумісного споживання цієї дієти з екстрактом лушпиння квасолі звичайної (*Phaseolus vulgaris*).

Матеріали і методи. Досліди виконували на білих нелінійних щурах з початковою масою 130–145 г, з дотриманням положень Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для дослідних та інших наукових цілей.

Протягом першого тижня всі щури отримували стандартну їжу та воду *ad libitum*. На 8-й день тварин рандомізовано були розділені на 3 групи. Тварини першої групи ("Контроль") протягом 10 тижнів отримували стандартну їжу та воду. Тварини другої групи ("ВКД") протягом 10 тижнів перебували на висококалорійній дієті, яка складалась зі стандартної їжі (60 %), свинячого жиру (10 %), курячих яєць (10 %), сахарози (9 %), арахісу (5 %), сухого молока (5 %) та рослинної олії (1 %) та

отримували воду [22]. Тварини третьої групи ("ВКД+Екстракт") протягом 10 тижнів перебували на висококалорійній дієті та отримували воду. Через 4 тижні після початку експерименту тварини почали отримувати екстракт стручків квасолі. Водний розчин сухого екстракту лушпиння *P. vulgaris* давали пити тваринам з розрахунку 200 мг/кг.

У всіх досліджуваних групах щурів масу тіла реєстрували 1 раз на тиждень, споживання корму та води реєстрували щоденно. Індекс маси тіла (ІМТ) (відношення маси тіла (г) щурів до квадрату довжини тіла (см²)) було розраховано наприкінці експерименту.

Результати та їх обговорення. Відомо, що засоби лікування ожиріння на сьогодні відсутні, тому дедалі більшого інтересу набуває вивчення можливих терапевтичних засобів. Водночас з контролем калорійності споживаної їжі та різноманітними фізичними навантаженнями, перспективним може бути споживання певних речовин, які запобігають розвитку ожиріння. Пошук нових терапевтичних агентів серед рослинної сировини є перспективним на сьогоднішній день. Особлива увага приділяється вмісту у сировині антиоксидантів. Саме вони здатні попереджати вільнорадикальне окиснення біологічних структур організму, таким чином, запобігаючи розвитку патологічних змін.

Кооперативна робота ферментів антиоксидантної системи є важливим чинником, від якого залежить концентрація вільних радикалів у крові та тканинах організму. Важливою ланкою антиоксидантного захисту є глутатіонова система, яка здійснює захист тканин від дії активних форм кисню [23, 24]. Основними складовими елементами її є власне глутатіон та ензими, що каталізують реакції його зворотного перетворення. GSH-головний модулятор ферментативної редокс-системи глутатіону, а також активності глутатіонзалежних ензимів. До них належать GT, GP та GR. Ці ензими забезпечують детоксикацію перекисів та інактивацію вільних радикалів, завдяки чому захищають організм від окисного пошкодження, що відбувається і в разі ожиріння. Глутатіон бере безпосередню участь багатьох процесах життєдіяльності клітини, а порушення його гомеостазу може свідчити про розвиток патологічних змін на фоні розвитку ожиріння [21].

Таким чином, першим етапом нашого дослідження було визначення вмісту відновленого глутатіону в сироватці крові дослідних груп щурів (рис. 1).

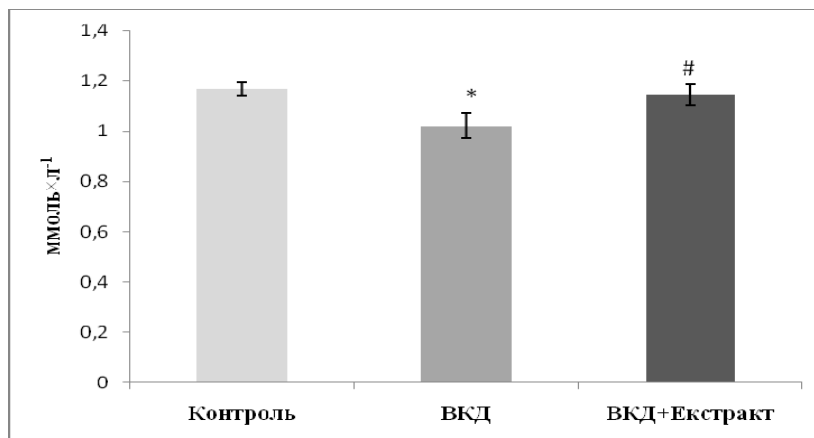


Рис. 1. Концентрація відновленого глутатіону в сироватці крові щурів дослідних груп: "Контроль", "ВКД" та "ВКД+Екстракт" ($M \pm n$, $n = 10$)

* – $p < 0,05$ різниці щодо контролю;

– $p < 0,05$ різниці щодо групи "ВКД"

10-тижневе споживання висококалорійної дієти призвело до зниження цього показника на 15 % стосовно контролю. Виявлені зміни, імовірно, свідчать про використання глутатіону в реакціях знешкодження токсичних вільнорадикальних сполук, які утворилися на фоні розвитку ожиріння. Після 6-ти тижнів сумісного споживання висококалорійного корму з екстрактом лушпиння квасолі *P. vulgaris*, спостерігали підвищення вмісту GSH у сироватці крові щурів до значень, близьких до контрольних (рис. 1).

З літератури відомо також, що низька концентрація глутатіону в еритроцитах призводить до активації перекисного окиснення ліпідів. Це визначено за деяких форм гемолітичних анемій [25–27].

Наступним етапом нашого дослідження було визначити активність глутатіонпероксидази – одного з ключових ензимів антиоксидантної системи (рис. 2). Основною його функцією є руйнування та інактивація перекису водню і пероксидних радикалів (токсичних сполук кисню).

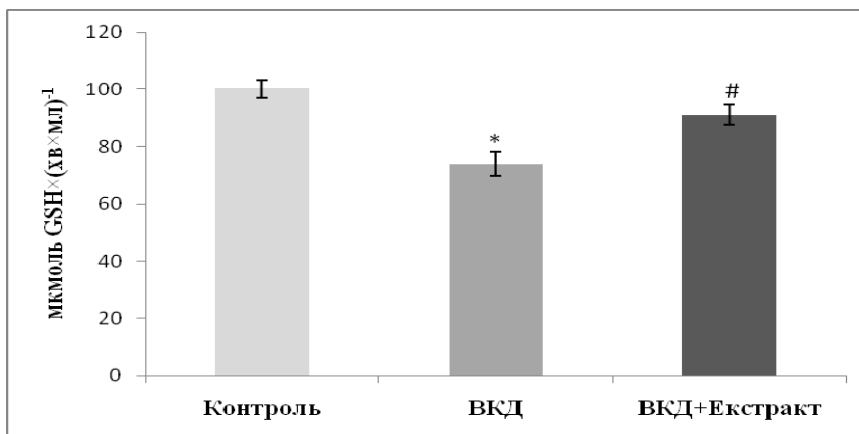


Рис. 2. Глутатіонпероксидазна активність у сироватці крові щурів дослідних груп: "Контроль", "ВКД" та "ВКД+Екстракт" ($M \pm n$, $n = 10$)

* – $p < 0,05$ різниці щодо контролю;
– $p < 0,05$ різниці щодо групи "ВКД"

На рис. 2 показано зменшення активності GP у групі тварин, що перебували на більш висококалорійній дієті щодо значень контрольної групи тварин на 27 %. Пригнічення ферментативної активності GP корелює зі зниженням вмісту внутрішньоклітинного GSH, або може бути пов'язане з накопиченням продуктів ліпопероксидації. Споживання екстракту лушпиння квасолі *P. vulgaris* призводило до підвищення рівня ферментативної активності GP порівняно зі значеннями групи тварин, що перебували на висококалорійній дієті на

23 %. Це свідчить про певний модулюючий вплив на активність GP в сироватці крові дослідних тварин (рис. 2).

Також було досліджено ферментативну активність глутатіонтрансферази (ензиму, що нейтралізують токсичний вплив різних гідрофобних і електрофільних сполук шляхом їх кон'югації з відновленим глутатіоном). На рис. 3 показано підвищення рівня цього ферменту у групі тварин, що споживали висококалорійну їжу на 23 % порівняно з контролем, на відміну від значень активності GP.

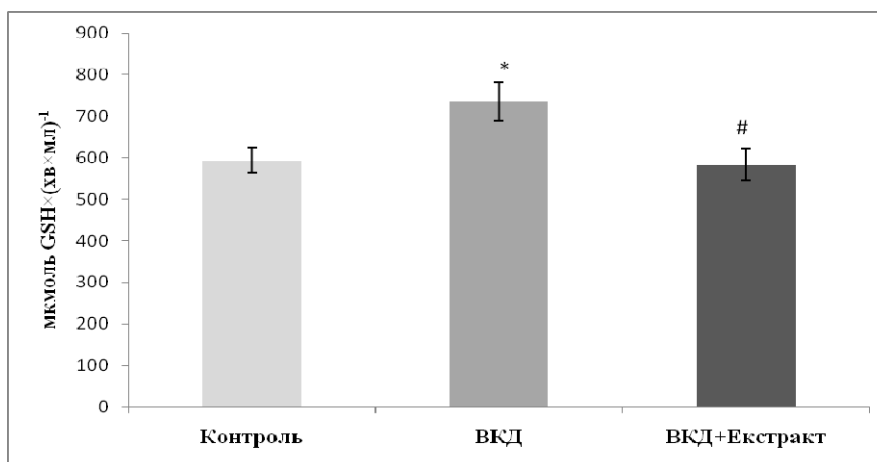


Рис. 3. Глутатіонтрансферазна активність у сироватці крові щурів дослідних груп: "Контроль", "ВКД" та "ВКД+Екстракт" ($M \pm n$, $n = 10$)

* – $p < 0,05$ різниці щодо контролю;
– $p < 0,05$ різниці щодо групи "ВКД"

Підвищення активації цього показника можна розглядати як компенсаторну реакцію в разі зниження активності

GP за однакових умов. Активність GT у щурів, які споживали екстракту лушпиння квасолі *P. vulgaris* зменшувалася

лась по відношенню до групи тварин "ВКД" і досягала рівня близького до значень контрольної групи тварин.

У щурів, які протягом шести тижнів були на сумісному споживанні висококалорійного корму та екстракту лушпиння квасолі *P. vulgaris*, зареєстровано підвищення

ферментативної активності GR на 42 % порівняно зі щурами групи ВКД (рис. 4), тоді як активність GR у групі тварин, що споживали висококалорійну їжу, зменшувалась порівняно з контролем на 31 %.

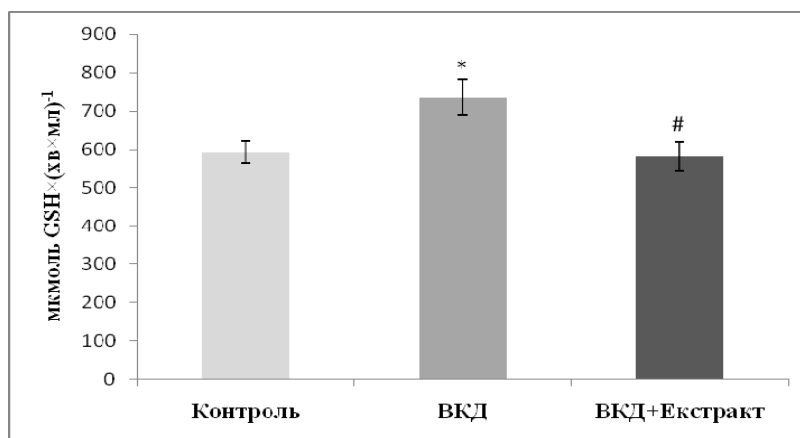


Рис. 4. Глутатіонредуктазна активність у сироватці крові щурів дослідних груп: "Контроль", "ВКД" та "ВКД+Екстракт" ($M \pm n$, $n = 10$)

* – $p < 0,05$ різниці щодо контролю;

– $p < 0,05$ різниці щодо групи "ВКД"

Тобто спостерігається певний модулюючий вплив екстракту лушпиння квасолі *P. vulgaris* на ферментативну активність GR в сироватці крові за розвитку ожиріння у щурів.

Беручи до уваги той факт, що до складу сухого екстракту стулок квасолі звичайної входять фенольні сполуки [10], можна говорити про їх антиоксидантну дію за розвитку ожиріння. Антиоксидантна властивість обумовлена нейтралізацією вільних радикалів ($-OH$ та $-O_2$)-активних форм кисню. В літературі широко описані антиоксидантні властивості рутину і кверцетину [28, 29]. Рутин знищує продукти пероксидації в клітині. Крім того, його високий антиоксидантний потенціал обумовлений здатністю підвищувати активність ферментів власного антиоксидантного захисту організму. Також досить багато лікувальних ефектів рослинних поліфенолів пов'язують з їх антирадикальними і метал-хелатуючими властивостями.

Таким чином, споживання екстракту лушпиння квасолі *P. vulgaris* ймовірно призводить до залучення досліджуваних компонентів антиоксидантної системи до реакцій знешкодження токсичних вільнорадикальних сполук, які утворилися на фоні розвитку ожиріння. Однак механізм дії екстракту лушпиння квасолі звичайної на розвиток ожиріння залишається досі недостатньо вивченим. Отже, необхідними залишаються більш поглиблені дослідження властивостей цього екстракту.

Висновок. Отже, отримані результати вказують на відновлення глутатіон-залежної ферментативної ланки антиоксидантного захисту у щурів з ожирінням за умов споживання екстракту лушпиння *P. vulgaris*. На підставі отриманих результатів можна зробити висновок, що за умов довготривалого споживання водного екстракту лушпиння *P. vulgaris* поліпшуються показники прооксидантно-антиоксидантного статусу у щурів з моделлю ожиріння.

Список використаних джерел:

1. Бутрова С. А. Метаболический синдром: патогенез, клиника, диагностика, подходы к лечению / С. А. Бутрова // РМЖ – 2001. – Т. 2, № 9. – С. 56–60.
2. Phelan S. Combining behavioral and pharmacological treatments for obesity / S. Phelan, T. A. Wadden // *Obes. Res.* – 2002. – Vol. 10. – P. 560–574

3. Анциферов М. Б. Ожирение. Метаболический синдром. Сахарный диабет 2 типа / М. Б. Анциферов; под ред. акад. РАМН И. И. Дедова. – М., 2000. – С. 53–61.

4. Khan V. N. Pharmacological appraisal of medicinal plants with anti-diabetic potential / V. N. Khan, A. K. Najmi, M. Akhtar // *J. Pharm. Bioallied. Sci.* – 2012. – Vol. 4, № 1. – P. 27–42.

5. Ngoh Y. Y. Enzyme-assisted extraction and identification of antioxidative and α -amylase inhibitory peptides from Pinto beans (*Phaseolus vulgaris* cv. Pinto) / Y. Y. Ngoh, C. Y. Gan // *Food Chem.* – 2016. – Vol. 190. – P. 331–337.

6. Comparison of the α -amylase inhibitor-1 from common bean (*Phaseolus vulgaris*) varieties and transgenic expression in other legumes: post-translational modifications and immunogenicity / P. M. Campbell, D. Reiner, A. E. Moore et al. // *Agric. Food. Chem.* – 2011. – Vol. 59, № 11. – P. 6047–6054.

7. Effect of antidiabetic herbal preparation on serum glucose and fructosamine in NOD mice / R. Petkevski, M. Hadzija, M. Slijepcevic, D. Juretic // *Ethnopharmacol.* – 2001. – Vol. 75, № 2–3. – P. 181–184.

8. In vivo action of α -amylase inhibitor from cranberry bean (*Phaseolus vulgaris*) in rat small intestine / M. Kotaru, K. Iwami, H. Y. Yeh, F. Ibuki // *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*. – 1989. – Vol. 35, № 6. – P. 579–88.

9. Khaleeva L. D. Comparative evaluation of the hypoglycemic activity of the vegetal complex of *Phaseolus vulgaris* and chlorpropamide in experimental diabetes / L. D. Khaleeva, L. N. Maloshtan, A. G. Sytnik // *Probl. Endokrinol. (Mosk)*. – 1987. – Vol. 33, № 2. – P. 69–71.

10. Вронська Л. В. Стандартизація сухого екстракту стулок квасолі за вмістом флавоноїдів / Л. В. Вронська // *Медична та клінічна хімія*. – 2018. – Т. 20. – № 1. – С. 123–129.

11. Appetite Control and Glycaemia Reduction in Overweight Subjects treated with a Combination of Two Highly Standardized Extracts from *Phaseolus vulgaris* and *Cynara scolymus* / M. Rondanelli, A. Giacosa, F. Orsini et al. // *Phytother. Res.* – 2011. – Sep. 25(9). – P. 1275–1282.

12. *Phaseolus vulgaris* extract affects glycometabolic and appetite control in healthy human subjects / A. Spadafranca, S. Rinelli, A. Riva // *Br. J. Nutr.* – 2012. – P. 1–7.

13. Barrett M. L. A proprietary α -amylase inhibitor from white bean (*Phaseolus vulgaris*): a review of clinical studies on weight loss and glycaemic control / M. L. Barrett, J. K. Udani // *Nutr. J.* – 2011. – Mar. 17, 10, 24.

14. Helmstädter A. Antidiabetic drugs used in Europe prior to the discovery of insulin / A. Helmstädter // *Pharmazie*. – 2007. – Sep. 62(9). – P. 717–720.

15. Hutchins A. M. *Phaseolus* beans: impact on glycaemic response and chronic disease risk in human subjects / A. M. Hutchins, D. M. Winham, S. V. Thompson // *Br. J. Nutr.* – 2012. – Aug. – 108 Suppl 1. – P. 52–65.

16. Obiro W. C. The nutraceutical role of the *Phaseolus vulgaris* α -amylase inhibitor / W. C. Obiro, T. Zhang, B. Jiang // *Br. J. Nutr.* – 2008. – Jul. 100(1). – P. 1–12.

17. Oomah B. D. Antioxidant and Antiinflammatory Activities of Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Hulls / B. D. Oomah, A. Corb , P. Balasubramanian // *J. Agric. Food. Chem.* – 2010. – Jul. 28. 58(14). – P. 8225–8230.

18. Балаболкин М. И. Свободно-радикальное окисление и антиоксидантная защита при сахарном диабете / М. И. Балаболкин, Е. М. Клебанова; под ред. И. И. Дедова. – 2003. – С. 40.

19. Антиоксидантная активность сыворотки крови / Г. И. Клебанов, Ю. О. Теселкин, И. В. Бабенкова и др. // Вестн. РАМН. – 1999. – № 2. – С. 15–21.
 20. Бобырева Л. Е. Пробл. Эндокринологии / Л. Е. Бобырева // 1996. – Т. 42, № 6. – С. 14–20.
 21. Kalinina E. V. Role of glutathione, glutathione transferase, and glutaredoxin in regulation of redox-dependent processes / E. V. Kalinina, N. N. Chernov, M. D. Novichkova // Biochemistry. – 2014. – 79(13) – P. 1562–1583.
 22. Lissner L. Dietary fat and obesity: evidence from epidemiology / L. Lissner, B. L. Heitmann // European Journal of Clinical Nutrition. – 1995. – № 49. – P. 79–90.
 23. Genestra Marcelo. Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants / Marcelo Genestra // Cellular Signalling. – 2007. – T. 19. – P. 1807–1819.
 24. Satish Balasaheb Nimse. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms / Satish Balasaheb Nimse, Dilipkumar Palb. // RSC Advances. – 2015. – T. 35. – P. 27986–28006.
 25. Беленічев І. Ф. Антиоксидантна система захисту організму (огляд) / І. Ф. Беленічев, Д. Л. Левитський, С. І. Коваленко // Сучасні проблеми токсикології. – 2002. – Т. 3. – С. 29–31.
 26. Василів О. Вплив сполук феруму мангану на вміст глутатіону у клітинах сірководновідновлювальних бактерій *Desulfuromonas acetoxidans* / О. Василів, С. Гнатюш // Біологічні студії. – 2011. – Т. 5(1). – С. 5–10.
 27. Акимішин М. М. Активність ензимів антиоксидантного захисту в рпродуктивних органах корів за норма та патології / М. М. Акимішин, Н. В. Кузьміна, Р. Г. Сачко // Наук. вісн. ЛНУВМБТ ім. С. З. Гжицького. – 2014. – Т. 2(59). – С. 3–9.
 28. Хайруллина В. Р. Экспериментальное и теоретическое исследование антирадикальной активности природных полифенолов : дис. ... канд. хим. наук : 02.00.04 / В. Р. Хайруллина. – Уфа, 2005. – 180 с.
 29. Chen C. K. Vasorelaxing activity of resveratrol and quercetin in isolated rat aorta / C. K. Chen, C. R. Pace-Asciak // General Pharmacol. – 1996. – № 2. – P. 363–366.
- References:**
1. Бутрова С. А. Метаболический синдром: патогенез, клиника, диагностика, подходы к лечению. Бутрова С. А. ПМЖ. 2001; 2, №9: 56-60. Українська.
 2. Phelan S. Combining behavioral and pharmacological treatments for obesity. Phelan S., Wadden T.A. Obes. Res. 2002; 10: 560–574. English.
 3. Анциферов М.Б. Ожирение. Метаболический синдром. Сахарный диабет 2 типа. Анциферов М.Б. Под ред. акад. РАМН И.И. Дедова. 2000; 53–61. Русский.
 4. Khan V.N. Pharmacological appraisal of medicinal plants with anti-diabetic potential. V.N. Khan, A.K. Najmi, M. Akhtar. J. Pharm. Bioallied. Sci. 2012; 4, №1: 27–42. English.
 5. Ngoh Y.Y. Enzyme-assisted extraction and identification of antioxidant and α -amylase inhibitory peptides from Pinto beans (*Phaseolus vulgaris* cv. Pinto). Y.Y. Ngoh, C.Y. Gan. Food Chem. 2016; 190: 331-337. English.
 6. Campbell P.M. Comparison of the α -amylase inhibitor-1 from common bean (*Phaseolus vulgaris*) varieties and transgenic expression in other legumes-post-translational modifications and immunogenicity. P.M. Campbell, D. Reiner, A.E. Moore [et al.]. Agric. Food. Chem. 2011; 59, № 11: 6047-6054. English.
 7. Petlevski R. Effect of 'antidiabetic' herbal preparation on serum glucose and fructosamine in NOD mice. R. Petlevski, M. Hadzija, M. Slijepcevic, D. Juretic. Ethnopharmacol. 2001; 75, № 2-3: 181-184. English.
 8. Kotaru M., Iwami K., Yeh H.Y., Ibuki F. In vivo action of alpha-amylase inhibitor from cranberry bean (*Phaseolus vulgaris*) in rat small intestine. M. Kotaru, K. Iwami, H.Y. Yeh, F. Ibuki. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo). 1989; 35, № 6: 579-88. English.
 9. Khaleeva L.D. Comparative evaluation of the hypoglycemic activity of the vegetal complex of *Phaseolus vulgaris* and chlorpropamide in experimental diabetes. L.D. Khaleeva, L.N. Maloshtan, A.G. Sytnik. Probl. Endokrinol. (Mosk). 1987; 33, № 2: 69-71. English.
 10. Л. В. Вронська. Стандартизація сухого екстракту стулок квасолі за вмістом флавоноїдів. Л. В. Вронська. Медична та клінічна хімія. 2018; 20. № 1: 23-129. Українська.
 11. Rondanelli M. Appetite Control and Glycaemia Reduction in Overweight Subjects treated with a Combination of Two Highly Standardized Extracts from *Phaseolus vulgaris* and *Cynara scolymus*. Rondanelli M., Giacosa A., Orsini F., Opizzi A., Villani S. Phytother. Res. 2011; 25(9): 1275-1282. English.
 12. Spadafranca A. Phaseolus vulgaris extract affects glycometabolic and appetite control in healthy human subjects. Spadafranca A., Rinelli S., Riva A., Morazzoni P., Magni P., Bertoli S., Battezzati A. Br. J. Nutr. 2012. 1-7. English.
 13. Barrett M.L. A proprietary alpha-amylase inhibitor from white bean (*Phaseolus vulgaris*): a review of clinical studies on weight loss and glycaemic control. Barrett M.L., Udani J.K. Nutr. J. 2011. 17, 10, 24. English.
 14. Helmstädter A. Antidiabetic drugs used in Europe prior to the discovery of insulin. Helmstädter A. Pharmazie. 2007; 62(9): 717-720. English.
 15. Hutchins A.M. Phaseolus beans: impact on glycaemic response and chronic disease risk in human subjects. Hutchins A.M., Winham D.M., Thompson S.V. Br. J. Nutr. 2012; 108 (1): 52-65. English.
 16. Obiro W.C. The nutraceutical role of the *Phaseolus vulgaris* alpha-amylase inhibitor. Obiro W.C., Zhang T., Jiang B. Br. J. Nutr. 2008; 100(1): 1-12. English.
 17. Oomah B.D. Antioxidant and Antiinflammatory Activities of Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Hulls. Oomah B.D., Corb   A., Balasubramanian P. J. Agric. Food. Chem. 2010; 58(14): 8225-8230. English.
 18. Балаболкин М.И. Свободно-радикальное окисление и антиоксидантная защита при сахарном диабете. Балаболкин М.И., Клебанова Е.М. Под ред. И.И. Дедова. 2003. 40. Русский.
 19. Клебанов Г.И. Антиоксидантная активность сыворотки крови. Вестн. Клебанов Г.И., Теселкин Ю.О., Бабенкова И.В. и др. РАМН. 1999; 2: 15-21. Русский.
 20. Бобырева Л.Е. Пробл. Эндокринологии. Бобырева Л.Е. 1996; 42 (6): 14 – 20. Русский.
 21. Kalinina E.V. Role of glutathione, glutathione transferase, and glutaredoxin in regulation of redox-dependent processes. Kalinina E.V., Chernov N.N., Novichkova M.D. Biochemistry. 2014; 79(13): 1562-83. English.
 22. Lissner L. Dietary fat and obesity: evidence from epidemiology. Lissner L., Heitmann B.L. European Journal of Clinical Nutrition. 1995; 49: 79-90. English.
 23. Marcelo Genestra. Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. Marcelo Genestra Cellular Signalling. 2007; 19: 1807–1819. English.
 24. Satish Balasaheb Nimse. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. Satish Balasaheb Nimse., Dilipkumar Palb. RSC Advances. 2015; 35: 27986–28006. English.
 25. Беленічев І. Ф. Антиоксидантна система захисту організму (огляд). Беленічев І. Ф., Левитський Д. Л., Коваленко С. І. Сучасні проблеми токсикології. 2002; 3: 29– 31. Українська.
 26. Василів О. Вплив сполук феруму мангану на вміст глутатіону у клітинах сірководновідновлювальних бактерій *Desulfuromonas acetoxidans*. Василів О., Гнатюш С. Біологічні студії. 2011; 5(1): 5–10. Українська.
 27. Акимішин М. М. Активність ензимів антиоксидантного захисту в рпродуктивних органах корів за норма та патології. Акимішин М. М., Кузьміна Н. В., Сачко Р. Г. Наук. вісник ЛНУВМБТ ім. С.З. Гжицького. 2014; 2(59): 3–9. Українська.
 28. Хайруллина В. Р. Экспериментальное и теоретическое исследование антирадикальной активности природных полифенолов. Хайруллина В. Р. Дис. ... канд. хим. наук: 02.00.04: Уфа. 2005; 180 с. Русский.
 29. Chen C. K. Vasorelaxing activity of resveratrol and quercetin in isolated rat aorta. Chen C. K., Pace-Asciak C. R. General Pharmacol. 1996; N 2: 363–366. English.

Надійшла до редколегії 03.09.2018

Отримано виправлений варіант 04.10.2018

Підписано до друку 03.10.2018

Received in the editorial 03.10.2018

Received a revised version on 04.10.2018

Signed in the press on 04.10.2018

А. Юрченко, асп., Д. Креницкая, студ., М. Тимошенко, канд. биол. наук
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

СИСТЕМА ГЛУТАТИОНА КРОВИ КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛЬЮ ОЖИРЕНИЯ ПРИ ПОТРЕБЛЕНИИ ЭКСТРАКТА СТВОРОК ФАСОЛИ ОБЫКНОВЕННОЙ (PHASEOLUS VULGARIS)

Исследовано состояние глутатионзависимого звена антиоксидантной системы крови крыс с экспериментальной моделью ожирения и на фоне потребления экстракта створок фасоли обыкновенной *P. vulgaris*. Глутатионовая система является функциональной основой антиоксидантной защиты организма, а нарушение ее работы может привести к ряду серьезных цитотоксических и деструктивных повреждений. Составными элементами этой системы являются собственно глутатион и ферменты, которые катализируют реакции его обратного преобразования. К ним относятся глутатионпероксидаза, глутатионтрансфераза и глутатионредуктаза.

Известно, что водный экстракт шелухи фасоли обыкновенной *P. vulgaris* обладает гипогликемическими свойствами. Однако комплексные исследования полифункционального действия данного экстракта в условиях ожирения отсутствуют. Полученные результаты свидетельствуют о снижении общего потенциала глутатионовой системы у животных, находящихся на высококалорийной диете. Установлено, что в сыворотке крови крыс в условиях экспериментального ожирения снижается глутатионпероксидазная активность (GP), а также наблюдается повышение глутатионтрансферазной (GT) и глутатионредуктазной (GR) активностей по

сравнению с соответствующими показателями у контрольных животных. Показано снижение концентрации восстановленного глутатиона (GSH) при потреблении высококалорийной диеты (ВКД) по сравнению с контролем.

Полученные данные после 6-недельного потребления экстракта шелухи фасоли обыкновенной *P. vulgaris* указывают на положительное модулирующее влияние данного экстракта на содержание GSH и активность GP, GT и GR у крыс с развитием ожирения. Вероятно, потребление данного экстракта приводит к привлечению исследуемых компонентов антиоксидантной системы к реакциям обезвреживания токсичных свободнорадикальных соединений, которые образовались на фоне развития ожирения. Дальнейшие исследования могут служить основой для разработки новых терапевтических или лекарственных препаратов на основе экстракта шелухи фасоли обыкновенной *P. vulgaris*, поскольку единого мнения относительно лечения ожирения до сих пор не существует.

Ключевые слова: ожирение, экстракт створок фасоли обыкновенной, высококалорийная диета, глутатионовая система.

A. Yurchenko, PhD-stud., D. Krenytska, stud., M. Tymoshenko, PhD
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

THE RAT BLOOD GLUTATHIONE SYSTEM UNDER OBESITY DEVELOPMENT WITH THE COMPATIBLE CONSUMPTION OF THE KIDNEY BEAN (*PHASEOLUS VULGARIS*) PODS EXTRACT

The state of the glutathione-dependent link of the antioxidant blood system of rats under obesity development and with the compatible consumption of the kidney bean (*P. vulgaris*) pods extract was studied. Glutathione system forms functional basis of organism antioxidant defense system and disturbances in its work can lead to a number of serious cytotoxic and destructive lesions. Glutathione system constituent elements has its own glutathione and enzymes, which catalyze the reaction of its reverse transformation. These include glutathione peroxidase, glutathione transferase, and glutathione reductase.

It is known that the water kidney bean (*P. vulgaris*) pods extract has hypoglycemic properties. However, complex studies of the polyfunctional action of this extract in obesity are absent. The obtained results indicate a decrease in the overall potential of the glutathione system in animals on a high-calorie diet. It has been established that glutathione peroxidase activity (GP) decreases in the serum of rats under experimental obesity, also glutathione transferase (GT) and glutathione reductase (GR) activity increase compared to the corresponding values in control animals. Our results demonstrated the concentration decrease of recovered glutathione (GSH) under consumption of high-calorie diet compared to the control.

The findings after 6-th weeks of kidney bean (*P. vulgaris*) pods extract consumption indicate the positive modulating effect of this extract on the content of GSH and the activity of GP, GT and GR in rats with the obesity development. Probably, the consumption of this extract leads to attraction of the investigated components of the antioxidant system to the reactions of neutralization of toxic free radical compounds that were formed against the background of the development of obesity. Further studies may serve as the basis for the development of new therapeutic or medicinal preparations that based on the kidney bean (*P. vulgaris*) pods extract, because of still no consensus on the treatment of obesity.

Key words: obesity, kidney beans pods extract, high-calorie diet, glutathione system.

УДК: 616.65-006-005.1-08

А. Василякі, студ., В. Дмитрик, асп., Т. Луговська, канд. біол. наук
ННЦ "Інститут біології та медицини", Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна,
П. Яковлев, канд. мед. наук
Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, Київ, Україна

ПОКАЗНИКИ ГЕМОСТАТИЧНОГО ПОТЕНЦІАЛУ НА РІЗНИХ СТАДІЯХ РАКУ СЕЧОВОГО МІХУРА

Рак сечового міхура (PCM) характеризується високим показником смертності та є 9-м за частотою онкологічним захворюванням у світі. За великого арсеналу діагностичної бази, до якого входить цистоскопія, ультразвукове дослідження, комп'ютерна та магнітно-резонансна томографія, цитологія осаду сечі, важко точно визначити ступінь поширення або розвитку пухлини. На сьогодні актуальним залишається пошук молекулярно-біохімічних прогностичних показників, які характеризувалися би високою специфічністю та чутливістю до розвитку PCM. Лабораторні методи дослідження можуть робити вагомий внесок в оцінку агресивності пухлинної прогресії за умов PCM. Згідно із сучасними науковими даними, в онкохворих спостерігається дисбаланс у коагуляційній системі, проявом якого є активація системи згортання крові. Активація системи гемостазу супроводжується появою в кровотоці специфічних маркерів, які відображають ступінь підвищення гемостатичного потенціалу крові, таких як рівень фібрину, фібриногену, протромбінового індексу, активованого часткового тромбoplastинного часу (АЧТЧ), активованого часу рекальцифікації (АЧР). Результати досліджень різних онкологічних захворювань вказують на підвищений рівень компонентів системи активації плазміногену, у тому числі на інгібітор активатора плазміногену-1 (PAI-1). Наявні дані літератури, які вказують на прогностичну цінність показників системи згортання крові та системи протеолізу в разі раку сечового міхура (PCM), є нечисленними й неповними. Також нечисленні дані, які вказують на взаємозв'язок цих показників зі ступенем PCM згідно з гістопатологічною класифікацією, не сформована клініко-лабораторна концепція використання в клінічній онкології. У ході дослідження було виявлено значне порушення балансу деяких компонентів системи гемостазу в крові пацієнтів, а також рівень PAI-1 у пацієнтів, у котрих діагностовано PCM різних стадій відповідно до гістопатологічної класифікації. Помічене значне зростання вмісту фібрину, фібриногену та PAI-1 залежно від стадії PCM. Досліджувані показники можуть зробити вагомий внесок у характеристику PCM залежно від стадії за гістопатологічною класифікацією.

Ключові слова: рак сечового міхура, система гемостазу, фібрин, фібриноген, PAI-1.

Вступ. Рак сечового міхура (PCM) характеризується високим показником смертності в усьому світі. PCM є 9-тим за частотою онкологічним захворюванням у світі. Згідно зі статистикою, найбільшу кількість діагностованих пацієнтів помічено в розвинених країнах. Близько 75 % хворих – чоловіки [3, 8, 11].

Система гемостазу реагує на появу в організмі злоякісного процесу однією з перших. Основними клінічними проявами в цій системі є протилежні один одному стани – тромбози та кровотечі, які представляють собою результат глибинних порушень в єдиній системі і часто є стадіями одного процесу. Трансформовані клі-

тини відомі здатністю проявляти протромботичний ефект індукуючи агрегацію та активацію тромбоцитів [1, 13, 33]. Наявність в організмі злоякісного процесу суттєво підвищує ризик тромботичних ускладнень. Тромботичні ускладнення, до яких відносять тромбоз глибоких вен (ТГВ) та тромбоемболія легеневої артерії (ТЕЛА), являються найбільш значущими ускладненнями складних урологічних операцій, більш того, ТЕЛА є причиною більшості літальних випадків в післяопераційний період [1, 3, 5, 7, 23, 26]. Тромбоз, асоційований з онкологічними захворюваннями (синдром Трюсо), яв-

ляється другою причиною смертей внаслідок онкологічних захворювань [1, 3, 5, 7, 10].

Для визначення тактики хірургічного лікування хворих на рак сечового міхура (PCM) важливо визначити інвазію або поверхневий ріст пухлини. За великого арсеналу діагностичної бази, до якого входить цистоскопія, ультразвукове дослідження, комп'ютерна та магнітно-резонансна томографія, цитологія осаду сечі, важко точно визначити ступінь поширення або розвитку пухлини [8, 25]. Лабораторні методи дослідження можуть зробити вагомий внесок в оцінку агресивності пухлинної прогресії за умов PCM [3, 8, 11].

На сьогодні актуальним залишається пошук молекулярно-біохімічних прогностичних показників, які б характеризували високою специфічністю та чутливістю для розвитку PCM [3, 8, 11, 16, 18]. Діагностична цінність маркерів патологічних процесів зростає, а отже, важливо робити дослідження комплексно. На основі детального розгляду маркерів можливе виявлення оптимальної комбінації маркерів патологічних процесів, у тому числі патогенезу онкологічних процесів на різних стадіях.

Система згортання крові є динамічною, за нормальних фізіологічних умов характерним є баланс між кровотечею та згортанням крові, але за патологічних умов відбувається порушення балансу в системі гемостазу. [17, 18, 19, 21, 25]. Згідно із сучасними науковими даними, в онкохворих спостерігається дисбаланс в коагуляційній системі, проявом якого є активація системи згортання крові [17, 21, 25]. Зв'язок між злоякісними захворюваннями та факторами коагуляції виявлено більш як століття тому [25]. Гіперфібриногенемія та гіперкоагуляція асоціюються зі швидким ростом пухлин ще з 1960 року [17, 25].

Активація системи гемостазу супроводжується появою в кровотоці специфічних маркерів, які відображають ступінь підвищення гемостатичного потенціалу крові, такі як рівень фібрину, фібриногену, протромбінового індексу, активованого часткового тромбoplastинного часу (АЧТЧ), активованого часу рекальцифікації (АЧР). Не менш важливим фактором інвазії та метастазування пухлин є протеолітична система. Важливим компонентом протеолітичної системи є система активації плазміногену, центральну роль в останній відіграє серинова протеаза урокіназного типу (uPA) [3, 6, 7, 28]. Іншим активатором плазміногену є активатор плазміногену тканинного типу. На відміну від uPA, tPA має властивість сильної афінності до фібрину і може бути задіяна в процес тромболізу [6,9]. Активність плазміногенних активаторів може бути нейтралізована двома специфічними інгібіторами: інгібітором активації плазміногену 1-го типу (PAI-1) та інгібітором активації плазміногену 2-го типу PAI-2 [3, 27]. Результати досліджень різних онкологічних захворювань можуть вказувати на підвищений рівень компонентів системи активації плазміногену в патологічних тканинах [3, 4, 2, 8]. Крім того, високі концентрації uPA та PAI-1 є чутливим прогностичним маркером за інших онкологічних захворювань [3, 28].

Літературні дані, які свідчать про прогностичну цінність показників системи згортання крові за розвитку PCM є нечисленними та комплексними [30]. Недостатньо висвітлено питання щодо ролі PAI-1 як прогностичного маркера в разі PCM [3]. Також нечисленні дані, які вказують на взаємозв'язок цих показників зі ступенем PCM згідно з гістопатологічною класифікацією, не сфо-

рмована клініко-лабораторна концепція використання в клінічній онкології.

Метою нашої роботи було дослідити зміни гемостатичного потенціалу крові, а саме рівень фібрину, фібриногену, протромбінового індексу, АЧТЧ та АЧР залежно від стадії PCM згідно з гістопатологічною класифікацією.

Матеріали та методи. Плазма отримана з крові чоловіків з PCM. Пацієнти були розділені на 4 групи залежно від ступеня диференціації пухлини згідно з гістопатологічною градацією [11]. Остаточний діагноз ставився після рентгенологічних, ендоскопічних, клінічних методів дослідження з обов'язковою морфологічною верифікацією. Групу контролю становили 11 чоловіків без онкологічних патологій в анамнезі. Група хворих на PCM зі стадією G1 складалася з 12 чоловіків, зі стадією G2 – 14 чоловіків, G3 – 13 чоловіків. Чисельність пацієнтів з PCM стадії G4 була недостатньою для статистичної обробки даних.

Для визначення показників гемостатичної системи в плазмі крові, таких як рівень фібрину, фібриногену, протромбінового індексу, АЧТЧ, АЧР, використовували біохімічний аналізатор. Вміст PAI-1 досліджували методом імуноферментного аналізу в модифікації ELISA [11, 24].

Статистичну обробку отриманих результатів здійснювали за допомогою методів варіаційної статистики з використанням комп'ютерної програми *Excel*.

Результати та обговорення. Трансформовані клітини можуть безпосередньо продукувати різноманітні прокоагулянти, які активують згортання крові. Найбільш вивчені: тканинний фактор та раковий прокоагулянт [18]. Окрім того, трансформовані тканини активують прокоагулянтні властивості системи гемостазу за рахунок утворення рецептора фактору V. Цей рецептор локалізується на поверхні мембран трансформованих клітин і посилює формування протромбінового комплексу (фактор V, фактор X, кальцій, тромбоцити) [18].

Прозапальні цитокіни, які виділяються пухлинами і клітинами крові, порушують регуляцію тромбомодуліна в ендотеліальних клітинах, а також підвищують експресію тканинного фактора та інгібіторів фібринолізу – PAI-1 в ендотелії. Порушення регуляторної функції ендотелію знижує синтез антитромбіну III і протеїну С печінки, що веде до посилення прокоагуляційної та зниження антикоагуляційної та фібринолітичної активності судинної стінки та, як наслідок, має важливе значення в формуванні судинних тромбів [18, 23].

Активація системи гемостазу в результаті дії онкологічних прокоагулянтів, прозапальних цитокінів, тканинного фактору моноцитів, тканинних макрофагів і ендотеліальних клітин та підвищення функціональної активності тромбоцитів призводить до появи тромбіну та відкладення фібрину всередині та навколо пухлини. З одного боку, фібрин є основою розвитку венозних тромбозів, з іншої – пов'язаний з ростом пухлини та метастазування [1, 5].

Нами було визначено вміст фібрину в плазмі хворих на PCM та в плазмі чоловіків без історії онкологічних захворювань (табл. 1). У групі хворих на PCM стадії G1 вміст фібриногену достовірно не змінювався. Значне збільшення вмісту фібриногену (50,3 %) було помічене у хворих на PCM стадії G2, порівняно з контролем. В групі хворих на PCM стадії G3, вміст фібрину в плазмі крові збільшувався на 63,9 % порівняно з контрольними значеннями.

Таблиця 1. Вміст фібрину в плазмі крові пацієнтів з РСМ порівняно з групою чоловіків без онкологічних захворювань

Фібрин, мг/л	
Контроль	10.2±2.9
G1	10.13±0.78
G2	15.3±3.7
G3	16.7±2.28

Для контролю $M \pm m$, $n = 11$; для G1M $\pm m$, $n = 12$; для G2M $\pm m$, $n = 14$; для G3M $\pm m$, $n = 13$;

Вміст фібриногену збільшується у відповідь на запалення та пошкодження тканин [7, 29]. Фібриноген приймає безпосередню участь в адгезії і агрегації тромбоцитів з трансформованими клітинами, сприяючи формуванню тромбоцитарно-пухлинних агрегатів, під-

силюючи прогрес онкологічних захворювань у разі гематогенного поширення таких агрегатів [7, 12, 22, 29]. Підвищення рівня фібриногену, який вважають належним до білків гострої фази, є специфічною ознакою пошкодження судинних стінок. Збільшення рівня фібриногену в плазмі крові вказує на активацію гемостатичних процесів [12, 16, 22].

Таблиця 2. Вміст фібриногену в плазмі крові пацієнтів у яких діагностовано РСМ різних стадій порівняно з групою чоловіків без онкологічних захворювань

Фібриноген, г/л	
Контроль	2,29 ± 0,35
G1	2,52 ± 0,16
G2	3,35 ± 0,97
G3	4,8 ± 1,36

Для контролю $M \pm m$, $n = 11$; для G1M $\pm m$, $n = 12$; для G2M $\pm m$, $n = 14$; для G3M $\pm m$, $n = 13$;

Як видно з табл. 2, концентрація фібриногену зростала залежно від стадії захворювання. У пацієнтів з РСМ стадії G1 спостерігали зростання вмісту фібриногену на 10 %, у пацієнтів зі стадією G2 рівень фібрино-

гену підвищувався на 46 %, у пацієнтів з G3 стадією помічене підвищення рівня фібриногену на 102,4 % порівняно з контролем. Спостерігалася тенденція значного зростання рівня фібриногену залежно від стадії РСМ відповідно до гістопатологічної класифікації.

Таблиця 3. Значення протромбінового індексу, % у плазмі крові пацієнтів з діагностованим РСМ різних стадій порівняно з групою чоловіків без онкологічних захворювань

Протромбіновий індекс, %	
Контроль	92.2±3.1
G1	89±1.7
G2	91.6±4.59
G3	88.92±6.3

Для контролю $M \pm m$, $n = 11$; для G1M $\pm m$, $n = 12$; для G2M $\pm m$, $n = 14$; для G3M $\pm m$, $n = 13$;

Таблиця 4. Активований частковий тромбопластиновий час в плазмі крові у пацієнтів з РСМ різних стадій порівняно з групою чоловіків без онкологічних захворювань

АЧТЧ, сек	
Контроль	27,1 ± 3,0
G1	31,24 ± 2,9
G2	30,11 ± 4,65
G3	29,86 ± 2,34

Для контролю $M \pm m$, $n = 11$; для G1M $\pm m$, $n = 12$; для G2M $\pm m$, $n = 14$; для G3M $\pm m$, $n = 13$;

Ми визначали показники протромбінового індексу, % та АЧТЧ та АЧР в плазмі крові чоловіків хворих на РСМ на різних стадіях. У нашому дослідженні достовірно

значущих відхилень у показниках протромбінового індексу та АЧТЧ від контролю та між різними стадіями РСМ не відбувалося (табл. 3, табл. 4). Нами було помічене недостовірне скорочення АЧР в плазмі крові пацієнтів хворих на РСМ стадії G1 та G2 (табл. 5).

Таблиця 5. Активований час рекальцифікації плазми крові у пацієнтів з РСМ різних стадій порівняно з групою чоловіків без онкологічних захворювань

АЧР, сек	
Контроль	62,68 ± 4,21
G1	59,25 ± 2,77
G2	56,67 ± 5,65
G3	62,53 ± 9,29

Для контролю $M \pm m$, $n = 11$; для G1M $\pm m$, $n = 12$; для G2M $\pm m$, $n = 14$; для G3M $\pm m$, $n = 13$;

PAI-1 є мультифункціональним протеїном з різними пухлинно-сприятливими характеристиками [3, 4, 14]. Механічно, PAI-1 забезпечує клітинну міграцію, стиму-

лює ангиогенез та модулює клітинну адгезію [2, 32, 20]. PAI-1 проявляє прямий вплив на онкологічні патології. Вплив PAI-1 на розвиток онкологічних захворювань, можливо, більший, ніж його інгібуючий ефект на фібринолітичну систему [14, 15, 31].

Таблиця 6. Вміст PAI-1 у плазмі крові пацієнтів з РСМ різних стадій порівняно з групою чоловіків без онкологічних захворювань

PAI-1 (ум.од/мл)	
Контроль	0,81 ± 0,035
G1	1,04 ± 0,044*
G2	1,13 ± 0,049*
G3	1,08 ± 0,051*

Для контролю $M \pm m$, $n = 11$; для G1 $M \pm m$, $n = 12$; для G2 $M \pm m$, $n = 14$; для G3 $M \pm m$, $n = 13$; де * – $p < 0,05$;

У наших дослідженнях ми помітили збільшення вмісту PAI-1 у плазмі крові хворих на РСМ на 28,2 % на стадії G1, на 39,1 % на стадії G2, та на 33,6 % на стадії G3.

У ході дослідження було виявлено значне порушення балансу окремих компонентів системи гемостазу в крові пацієнтів. Рівень PAI-1 у пацієнтів, з РСМ достовірно підвищувався на всіх досліджуваних стадіях розвитку онкологічного процесу. Помічено значне зростання вмісту фібрину, фібриногену та PAI-1 залежно від стадії РСМ. Подальші дослідження системи гемостазу можуть суттєво розширити кількість лабораторно-діagnostичних маркерів розвитку патологічного процесу під час РСМ.

Список використаних джерел:

1. Venous thromboembolism and cancer: two-way clinical association / G. Agnelli et al. // *Thromb. Haemost.* – 1997. – Vol. 78, № 1. – P. 117–120.
2. Absence of host plasminogen activator inhibitor 1 prevents cancer invasion and vascularization / K. Bajou, A. Noel, R. D. Gerard et al. // *Nat Med.* – 1998 – Vol. 4. – P. 923–928.
3. Urine based markers of angiogenesis in bladder cancer / M. Becker, D. Tilki, T. Szarvas et al. // *Urologie A.* – 2009 – Vol. 48. – P. 609–614.
4. Plasmin/plasminogen system in colorectal cancer / D. H. Berger et al. // *World J Surg.* – 2002. – Vol. 26. – P. 767–771.
5. Cicco M. The prothrombotic state in cancer: pathogenic mechanisms / M. Cicco // *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* – 2004. – Vol. 50, № 3. – P. 187–196.
6. Urokinase plasminogen activator: a prognostic marker in multiple types of cancer / M. J. Duffy, T. M. Maguire, E. W. McDermott, N. O'Higgins // *J Surg Oncol.* – 1999. – Vol. 71. – P. 130–135.
7. Prognostic significance of preoperative plasma fibrinogen in endometrial cancer / L. M. Ghezzi et al. // *Gynecol. Oncol.* – 2010. – Vol. 119. – № 2. – P. 309–313.
8. Metastasis markers in bladder cancer: a review of the literature and clinical considerations / P. Gontero, S. Banisadr, B. Freja, M. Brausi // *Eur Urol.* – 2004. – Vol. 46. – P. 296–311.
9. Urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor PAI-1: novel tumor-derived factors with a high prognostic and predictive impact in breast cancer / N. Harbeck, R. E. Kates, K. Gauger et al. // *Thromb Haemost.* – 2004. – Vol. 91. – P. 450–456.
10. Trousseau's syndrome: cancer-associated thrombosis / S. Ikushima, R. Ono, K. Fukuda et al. // *Jpn. J. Clin. Oncol.* – 2016. – Vol. 46, P. 204–208.
11. Plasma levels of MMPs and TIMP-1 in urinary bladder cancer patients / T. Ishchuk, D. Glavachek, O. Savchuk et al. // *Biomedical Research and Therapy.* – 2018. – Vol. 5. – P. 1931–1940. 10.15419/bmrat.v5i1.407.
12. Plasma fibrinogen and serum C-reactive protein are associated with non-small cell lung cancer / J. M. Jones et al. // *Lung Cancer.* – 2006. – Vol. 53. – P. 97–101.
13. Kakkar A. Thrombosis and cancer: implications beyond Trousseau / A. K. Kakkar, M. N. Levine // *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* – 2004. – Vol. 2. – Issue 8. – P. 1261–1262.
14. Plasminogen activator inhibitor 1 may promote tumour growth through inhibition of apoptosis / H. C. Kwaan, J. Wang, K. Svoboda, P. J. Declerck // *Br J Cancer.* – 2000. – Vol. 82. – P. 1702–1708.
15. Lademann U. Regulation of programmed cell death by plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) / U. A. Lademann, M. U. Romer // *Thromb Haemost.* – 2008. – Vol. 100. – P. 1041–1046.
16. Preoperative plasma fibrinogen levels in gastric cancer patients correlate with extent of tumour / J. H. Lee et al. // *Hepatogastroenterology.* – 2004. – Vol. 51. – P. 1860–1863.
17. Lima L. Activation of blood coagulation in cancer: implications for tumor progression / L. G. Lima, R. Q. Monteiro // *Biosci Rep.* – 2013. – Vol. 33. – P. 701–710.
18. Loreto M. Coagulation and cancer: implications for diagnosis and management / M. F. Loreto, D. E. Martinis, M. P. Corsi // *Pathol. Oncol. Res.* – 2000. – Vol. 6, № 4. – P. 302–312.
19. Mackman R. Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis / R. Mackman, Tilley & N. Key // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2007. – Vol. 27. – P. 1687–1693.
20. Plasminogen activator inhibitor-1 and -3 increase cell adhesion and motility of MDA-MB-435 B breast cancer cells / D. Palmieri, J. W. Lee, R. L. Juliano, F. C. Church // *J Biol Chem.* – 2002. – Vol. 277. – P. 40950–40957.
21. Palta S. Overview of the coagulation system / S. Palta, R. Saroa // *Indian J. Anaesth.* – 2014. – Vol. 58. – P. 515–523.
22. Fibrinogen is an important determinant of the metastatic potential of circulating tumor cells / J. S. Palumbo et al. // *Blood.* – 2000. – Vol. 96. – P. 3302–3309.
23. Prandoni P. Cancer and venous thromboembolism: an overview / P. Prandoni, A. Piccoli, A. Girolami // *Hematologica.* – 1999. – Vol. 84. – P. 437–445.
24. Cytokine profile indicators in rat blood serum in a model of esophagus burn induced by antioxidant chemical preparation / Ya. Raetska, N. Chornenka, T. Koval et al. // *Biomedical Research and Therapy.* – 2017. – Vol. 4. 1591. 10.15419/bmrat.v4i9.367.
25. Repetto O. Coagulation and fibrinolysis in gastric cancer / O. Repetto, V. De Re // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2017. – Vol. 1404. – P. 27–48.
26. Rice K. Venous thromboembolism in urologic surgery: prophylaxis, diagnosis, and treatment / K. R. Rice, S. A. Brassell, D. G. McLeod // *Reviews in urology.* – 2010. – Vol. 12. – P. 111–24.
27. Plasminogen activators and plasminogen activator inhibitors: biochemical aspects / D. C. Rijken et al. // *Baillieres Clin Haematol.* – 1995. – Vol. 8. – P. 291–312.
28. Clinical impact of the plasminogen activation system in tumor invasion and metastasis: prognostic relevance and target for therapy / M. Schmitt, N. Harbeck, C. Thomssen et al. // *Thromb Haemost.* – 1997. – Vol. 78. – P. 285–296.
29. The prognostic value of plasma fibrinogen levels in patients with endometrial cancer: a multi-centre trial / V. Seebacher et al. // *British Journal of Cancer.* – 2010. – Vol. 102. – P. 952–956.
30. Association of plasma urokinase-type plasminogen activator and its receptor with clinical outcome in patients undergoing radical cystectomy for transitional cell carcinoma of the bladder / S. F. Shariat, M. A. Monoski, B. Andrews et al. // *Urology.* – 2003. – V. 61. – P. 1053–1058.
31. Components of the plasminogen activator system and their complexes in renal cell and bladder cancer: comparison between normal and matched cancerous tissues / P. N. Span, J. A. Witjes, N. Grebenchtchikov et al. // *BJU Int.* – 2008 – Vol. 102. – P. 177–182.
32. Stahl A. Melanoma cell migration on vitronectin: regulation by components of the plasminogen activation system / A. Stahl, B. M. Mueller // *Int J Cancer.* – 1997. – Vol. 71. – P. 116–122.
33. Association between blood rheology, thrombosis and cancer survival in patients with gynecologic malignancy / G. F. Von Tempelhoff et al. // *Clin. Hemorheol. Microcirc.* – 2000. – Vol. 22. – P. 107–130.

Reference:

1. Agnelli G. Venous thromboembolism and cancer: two-way clinical association. Agnelli G, et al. *Thromb. Haemost.* 1997;78, N 1:117–120.
2. Bajou K, Noel A, Gerard RD, et al. Absence of host plasminogen activator inhibitor 1 prevents cancer invasion and vascularization. *Nat Med.* 1998;4:923–928.
3. Becker M, Tilki D, Szarvas T, Rubben H, Ergun S. Urine based markers of angiogenesis in bladder cancer. *Urologie A.* 2009;48:609–614.
4. Berger DH. Plasmin/plasminogen system in colorectal cancer. *World J Surg.* 2002;26:767–771.
5. Cicco M. The prothrombotic state in cancer: pathogenic mechanisms. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2004; 50.3:187–196
6. Duffy MJ, Maguire TM, McDermott EW, O'Higgins N. Urokinase plasminogen activator: a prognostic marker in multiple types of cancer. *J Surg Oncol.* 1999;71:130–135.
7. Ghezzi LM, et al. Prognostic significance of preoperative plasma fibrinogen in endometrial cancer. *Gynecol. Oncol.* 2010;119: 309–313.
8. Gontero P, Banisadr S, Freja B, Brausi M. Metastasis markers in bladder cancer: a review of the literature and clinical considerations. *Eur Urol.* 2004;46:296–311.
9. Harbeck N, Kates RE, Gauger K, et al. Urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor PAI-1: novel tumor-derived factors with a high prognostic and predictive impact in breast cancer. *Thromb Haemost.* 2004;91:450–456.
10. Ikushima, S., R. Ono, K. Fukuda, et al. Trousseau's syndrome: cancer-associated thrombosis. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 2016; 46: 204–208.
11. Ishchuk T, Glavachek D, Savchuk O, Yakovlev P, Falaleeva T, Beregova T, Ostapchenko L. (2018). Plasma levels of MMPs and TIMP-1 in urinary bladder cancer patients. *Biomedical Research and Therapy.* 5. 1931–1940. 10.15419/bmrat.v5i1.407.
12. Jones JM, et al. Plasma fibrinogen and serum C-reactive protein are associated with non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2006; 53:97–101
13. Kakkar, A.K., Levine M.N. Thrombosis and cancer: implications beyond Trousseau. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 2004; 8: 1261–1262.
14. Kwaan HC, Wang J, Svoboda K, Declerck PJ. Plasminogen activator inhibitor 1 may promote tumour growth through inhibition of apoptosis. *Br J Cancer.* 2000;82:1702–1708.

15. Lademann UA, Romer MU. Regulation of programmed cell death by plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1). *Thromb Haemost.* 2008;100:1041-1046.
16. Lee JH, et al. Preoperative plasma fibrinogen levels in gastric cancer patients correlate with extent of tumour. *Hepatogastroenterology.* 2004; 51: 1860-1863.
17. Lima, L.G. & R.Q. Monteiro. 2013. Activation of blood coagulation in cancer: implications for tumour progression. *Biosci. Rep.* 33. <https://doi.org/10.1042/BSR20130057>
18. Loreto M. F., Martinis D. E., Corsi M. P. Coagulation and cancer: implications for diagnosis and management. *Pathol. Oncol. Res.* 2000; 6:302-312.
19. Mackman, N., R.E. Tilley & N.S. Key. 2007. Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27: 1687-1693.
20. Palmieri D, Lee JW, Juliano RL, Church FC. Plasminogen activator inhibitor-1 and -3 increase cell adhesion and motility of MDA-MB-435 B breast cancer cells. *J Biol Chem.* 2002;277:40950-40957
21. Palta, S., R. Saroa & A. Palta. 2014. Overview of the coagulation system. *Indian J. Anaesth.* 58: 515-523.
22. Palumbo JS, et al. Fibrinogen is an important determinant of the metastatic potential of circulating tumor cells. *Blood.* 2000; 96:3302-3309
23. Prandoni P., Piccoli A., Girolami A. Cancer and venous thromboembolism: an overview. *Hematologica.* 1999; 84: 437-445.
24. RaetskaYa & M. Chornenka, N & V. Koval, T & M Savchuk, O & Beregova, T & I. Ostapchenko, L. (2017). Cytokine profile indicators in rat blood serum in a model of esophagus burn induced by antioxidant chemical preparation. *Biomedical Research and Therapy.* 4. 1591. 10.15419/bmrat.v4i9.367.
25. Repetto, Ombretta & De Re, Valli. (2017). Coagulation and fibrinolysis in gastric cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 1404. 10.1111/nyas.13454.
26. Rice K.R., Brassell S.A., McLeod D.G. Venous thromboembolism in urologic surgery: prophylaxis, diagnosis, and treatment // *Reviews in urology.* – 2010. – V.12. – P.111-24.
27. Rijken DC. Plasminogen activators and plasminogen activator inhibitors: biochemical aspects. *Baillieres Clin Haematol.* 1995;8:291-312.
28. Schmitt M, Harbeck N, Thomssen C, et al. Clinical impact of the plasminogen activation system in tumor invasion and metastasis: prognostic relevance and target for therapy. *Thromb Haemost.* 1997;78:285-296.
29. Seebacher V, et al. The prognostic value of plasma fibrinogen levels in patients with endometrial cancer: a multi-centre trial. *British Journal of Cancer.* 2010; 102: 952-956.
30. Shariat SF, Monoski MA, Andrews B, et al: Association of plasma urokinase-type plasminogen activator and its receptor with clinical outcome in patients undergoing radical cystectomy for transitional cell carcinoma of the bladder. *Urology.* 2003; 61: 1053-1058.
31. Span PN, Witjes JA, Grebenchtchikov N, et al. Components of the plasminogen activator system and their complexes in renal cell and bladder cancer: comparison between normal and matched cancerous tissues. *BJU Int.* 2008;102:177-182.
32. Stahl A, Mueller BM. Melanoma cell migration on vitronectin: regulation by components of the plasminogen activation system. *Int J Cancer.* 1997;71:116-122.
33. Von Tempelhoff GF, et al. Association between blood rheology, thrombosis and cancer survival in patients with gynecologic malignancy. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 2000;22:107-130.

Надійшла до редколегії 10.09.2018
Отримано виправлений варіант 15.10.2018
Підписано до друку 15.10.2018

Received in the editorial 10.09.2018
Received a revised version on 15.10.2018
Signed in the press on 15.10.2018

А. Василяки, студ., В. Дмитрик, асп., Т. Луговская, канд. биол. наук
УНЦ "Інститут біології і медицини"
Київського національного університету ім. Тараса Шевченка, Київ, Україна,
П. Яковлев, канд. мед. наук
Національний медичний університет імені А. А. Богомольця, Київ, Україна

ПОКАЗАТЕЛИ ГЕМОСТАТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ СТАДИЯХ РАКА МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ

Рак мочевого пузыря обладает высоким показателем смертности и является 9-м по частоте онкологическим заболеванием в мире. При большом арсенале диагностических методов, к которым относятся цитоскопия, ультразвуковое исследование, компьютерная и магнитно-резонансная томография, цитология мочи, трудно установить степень развития опухоли. Актуальным является поиск молекулярно-биохимических прогностических показателей, которые обладали бы высокой специфичностью и чувствительностью к развитию рака мочевого пузыря. Лабораторные методы могут внести весомый вклад в оценку агрессивности рака мочевого пузыря. Согласно современным научным данным у больных онкологическими заболеваниями наблюдается дисбаланс в коагуляционной системе, проявлением которого является активация системы сворачивания крови. Активация системы гемостаза сопровождается появлением в кровотоке специфических маркеров, которые отображают степень повышения гемостатического потенциала крови, таких, как уровень фибрина, фибриногена, протромбинового индекса, активированного частичного тромбопластинового времени, активированного времени рекальцификации. Результаты исследования различных онкологических заболеваний свидетельствуют о повышенном уровне компонентов системы активации плазминогена, в том числе на ингибитор активатора плазминогена-1 (PAI-1). Данные литературы, которые указывали бы на прогностическую значимость изменений показателей системы сворачивания крови и протеолитической системы в крови при раке мочевого пузыря – немногочисленные и неполные. Отсутствуют данные, которые указывали бы на взаимосвязь этих показателей со степенью рака мочевого пузыря по гистопатологической градации, не сформирована концепция применения в клинической онкологии. В процессе исследования установлено значительное повышение уровня фибрина, фибриногена и PAI-1 в зависимости от степени рака мочевого пузыря. Исследуемые показатели могут внести существенный вклад в характеристику рака мочевого пузыря в зависимости от степени согласно гистопатологической классификации.

Ключевые слова: рак мочевого пузыря, система гемостаза, фибрин, фибриноген, PAI-1.

A. Vasylyak, stud., V. Dmytryk, PhD-stud., T. Luhovska, PhD
ESC "Institute of Biology and Medicine", Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine,
P. Yakovlev, PhD
O. Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine

INDICATORS OF HEMOSTATIC POTENTIAL IN VARIOUS STAGES OF BLADDER CANCER

Bladder cancer is characterized by a high mortality rate and is the 9th most common cancerous disease in the world. With a wide array of diagnostic bases, which include cystoscopy, ultrasound, computer and magnetic resonance imaging, cytology of urine deposition, it is difficult to accurately determine the extent of development of the tumor. It is important to find molecular and biochemical predictive parameters that would be characterized by high specificity and sensitivity to the tumor development. According to modern scientific data, an imbalance in the coagulation system is observed in cancer patients, the manifestation of which is the activation of the blood clotting system. Activation of the hemostatic system is accompanied by the appearance in the bloodstream of specific markers that reflect increase the hemostatic potential of the blood, such as the level of fibrin, fibrinogen, prothrombin time, activated partial thromboplastin time, activated plasma recalcification time. The results of a study of various cancers indicate an increased level of components of the plasminogen activation system, including the inhibitor of plasminogen activator-1 (PAI-1). The literature data that would indicate the prognostic significance of changes in the parameters of the blood clotting system and the proteolytic system in the blood in bladder cancer are few and have not completed. There are no data indicating the link between the studied parameters with histopathological gradation. In a detailed review of markers, it is possible to identify the optimal combination of markers of pathological processes, including the pathogenesis of oncological processes at various stages. During the study, we have investigated a significant increase in the level of fibrin, fibrinogen, and PAI-1, depending on the degree of bladder cancer. The test scores can make a significant contribution to the characterization of bladder cancer, depending on the grade according to the histopathological classification.

Key words: bladder cancer, hemostasis, fibrin, fibrinogen, PAI-1.

УДК: 616.37:612.273+612.018

Р. Янко, канд. біол. наук
Інститут фізіології імені О. О. Богомольця НАН України, Київ, Україна

МОРФОЛОГІЧНІ ЗМІНИ ПІДШЛУНКОВОЇ ЗАЛОЗИ ЩУРІВ ПІСЛЯ СУМІСНОГО ВПЛИВУ ДОЗОВАНОЇ НОРМОБАРИЧНОЇ ГІПОКСІЇ І МЕЛАТОНІНУ

Досліджено морфологічні зміни підшлункової залози (ПЗ) щурів після сумісного впливу дозованої нормобаричної гіпоксії (ДНГ) і мелатоніну. Дослідження здійснено у весняний період на 24 щурах-самцях лінії Вістар. Дослідним тваринам щодня подавали гіпоксичну газову суміш (12 % кисню в азоті) у переривчастому режимі: 15 хвилин деоксигенація / 15 хвилин реоксигенація протягом 2 годин. Цим же щурам щодня перорально вводили екзогенний мелатонін о 10.00 у дозі 5 мг/кг. Тривалість експерименту становила 28 діб. Із тканини ПЗ виготовляли гістологічні препарати за стандартною методикою. Морфометрію здійснювали за допомогою комп'ютерної програми "Image J". Уперше виявлено, що 28-добовий поєднаний вплив ДНГ і мелатоніну приводить до збільшення розмірів ацинусів, екзокриноцитів, висоти епітелію, гіперплазії ядерців в ПЗ. Зміна цих показників може вказувати на зростання екзокринної функції залози. Вплив переривчастої гіпоксії та мелатоніну також підвищує (незначною мірою) активність ендокринної частини ПЗ. Про це свідчать більші розміри островців Лангерганса та кількість розміщених у них ендокриноцитів, ніж у контролі. У дослідних тварин також помічено зниження товщини прошарків міжчасточкової і міжацинусної сполучної тканини, що можна вважати проявом механізму структурної адаптації, який забезпечує полегшення транспорту кисню і поживних речовин до паренхіматозних елементів залози. Сумісний вплив ДНГ і мелатоніну має морфологічні ознаки зростання активності як екзокринної, так і ендокринної (меншою мірою) частини ПЗ.

Ключові слова: підшлункова залоза, переривчаста гіпоксія, мелатонін.

Вступ. Підшлункова залоза (ПЗ) – є єдиною залозою в організмі якій притаманна екзокринна і ендокринна функція. Перша полягає у виробленні панкреатичного соку, який містить основні травні ферменти. Ендокринна функція, або продукція гормонів, в свою чергу, дозволяє залозі брати участь в регуляції вуглеводного, білкового та жирового обміну. ПЗ є інтегрованим, добре налагодженим органом, всі компоненти якого тісно взаємопов'язані і, імовірно, взаємозамінні [1]. Проте сучасний стиль життя, для якого найчастіше характерні неправильне харчування, зміна частоти і часу прийому їжі, зловживання алкоголем, цукром призводить до того, що функціонування ПЗ може порушуватися. А це, в свою чергу, може призвести до дисбалансу в усьому організмі [2]. Тому пошук методів, які за необхідності могли б підвищувати функціонування залози, є досить актуальним. Одними з них можуть бути сеанси дозованої нормобаричної гіпокситерапії та гормональний препарат мелатонін.

Дозована нормобарична гіпоксія (ДНГ) широко використовується в клінічній практиці для лікування і профілактики ряду захворювань серцево-судинної, дихальної, ендокринної, травної та імунної систем, а також для підвищення неспецифічної резистентності організму [3, 4]. Мелатонін є регулятором метаболічних, імунних і регенераторних процесів, бере участь в механізмах терморегуляції і старінні [5]. Мелатонін також відіграє універсальну захисну роль у різних захворюваннях ПЗ, обмежуючи прояви гострого панкреатиту і цукрового діабету [6].

Роботи, які були б присвячені дослідженню впливу гіпоксичних газових сумішей чи мелатоніну на стан ПЗ, нечисленні і неоднозначні [7–11]. Це може бути пов'язано з використанням в експериментах різних видів тварин, із застосуванням різних дозувань та схем введення мелатоніну, режимів подачі гіпоксичної газової суміші, різною тривалістю та сезонністю проведення дослідів тощо. А наукові праці, в яких би досліджувався сумісний вплив ДНГ і мелатоніну на морфофункціональний стан ПЗ, взагалі відсутні.

Мета роботи – дослідити морфологічні зміни ПЗ молодих щурів після сумісного впливу ДНГ і мелатоніну.

Матеріали та методи. Дослідження проведено в весняний період на 24 щурах-самцях лінії Вістар, віком 3 місяці. Щури перебували в уніфікованих умовах на стандартному раціоні харчування. Тварини були розділені на 2 групи: I – контроль, II – дослідні щури, які зазнавали поєданого впливу мелатоніну і ДНГ. Для проведення щоденних сеансів ДНГ щурів розміщували в

герметичній камері, в яку подавали гіпоксичну газову суміш (12 % кисню в азоті) в переривчастому режимі (15 хвилин деоксигенація / 15 хвилин реоксигенація протягом 2 годин) за допомогою мембранного газорозподільного елемента. Інший час доби (22 години) щури дихали атмосферним повітрям. Піддослідним тваринам також щодня перорально вводили екзогенний мелатонін ("Unipharm Inc., США") о 10.00 в дозі 5 мг/кг. Загальна тривалість експерименту становила 28 діб. Щурів декапітували під легким ефірним наркозом відповідно до вимог міжнародних принципів Європейської конвенції.

Для морфологічних і морфометричних досліджень з центральних ділянок ПЗ брали зразки тканини, з яких виготовляли гістологічні препарати за стандартною методикою: фіксували в рідині Буена, зневоднювали в спиртах зростаючої концентрації і діоксани, заливали в парафін. Зрізи фарбували гематоксиліном Бемера і еозинном, а для виявлення елементів сполучної тканини (СТ) – методом Ван-Гізона і Массона [12]. У разі використання цифрової камери мікропрепарати фотографували на мікроскопі "Nicon" (Японія). На цифрових зображеннях препаратів здійснювали морфометрію за допомогою комп'ютерної програми "Image J".

На гістологічних зрізах тканини ПЗ робили морфометричний аналіз екзо- і ендокринної частини органу. У екзокринній частині залози вимірювали середній діаметр і площу поперечного перерізу ацинусів, висоту і площу екзокриноцитів, їх ядер і цитоплазми, підраховували кількість ядерців в ядрах екзокриноцитів і середню кількість клітин в ацинусі. В ендокринній частині залози підраховували середню кількість панкреатичних островців на одиницю площі (500 мкм²), кількість ендокриноцитів у них, вимірювали площу і діаметр поперечного перерізу островців, а також визначали щільність розташування клітин. Для визначення стану сполучнотканинних елементів в залозі вимірювали товщину прошарків міжчасточної і міжацинусної СТ.

Отримані дані обробляли методами варіаційної статистики за допомогою програмного забезпечення Statistica 6.0 for Windows і програми Microsoft Excel 2010. Достовірність відмінностей між контрольною і піддослідною групами, після попередньої перевірки на нормальність розподілу, оцінювали за *t*-критерієм Стьюдента. Відмінності вважали достовірними за значення *p* < 0,05.

Результати та обговорення. ПЗ щурів, після сумісного впливу ДНГ і мелатоніну, зберігає свою фізіологічну структуру. Екзокринна частина становить основну масу залози і представлена ацинусами і протоками.

Форма ацинусів як у контрольних, так і в дослідних щурів різноманітна: округла, овальна та видовжена. Ацинуси вистелені з середини екзокриноцитами різної форми. Ядро розміщується біля основи клітини та містить

ядерця. Ацинуси об'єднуються в часточки, зовні покриті сполучнотканинною оболонкою, яка представлена пухким переплетінням тонких пучків еластичних і колагенових волокон (рис. 1).

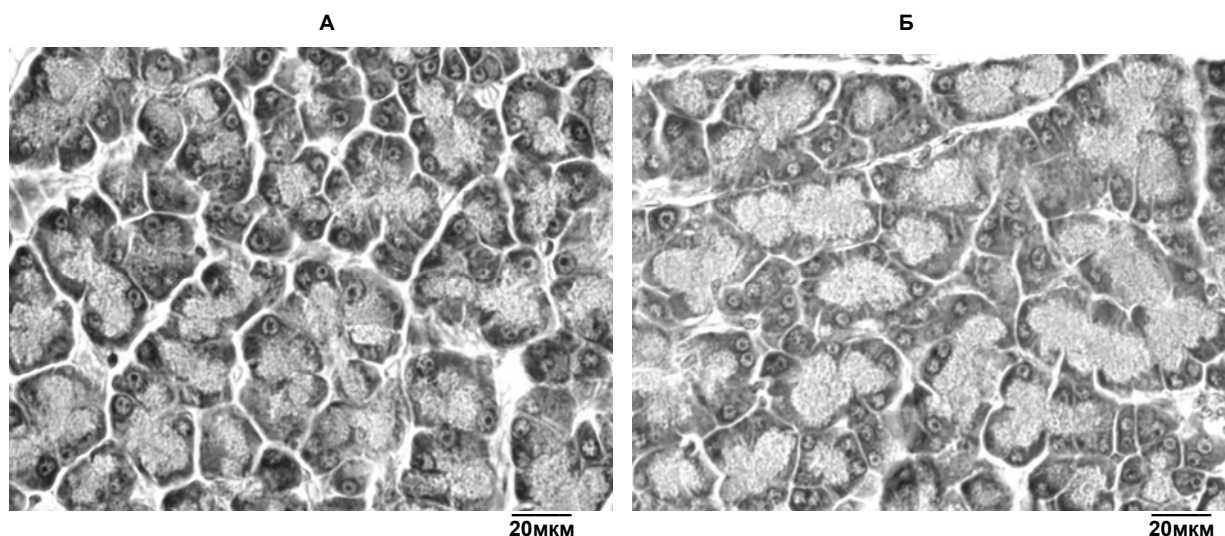


Рис. 1. Мікрофотографія екзокринної частини підшлункової залози щура контрольної (А) та дослідної (Б) групи. Забарвлення за методом Ван-Гізона. Збільшення 800

Поєднаний вплив ДНГ і мелатоніну призвів до зростання розмірів як самих ацинусів ПЗ, так і розміщених в них екзокриноцитів. Середній діаметр і площа ацинусів, а також висота їх епітелію у дослідних щурів були більшими, ніж у контрольних тварин на 6 %, 10 % і 11 % ($p < 0,05$) відповідно. Гіпертрофія ацинусів може свідчити про зростання функціональної активності екзокринної частини ПЗ, посилення синтезу ферментів. Загальна кількість екзокриноцитів в ацинусах мала чітко виражену тенденцію до збільшення. Площа екзокриноцитів, їхніх ядер і цитоплазми в дослідних тварин була більшою порівняно з контролем на 20 % ($p < 0,05$), 6 % і 24 % ($p < 0,05$) відповідно. Зростання розмірів екзокриноцитів, у свою чергу, може вказувати на підготовку їх до мітозу і пов'язану з ним інтенсифікацію синтезу нуклеїнових кислот, білків тощо [13]. Ядерно-цитоплазматичне співвідношення, навпаки, було меншим від контрольного показника на 17 %, що може вказувати на зростання функціонального навантаження на цитоплазму клітини. Ядерця в ядрах клітин добре візуалізувалися та мали чіткі межі. Кількість ядерців в ядрах екзокриноцитів і показник ядерцево-ядерного співвід-

ношення також були вірогідно більше, ніж у контролі, на 15 % і 11 % відповідно (табл. 1). Гіперплазія ядерців є однією з ознак активації фізіологічної регенерації клітин на внутрішньоклітинному рівні. Оскільки до основних функцій ядерців відносять синтез рРНК вважають, що зростання їх кількості може вказувати на підвищення білоксинтетичної активності клітин [14]. Таким чином, характер змін гістоморфометричних показників дозволяє припустити, що поєднаний вплив ДНГ і мелатоніну посилює екзокринну функцію ПЗ.

До складу сполучнотканинних утворень ПЗ входить капсула і строма органа. В останній розділяють ацинозну, острівцеву і міжацинозну СТ, а також СТ, яка оточує кровоносні судини і вивідні протоки; сполучнотканинні оболонки часток і часточок [15]. Після поєднаного впливу ДНГ і мелатоніну нами виявлено достовірне зменшення товщини прошарків міжчасточкової і міжацинозної СТ на 36 % і 34 % відповідно порівняно з контролем (табл. 1). Це може свідчити про відносне зменшення площі строми і кількості сполучнотканинних елементів в ПЗ дослідних щурів.

Таблиця 1. Морфометричні показники екзокринної частини підшлункової залози ($n = 12$, $M \pm m$)

Показники	Контроль	Дозована нормобарична гіпоксія + Мелатонін
Діаметр ацинуса, мкм	$29,5 \pm 1,17$	$31,3 \pm 0,87$
Площа ацинуса, мкм ²	$834 \pm 31,4$	$921 \pm 33,1$
Висота епітелію ацинуса, мкм	$11,1 \pm 0,26$	$12,3 \pm 0,32^*$
Площа, мкм ² :		
екзокриноцита	$93,2 \pm 2,48$	$122,2 \pm 2,76^*$
ядра	$17,8 \pm 0,42$	$18,8 \pm 0,53$
цитоплазми	$75,4 \pm 2,4$	$93,4 \pm 2,48^*$
Ядерно-цитоплазматическое співвідношення	$0,24 \pm 0,008$	$0,2 \pm 0,005^*$
Кількість екзокриноцитів в ацинусі, од.	$7,0 \pm 0,16$	$7,4 \pm 0,28$
Кількість ядерців в ядрі екзокриноцита, од.	$1,36 \pm 0,04$	$1,57 \pm 0,04^*$
Ядерцево-ядерне співвідношення	$0,076 \pm 0,002$	$0,084 \pm 0,003^*$
Ширина сполучної тканини, мкм:		
міжчасточкова	$2,42 \pm 0,09$	$1,56 \pm 0,07^*$
міжацинозна	$0,93 \pm 0,03$	$0,61 \pm 0,02^*$

Примітка (тут і в табл. 2). * $p < 0,05$ – достовірність відмінностей порівняно з контролем

Ендокринна частина займає значно меншу площу тканини ПЗ. Вона утворена острівцями Лангерганса, які дисперсно розміщені в залозі. Острівці відмежовані від ацинусів тонким сполучнотканним прошарком та являють собою пронизані густою сіткою капілярів клітинні скупчення (ендокриноцити) округлої форми. Форма острівців переважно округла та овальна.

В ендокринній частині залози щурів, після поєднаного впливу ДНГ і мелатоніну, спостерігали менш інтенсивні зміни. У дослідних тварин виявили більші розміри

острівців Лангерганса, а саме – площі на 18 % ($p < 0,05$) та діаметру на 10 %, ніж у контролі. Також у цих щурів була більша кількість ендокриноцитів в острівцях на 10 %. Проте середня кількість острівців (на одиницю площі в 500 мкм²) мала тенденцію до зниження на 8 % порівняно з контролем (табл. 2). Таким чином, за більшістю отриманих морфометричних показників можна припустити, що сумісний вплив ДНГ і мелатоніну стимулює активність ендокринної частини ПЗ.

Таблиця 2. Морфометричні показники ендокринної частини підшлункової залози ($n = 12$, $M \pm m$)

Острівці Лангерганса	Контроль	Дозована нормобарична гіпоксія + Мелатонін
Кількість (на 500 мкм ²), од.	1,36 $\pm$ 0,15	1,25 $\pm$ 0,16
Площа, мкм ²	9940 $\pm$ 185	11706 $\pm$ 220*
Діаметр, мкм	103,2 $\pm$ 8,2	113,2 $\pm$ 11,6
Кількість ендокриноцитів, од.	105,9 $\pm$ 9,1	115,7 $\pm$ 11,7
Щільність розміщення ендокриноцитів, од.	0,011 $\pm$ 0,004	0,01 $\pm$ 0,006

Раніше нами було здійснено морфологічні дослідження ПЗ щурів лінії Вістар такого самого віку, після роздільного впливу ДНГ і мелатоніну у весняний період року. Було виявлено, що 28-добовий вплив мелатоніну призвів до зростання активності екзокринної частини ПЗ. Про це свідчили вірогідно більші розміри ацинусів, ендокриноцитів, кількості клітин в ацинусах та ядерець в ядрах ендокриноцитів порівняно з контрольними показниками. Вплив ДНГ також призводив до зростання (але значно меншою мірою) активності екзокринної частини залози. Активність ендокринної частини ПЗ після введення мелатоніну мала ознаки зростання: збільшувалися розміри острівців Лангерганса та кількість розміщених у них ендокриноцитів. Тоді як вплив ДНГ, навпаки, дещо знижував активність ендокринної частини. Товщина прошарків СТ зменшувалася незалежно від характеру діючого фактора [15, 16].

Дані літератури щодо впливу ДНГ чи мелатоніну на морфофункціональний стан ПЗ нечисленні. Більшість робіт присвячено дослідженню впливу гіпоксичних газових сумішей на ендокринну частину залози. Показано, що адаптація до переривчастої гіпоксії позитивно впливає на вуглеводний обмін у щурів, що проявляється в зниженні рівня глюкози, збільшення рівня інсуліну в крові, зростання площі панкреатичних острівців і кількості в них β -клітин, пригніченні руйнування острівців і утворенні нових β -клітин в ацинозній тканині [7, 11].

Літературні дані щодо впливу мелатоніну на стан ПЗ досить неоднозначні. Одні автори виявили, що мелатонін активує проліферацію β -клітин, сприяє утворенню нових острівців у залозі і підвищує рівень інсуліну в крові [8]. Інші дослідники, навпаки, розглядають мелатонін як інгібітор синтезу і вивільнення інсуліну [18].

Висновки

1. На підставі оцінки характеру змін більшості морфометричних показників (зростання розмірів ацинусів, ендокриноцитів, висоти епітелію, гіперплазії ядерець) можна припустити, що сумісний вплив ДНГ і мелатоніну підвищує активність екзокринної функції ПЗ. Вплив цих факторів на ендокринну частину залози також призводить до зростання її активності, але значно меншою мірою.

2. Зниження товщини прошарків міжчасточкової і міжацинозної СТ, після поєднаного впливу ДНГ і мелатоніну можна розглядати як прояв механізму структурної адаптації, що забезпечує полегшення транспорту кисню до паренхіматозних елементів залози і поліпшення умов для протікання процесів метаболізму і проникнення гормонів через гісто-гематичний бар'єр в кров.

3. Отримані результати дослідження можуть мати не тільки теоретичне значення, але й становити певний практичний інтерес під час застосування курсу дозованої нормобаричної гіпокситерапії і препарату мелатоніну в людей зі зниженою функцією підшлункової залози.

Список використаних джерел:

1. Баранов С. А. Поджелудочная железа как единый функционально взаимосвязанный орган / С. А. Баранов, В. М. Нечаев // Медицинский совет. – 2017. – № 11. – С. 148–151.
2. Cruickshank A. H. Pathology of the pancreas / A. H. Cruickshank, E. W. Benbow. – Berlin ; Heidelberg ; NewYork ; Tokyo : Springer-Verlag, 1995. – 341 p.
3. Березовский В. А. Природная и инструментальная оротерапия / В. А. Березовский. – Донецк : "Заславский А. Ю.", 2012. – 306 с.
4. Powell F. L. Physiological effects of intermittent hypoxia / F. L. Powell, N. Garcia // High. It. Med. Biol. – 2002. – № 1. – P. 125–136.
5. Pevet P. Melatonin and biological rhythms / P. Pevet // Therapie. – 1998. – Vol. 30, № 1. – P. 109–124.
6. The role of melatonin in pancreatic protection: could melatonin be used in the treatment of acute pancreatitis? / J. Jaworek, A. Leja-Szpak, M. Kot et al. // Curr Pharm Des. – 2014. – Vol. 20, № 30. – P. 4834–40.
7. Особливості експресії білків BCL-2, P53 та проліферативної активності в панкреатичних острівцях під впливом переривчастої гіпоксії за умов експерименту / Ю. М. Колесник, А. В. Абрамов, Т. В. Іваненко та ін. // Вісн. морфології. – 2014. – Т. 20, № 2. – С. 366–369.
8. Кушнір Ю. Вплив мелатоніну на стан острівців Лангерганса підшлункової залози в алоксадіабетичних щурів / Ю. Кушнір, І. Давиденко // Світ медицини та біології. – 2009. – № 4. – С. 31–35.
9. Oxygen: a master regulator of pancreatic development? / C. A. Fraker, C. Ricordi, L. Inverardi et al. // Biol Cell. – 2009. – Vol. 101, № 8. – P. 431–440. doi: 10.1042/BC20080178.
10. Effects of different periods of hypoxic training on glucose metabolism and insulin sensitivity / T. Morishima, Y. Hasegawa, H. Sasaki et al. // Clin Physiol Funct Imaging. – 2015. – Vol. 35, № 2. – P. 104–109. doi: 10.1111/cpf.12133.
11. Pancreatic β cell proliferation by intermittent hypoxia via up-regulation of Reg family genes and HGF gene / H. Ota, A. Itaya-Hironaka, A. Yamauchi et al. // Life Sci. – 2013. – Vol. 93, № 18–19. – P. 664–72. doi: 10.1016/j.lfs.2013.09.001.
12. Журавлева С. А. Гистология. Практикум / С. А. Журавлева. – Минск : "Высшая школа", 2013. – 320 с.
13. Морфофункциональная характеристика поджелудочной железы крыс при хроническом стрессе / О. В. Николаева, М. В. Ковальцова, Н. И. Горголь и др. // Экспериментальная и клиническая медицина. – 2013. – Т. 59, № 2. – С. 23–27.
14. The multifunctional nucleolus. Nature Reviews / F. Boisvert, S. Koningsbruggen, J. Navascues et al. // Molecular Cell Biology. – 2007. – Vol. 8, № 7. P. 574–85. doi: 10.1038/nrm2184.
15. Веруго Л. И. Изменчивость соединительнотканного остова поджелудочной железы. (Морфо-экспериментальное исследование) : автореф. дис. ... канд. мед. наук : спец. 14.00.02. "Анатомия человека" / Л. И. Веруго. – Иркутск, 1990. – 20 с.
16. Вплив дозованої нормобаричної гіпоксії на морфофункціональний стан підшлункової залози / Р. В. Янко, М. І. Левашов, Л. М. Плотнокова та ін. // Патологія, реабілітація, адаптація. – 2017. – Т. 15, № 1. – С. 51–55.
17. Янко Р. В. Морфологічні зміни підшлункової залози після введення мелатоніну у різні сезони року / Р. В. Янко // Фізіологічний журнал. – 2016. – Т. 62, № 6. – С. 88–94. doi.org/10.15407/fz62.06.088.
18. Common variant in MTNR1B associated with increased risk of type 2 diabetes and impaired early insulin secretion / V. Lyssenko,

C. L. Nagorny, M. R. Erdos et al. // Nat Genet. – 2009. – Vol. 41, № 1. – P. 82–88. doi: 10.1038/ng.288.

References:

1. Baranov S., Nechaev V. Pancreas as a single functionally interrelated organ. Meditsinskiy sovet. 2017; 11:148–51. (Russian).
2. Cruickshank A., Benbow E. Pathology of the pancreas. – Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo: Springer-Verlag, 1995.
3. Berezovsky V. Natural and instrumental orotherapy. Donetsk: "Zaslavsky A.Yu.", 2012. (Russian).
4. Powell F., Garcia N. Physiological effects of intermittent hypoxia. High. It. Med. Biol. 2002; 1:125–36.
5. Pevet P. Melatonin and biological rhythms. Therapie. 1998; 30(1):109–124.
6. Jaworek J., Leja-Szpak A., Kot M., Jaworek A., Nawrot-Porbka K., Bonior J., Szklarczyk J. The role of melatonin in pancreatic protection: could melatonin be used in the treatment of acute pancreatitis? Curr Pharm Des. 2014; 20(30):4834–40.
7. Kolesnik YuM, Abramov AV, Ivanenko TV, Zhulinsky VO. The features of expression of BCL-2 and P53 proteins and proliferative activity in pancreatic islets under the influence of intermittent hypoxia in experimental conditions. Visnyk morfologiyi. 2014; 20(2):366–9. (Ukraine).
8. Kushnir Yu., Davidenko I. Influence of melatonin on condition of the Langerhans islets of the pancreas in alloxandibetic rats. Svit medytyny ta biolohii. 2009; 4:31–5. (Ukraine).
9. Fraker C., Ricordi C., Inverardi L., Domínguez-Bendala J. Oxygen: a master regulator of pancreatic development? Biol Cell. 2009; 101(8):431–40. doi: 10.1042/BC20080178.
10. Morishima T., Hasegawa Y., Sasaki H. Effects of different periods of hypoxic training on glucose metabolism and insulin sensitivity. Clin Physiol Funct Imaging. 2015; 35(2):104–09. doi: 10.1111/cpf.12133.
11. Ota H., Itaya-Hironaka A., Yamauchi A., Sakuramoto-Tsushima S., Miyaoka T., Fujimura T., Tsujinaka H., Yoshimoto K., Nakagawara K.,

Tamaki S., Takasawa S., Kimura H. Pancreatic β cell proliferation by intermittent hypoxia via up-regulation of Reg family genes and HGF gene. Life Sci. 2013; 93(18-19): 664–72. doi: 10.1016/j.lfs.2013.09.001.

12. Zhuravleva S. Histology. Workshop. – Minsk: "The High School", 2013. (Russian).

13. Nikolaeva O., Kovaltsova M., Gorgol N., Tatarko S., Ogneva L. Morphofunctional characteristics of pancreas of rats with chronic stress. Eksperymentalna i klinichna medytyna. 2013; 59(2): 23–7. (Russian).

14. Boisvert F., Konningsbruggen S., Navascues J., Lamond A. The multifunctional nucleolus. Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2007; 8(7): 574–85. doi:10.1038/nrm2184.

15. Verigo L. Variability of connective tissue of the pancreas. (Morpho-experimental research). Author. dissertations. 03.00.13. Physiology: Moscow. 2005. (Russian).

16. Yanko R., Levashov M., Plotnikova L., Chaka O. Effect of dozed normobaric hypoxia on the morphofunctional state of the pancreas. Patolohiia, reabilitatsiia, adaptatsiia. 2017; 15(1):51–5. (Ukraine).

17. Yanko R. Morphological changes in the pancreas after the influence of melatonin in different seasons of the year. Fiziolohichniy zhurnal. 2016; 62(6):88–94. doi.org/10.15407/fz62.06.088. (Ukraine).

18. Lyssenko V., Nagorny C., Erdos M. At all. Common variant in MTNR1B associated with increased risk of type 2 diabetes and impaired early insulin secretion. Nat Genet. 2009; 41(1): 82–8. doi: 10.1038/ng.288.

Надійшла до редколегії 12.09.2018

Отримано виправлений варіант 15.10.2018

Підписано до друку 15.10.2018

Received in the editorial 12.09.2018

Received a revised version on 15.10.2018

Signed in the press on 15.10.2018

R. Yanko, канд. биол. наук

Институт физиологии имени А. А. Богомольца НАН Украины, Киев, Украина

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ КРЫС ПОСЛЕ СОВМЕСТНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ДОЗИРОВАННОЙ НОРМОБАРИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ И МЕЛАТОНИНА

Исследованы морфологические изменения поджелудочной железы (ПЖ) крыс после совместного влияния дозированной нормобарической гипоксии (ДНГ) и мелатонина. Исследование проведено в весенний период на 24 крысах-самцах линии Вистар. Подопытным животным ежедневно подавали гипоксическую газовую смесь (12 % кислорода в азоте) в прерывистом режиме: 15 минут деоксигенация / 15 минут реоксигенация в течение 2 часов. Этим же крысам ежедневно перорально вводили экзогенный мелатонин в 10.00 в дозе 5 мг/кг. Продолжительность эксперимента составляла 28 суток. Из ткани ПЖ изготавливали гистологические препараты по стандартной методике. Морфометрию осуществляли с помощью компьютерной программы "Image J". Впервые выявлено, что 28-суточное совместное воздействие ДНГ и мелатонина приводит к увеличению размеров ацинусов, экзокриноцитов, высоты эпителия, гиперплазии ядрышек в ПЖ. Изменение этих показателей может указывать на активацию экзокринной функции железы. Влияние прерывистой гипоксии и мелатонина также повышает (в незначительной степени) активность эндокринной части ПЖ. Об этом свидетельствуют большие размеры островков Лангерганса и количество размещенных в них эндокриноцитов, чем в контроле. У подопытных животных также отмечено снижение толщины прослоек междольковой и межацинусной соединительной ткани, что можно рассматривать как проявление механизма структурной адаптации, который обеспечивает облегчение транспорта кислорода и питательных веществ к паренхиматозным элементам железы. Совместное воздействие ДНГ и мелатонина имеет морфологические признаки увеличения активности как экзокринной, так и эндокринной (в меньшей степени) функции ПЖ.

Ключевые слова: поджелудочная железа, прерывистая гипоксия, мелатонин.

R. Yanko, PhD

O. O. Bogomoletz Institute of Physiology National Academy of Science of Ukraine, Kyiv, Ukraine

MORPHOLOGICAL CHANGES OF THE RATS PANCREAS AFTER THE JOINT INFLUENCE OF THE DOSED NORMOBARIC HYPOXIA AND MELATONIN

The aim of the study was to investigate the morphological changes in the rat's pancreas after the combined effect of dosed normobaric hypoxia (DNG) and melatonin. The study was carried out in the spring on 24 male rats of the Wistar line. The experimental animals were daily given a hypoxic gas mixture (12 % oxygen in nitrogen) in an intermittent mode: 15 minutes deoxygenation / 15 minutes reoxygenation for 2 hours. The same rats were daily administered orally with exogenous melatonin at 10.00 at a dose of 5 mg/kg. The duration of the experiment was 28 days. From the pancreas tissue, histological preparations were prepared according to a standard procedure. The morphometry was performed using the computer program "Image J". For the first time it was revealed that the 28-day combined effect of DNG and melatonin results in an increase in the size of the acinus, exocrine cells, epithelial height, and nucleolus hyperplasia in the pancreas. The change in these parameters may indicate activation of the exocrine function of the gland. The effect of intermittent hypoxia and melatonin also increase (to an insignificant extent) the activity of the endocrine part of the pancreas. This is evidenced by the large size of the Langerhans islets and the number of endocrinocytes placed in them. In the experimental animals was noted a decrease in the thickness of the interlobular and interacinar connective tissue, which can be considered as a manifestation of the mechanism of structural adaptation, which facilitates the transport of oxygen and nutrients to the parenchymal elements of the gland. The combined effect of DNG and melatonin has morphological signs of increased activity of exocrine and endocrine (to a lesser extent) parts of the pancreas.

Keywords: pancreas, intermittent hypoxia, melatonin.

УДК 615.919

O. Oskyrko, stud., J. Dudkina, stud., I. Nikolaieva, PhD-stud., T. Halenova, PhD
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine,
O. Marushchak, PhD-stud.

Schmalhausen Institute of Zoology of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

VARIABILITY AND PROPERTIES OF HOST DEFENSE PEPTIDES FROM THE SKIN SECRETIONS OF ANURANS

Cationic antimicrobial proteins are an important part of innate nonspecific immunity. It is the first defensive level, which is inherent in almost all living organisms. The main objective of such proteins is the destruction of dangerous microorganisms (fungi, bacteria, viruses, parasites etc.). The skin of amphibians is a rich source of these molecules, which are produced and stockpiled in skin glands, which are usually located on the dorsal side of the body. Basically, they are spread over the surface of the body or grouped in special morphological structures – parotids. Currently the host defensive proteins were found in members of all families of amphibians, that suggests a connection among them with evolutionary advantages. Moreover, amphibian antimicrobial proteins can be used in modern medicine. Amphibians can become a rich source of biologically active agents and usage of them is very beneficial for pharmaceutical industry. These substances appeared to have much more abilities than it was believed before. For example, they can be used in methods of blood folding or antiviral therapy. Taking this into account, it is very promising to study antimicrobial proteins in Ukraine (from 15 anuran species of 5 families (Pelobatidae, Hylidae, Bufonidae, Ranidae and Bombinatoridae). This article describes the chemical structure and properties of the antimicrobial proteins presently known from the studies and their presence in different families of Anura. The main aim of the work is to show the variability of these substances in anurans to create a background for further investigations of amphibians' antimicrobial proteins in Ukraine and studying of their pharmaceutical potential.

Key words: antimicrobial peptides, amphibians, protective peptides, skin glands, secretions.

Introduction. The production of antimicrobial peptides is part of the innate immune system and is widely distributed in nature. This system was first discovered in the insects' hemolymph where the synthesis of antimicrobial peptides such as defensins and cecropins is induced in response to microbial infection. Skin secretions of many amphibian species have a wide range of biologically active substances with various functions (amines, proteins, steroids, water- and fat-soluble alkaloids, peptides). Nowadays, compounds with antiviral, antimicrobial, antifungal properties were identified.

The main types of pharmacologically active proteins, that have been discovered so far, are: caeruleins, tachykinins, bradykinins, thyrotropin-releasing hormone, bombesin-like and opioid peptides. In addition to peptides associated with mammalian hormones and/or neurotransmitters, amphibian skin contains numerous peptides with hemolytic properties. The glands that produce the poison and surrounded by myocytes are innervated by sympathetic nerve fibers. Adrenergic stimulation of myocytes in response to stress causes compression of serous cells and releasing of their content by holocrine type of secretion. Antimicrobial proteins synthesized by ribosomes in average length of 10 to 50 amino acid residues are widely distributed in nature. In unicellular organisms, plants and animals, including humans they are the first line of defense against harmful microorganisms [1].

Despite significant variations in the length and structure of host defense proteins (HDP) and no sustainable motives responsible for their activity, there are certain features that are common to all proteins investigated at present. They are as follows: – most of these proteins are cationic due to the presence of many lysine residues in their structure; – in aqueous solutions they usually do not have a secondary structure but take an α – helical conformation among phospholipid vesicles or in membrane-like solution. For example, in a 50 % trifluoroethanol/water solution their charge varies from +2 to +6 at pH 7; at least 50 % amino acid of protein are hydrophobic [2].

The skin of amphibians plays an important role in their survival and helps them to adapt to different environmental conditions [3].

Some of the peptides were found only in certain groups of amphibians. Brevinin-1, esculentin-1 and -2 and temporin were found in the Ranidae family in Eurasia and North America; ranalexin, ranateurin-2 and palustrin – only in the North American ranids; brevinnin-2, tigerinin, japonicin ni-

grocin and melittin-like peptides were found only in the Eurasian toads [4].

Nowadays, there were not discovered two species of amphibians that have the same set of antibiotic proteins and there were not found two proteins with identical sequences in different species of frogs. Ortholog proteins (coded by homologous sequences, for the division of which the act of speciation has led: if a gene existed in some species, which divided into two types by divergence, the copies of the gene in daughterly species called orthologs) and paralogs (homologous sequences, for the division of which a doubling of the gene has resulted, if within the same organism as a result of chromosomal mutation was doubling gene, the copies are called paralogs) are formed because of mutations and processes of speciation. It has been found in many species of amphibians and have different amino acid sequences in different species and often exhibit a different biological activity. Thus, the skin of amphibians are potentially important as a rich source for the discovery of new protein antibiotics.

There is no one mechanism that causes cell death by antimicrobial peptides (AMP), because their performance is always based on nonspecific interactions with the bacterial membrane, without an impact on the specific receptors (Yeaman and Yount, 2003).

It should be noted that the production of AMPs by some species of amphibians is seasonal and is influenced by thyroid hormones [5]. It can also be terminated by environmental factors or pesticides [6].

Almost everywhere we faced the problem of contamination of amphibians by pathogenic chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* Longcore, Pessier & D. K. Nichols 1999 which reduces their populations. Numerous studies have shown that cleaned cytolytic proteins from the skin of frogs inhibit the growth of many types of adult cells and zoospores *B. dendrobatidis* in vitro [7].

Another group of organisms responsible for the deaths of large numbers of amphibians is ranaviruses (Iridoviridae). It turned out that some of the AMBs isolated from secretions of skin glands can inactivate viruses. These include brevinin-1 (affects herpesvirus types 1 and 2); caerin 1.1, caerin 1.9 and maculatin 1.1 (completely inhibit HIV in T cells); esculentin and ranateurin-2R-2R dermaseptin-B1, temporin A (rapidly inactivates frog virus type 3, pathogenic iridovirus) [8–10].

Even though the study of amphibian proteins was mainly focused on their antimicrobial properties, modern studies

show that they are also able to act as a cytokine-mediated immunomodulators, chemoattractants, insulin-releasing factors and have anticancer activity [11, 12].

The purpose of this work is to collect and systematize information from the literature on the distribution and properties of various host defense peptides in organisms of different families of tailless amphibians, especially the families represented in the batrahofauna of Ukraine. This work is the beginning of a series of studies of antimicrobial and other properties of the poisons of anurans in Ukraine, in order to study their perspectives to be used in medicine and pharmacology.

Ways of poisons extraction from the tailless amphibians. There are many ways of getting the poison from anurans, including lethal and non-lethal release. When lethal ways are used, the skin of animals that previously were subjected to decapitation, is removed, dried and ground to powder consistency for further use. Another lethal variant is to place a frog in a flask with anhydrous ether, which stimulates the secretion of the skin poison that is washed from the surface of the animal with deionized water.

Modern non-lethal methods include the usage of an electric current. The animal is subjected to short-term effects of the weak current which causes synchronous release of toxic secretions from the glands. Further, in sterile conditions, the secret is washed from the surface of animal with deionized water [13].

Another non-lethal way is to stimulate poison release by chemical injection: the animal gets a hydrochloride injection into a lymphatic bag (40 nmol/1 g body weight) and is then placed in 100 ml of distilled water for 15 minutes. Poison secret is released into the aquatic environment. After the frog is removed trifluoroacetic acid (TFA) is added and then the solution is frozen for later use [14].

Distribution of skin antimicrobial peptides in the anuran families. It is a common misconception that all frogs synthesize and release cytotoxic peptides into their skin secretions. The distribution of dermal antimicrobial peptides among anuran families is sporadic.

Archaeobatrachia is thought to be a more ancient group than Neobatrachia. It consists of six families: Leiopelmatidae, Alytidae, Bombinatoridae, Pipidae (among which AMPs were found) and Pelobatidae, Scaphiopodidae (for which the presence of AMPs is uncertain) [15].

For the Leiopelmatidae family the presence of ascaphins is typical. Eight proteins with antimicrobial activity (ascaphin 1-8) were extracted from the skin of *Ascaphus truei* Stejneger, 1899. These proteins are structurally similar to each other, indicating possible multiple duplications of the ancestral gene. Ascaphins have a broad spectrum of antimicrobial activity when they are under intense exposure of gram-negative species [6]. It was shown that askafin-8 is a potentially important anti-infective agent that can easily be mass produced. This peptide showed a relatively high inhibition of growth strains of *Escherichia coli* Escherich, 1885 and *Klebsiella pneumonia* (Schroeter 1886) Trevisan, 1887 (minimum inhibitory concentration: the lowest concentration of a chemical that prevents visible growth of a bacterium, MIC < 25 μ M (25×10^{-3} mol/m³)). It also has a high toxicity against mammalian cells (LC50 (the concentrations of the chemical that kills 50 % of the test animals during the observation period) against human erythrocytes = 55 μ M) [16].

Among the Neobatrachia group cationic AMPs were found in the skin of the families Dicroglossidae, Hylidae, Hyperoliidae, Leptodactylidae, Myobatrachidae, and Ranidae. For the families Bufonidae, Ceratophryidae, Eleutherodactylidae, Microhylidae, Pyxicephalidae and Rhacophoridae such proteins are still not found. However, from the skin of *Rhacophorus schlegelii* Gunther, 1858 (Rha-

cophoridae) histone H2B has been extracted, which has cytolytic properties and in skin glands secret of *Dyscophus guineti* Grandidier, 1875 (Microhylidae) a Kunitz-type protease inhibitor with weak antimicrobial activity was found. However, it is unlikely that these substances play an important role in protecting the body [15].

AMPs families. From the skin secretions of *Alytes obstetricans* Laurenti, 1768 two families of structurally similar C-terminal α -amidated AMPs were allocated [15]. These proteins belong to the families alyteserin-1 and alyteserin-2. Representatives of the alisteryn-1 family show selective antibacterial activity (colonies growth inhibition) on Gram-negative bacteria and low hemolytic activity against human erythrocytes. Alysterin-1s has also been very active against nosocomial pathogens *Acinetobacter baumannii* Brisou & Prevot, 1954 [17]. Proteins from the alysterin-2 group primarily inhibit the growth of Gram-positive bacteria, such as *Staphylococcus aureus* Rosenbach, 1884, and like alysterin-1 exhibit low hemolytic activity [15].

Bombinins. All bombinins can be divided into two families according to their structural similarity: bombinins and bombinins H. These AMPs were extracted from the skin secretions of Bombinatoridae (mostly from *Bombina bombina* Linnaeus, 1761, *Bombina variegata* Linnaeus, 1758, *Bombina orientalis* Boulenger, 1890 and *Bombina maxima* Boulenger, 1905).

Bombinins were the first discovered AMPs (from the skin of *B. bombina*) and they have strong hemolytic properties. Later orthologs of bombinin were found, they were isolated from *B. variegata* and *B. orientalis*. These orthologs were called maximin and were later renamed to bombinin-like peptides (BLP).

Subsequently C-terminal α -amidated proteins of 20 amino acids were isolated, which were given the name bombinins H. Bombinins H3, H4 (*B. variegata*) and H6 (*B. orientalis*) were found later and distinguished by the presence of D-alloisoleucine (rather than genetically determined L-isoleucine) and D-leucine (instead of L-leucine) in the second position [18].

Bombinin-like proteins BLP-1 and BLP-3 showed a significant, broad antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative strains and against opportunistic pathogenic *Candida albicans* (C. P. Robin) Berkhout, 1923. They are characterized by low hemolytic activity, while bombinins H2 and H4 are less active against bacteria but have significant hemolytic activity. Interestingly, the analogs containing D-amino acids showed better results in the destruction of bacteria than those with L-amino acids. Antimicrobial activity of hydrophobic bombinins H6 and H7 were lower except for their effect on *Aeromonas hydrophila* Chester, 1901, which is common among frogs and causes the deadly red legs disease [18].

Mahainins. *Xenopus laevis* Daudin, 1802 was the first species, from the skin of which AMP (mahainin-1 and -2) was extracted and classified. The following analysis of skin secretions of *X. laevis* led to isolation and characterisation of peptide leucine-glycine amide (PGLa) and related AMPs with different activities, which are formed by post-translational processing of caerulein and xenopsin precursors. Comparing the amino acid sequences of procaerulein, promagainin and proxenopsin predicted by the nucleotide sequences of their cDNA revealed significant structural similarity in the N-terminal regions. It is suggested that the proteins may originate from a common ancestral gene that has undergone a series of duplications. Orthologs of magayinin-1 and -2, PGLa, caerulein-precursor fragment (CPF) and a xenopsin-precursor fragment (XPF) were found in secretions of skin glands of *Xenopus borealis* Parker, 1936 and *Xenopus amietii* Kobel, du Pasquier, Fischberg & Gloor, 1980 [17].

From the secretions of *Xenopus tropicalis* Gray, 1864 seven protective proteins (XT-1 – CT-7) were extracted, each of which are an ortholog of previously found peptide. So, XT-1, XT-6 and XT-7 are orthologs of CPF; XT-2, XT-3 and XT-4 are orthologs of XPF; XT-5 is an ortholog of PGLa. It was shown that the evolutionary pressure on the primary structure of clawed frogs AMPs was not strong enough to stabilize them, so the sequence of procaerulein- and proenopsin-like proteins are quite variable.

Uperins and signiferins. AMPs were found in the representatives of *Uperoleia* and *Crinia*. From the skin of *Uperoleia mjoberii* Andersson, 1913 and *Uperoleia inunda* Tyler, Davies & Martin, 1981 structurally similar proteins called uperins, which were active against Gram-positive bacteria, were allocated. In *Crinia* species two proteins that differ by only one amino acid, called signiferin 2.1 and signiferin 2.2, which have shown an activity against Gram-positive bacteria, were found. Riparin 2.1, a protein similar to signiferin, was isolated in *Crinia riparia* Littlejohn et Martin, 1965 [15].

Dermaseptin superfamily. Skin secretions from the genus *Hyla* contain genetically closely related but structurally different AMPs, grouped in the dermaseptin superfamily (sensu stricto), which includes dermaseptins, phylloseptins, plasticins, dermatoxins, phylloxins, hyposins, caerins, and aureins.

The family was the subject of intense research because of the extraordinary occurrence of AMPs among Hylidae. Members of different groups differ in their structures and biological effects, but conservative amino acid sequences of the signal protein and the N-terminal proregion precursors of these proteins suggests that they are evolutionarily related [19].

Dermaseptins were studied in detail and were extracted from the skin of a large number of species (*Phyllomedusa sauvagii* Boulenger, 1882, *Phyllomedusa bicolor* Boddaert, 1772, *Phyllomedusa oreades* Brandao, 2002, *Phyllomedusa distincta* Lutz, 1950, *Phyllomedusa hypochondrialis* Daudin, 1800, *Pachymedusa dacinicolor* Cope, 1864, *Agalychnis annae* Duellman, 1963, *Agalychnis callidryas* Cope, 1862, and *Hylomantis lemur* Boulenger, 1882). The common features of all dermaseptins are the presence of residue Trp at position 3 and the constant sequence (Ala-Ala-Xaa-Lys-Ala-Ala-Leu-Xaa-Ala) in the center of the molecule. The greatest differences between these substances are in their cytolytic activity. Dermaseptins -S1, -S3, and -S5 (*P. sauvagii*) have a broad spectrum of antimicrobial activity (against Gram-positive and Gram-negative bacteria) and low hemolytic activity, while dermaseptin-S4 shows a strong antimicrobial and hemolytic action [20].

Plasticins are characterized by the presence of many copies of GXXXG motive and high conformational variability. For example, plasticin-DA1 can obtain an alpha-helical conformation (when bound to anionic phospholipid 1,2-dimyristoylphosphatidylglycerol vesicles) and a beta-folded structure (when bound to zwitterionic dimyristoylphosphatidylcholine vesicles). Plasticins can be divided into different classes based on their cytolytic activity: plasticins B1 and plasticins S1 (strongly cationic, a large number of lysine residues, broad spectrum antimicrobial activity and ability to lyse erythrocytes) and plasticins – A1, – C1, – C2, – DA1 (weakly cationic or neutral, just hemolytic effect). Proteins of *Litoria* genus divided into 5 groups: aureins, caerins, citopins, dahleins and maculatin [2].

Among the different kinds of proteins of the subfamilies (*Phyllomedusinae* and *Pelodyadinae*) of the *Hyla* family there are significant differences, but the amino acid sequence of the signal protein and N-terminal proregion of precursors of aureins and dahleins are very similar, which

may indicate a common evolutionary origin. Not all members of the subfamily *Hylinae* synthesise AMPs: from the skin extract of *Pseudis paradoxa* Linnaeus, 1758 four similar peptides, pseudin 1–4 have been allocated, although they were not allocated through the norepinephrin stimulation.

Pseudin-2 showed the highest activity against Gram-negative bacteria yet was weakly hemolytic. The peptide had a bactericidal effect on *E. coli* (Gram-negative) and was bacteriostatic on *S. aureus* (Gram-positive). As for the *Hylinae* family AMPs were detected in the *Hyla*, *Hypsiboas* and *Osteopilus* subfamilies. The only exception is *Hyla punctata* Daudin, 1802, skin of which has a cationic alpha-helical hylaseptin P1 (broad spectrum antimicrobial activity and low cytotoxicity on mammalian cells) and *Hypsiboas raniceps* Cope, 1862, with raniseptin secretion (AMP family with weak hemolytic action and structural similarity with dermaseptins) [21].

Ocellatins. All studied species of the genus *Leptodactylidae* (*Leptodactylus fallax* Müller, 1926, *Leptodactylus ocellatus* Linnaeus, 1758, *Leptodactylus laticeps* Boulenger, 1918, *Leptodactylus pentadactylus* Laurenti, 1968, *Leptodactylus syphax* Bokermann, 1969, *Leptodactylus validus*, Garman, 1888) produce one or more related protein, which were given names according to the name of a species: for example fallaxin, pentadactylin. Since this nomenclature does not allow us to define the evolutionary relationship of these proteins, all members of the protein family were named ocellatins titled after the first identified peptide. Ocellatins inhibit the growth of Gram-negative colonies but their action is not expressed or is very weak on Gram-positive organisms, for example yeast or *C. albicans*. Their hemolytic activity is very low. From the skin of *L. laticeps* and *L. pentadactylus* glycine and leucine-rich proteins, structurally similar to plasticins, were allocated (which were previously found only in *Phyllomedusa* genus from the family Hylidae). They take random helical conformation in water, beta-folded conformation in methanol and alpha-helical conformation in 50 % trifluoroethanol-water. The protein from *L. laticeps* did not show antimicrobial actions and the peptide from *L. pentadactylus*, despite its weak cationicity is active against Gram-negative bacteria [15].

Kassinatuerins. In the skin of *Kassina senegalensis* (Hyperoliidae family) Dumeril & Birbon, 1841 kassinatuerin-1 was found, and it contained 21 amino acid residues. It has a significant inhibitory effect on *E. coli* and *S. aureus* (MIC < 10 µM) and was strongly hemolytic. Structurally similar kassinatuerin-2 revealed no antimicrobial activity, although its orthologs from the secret of *Kassina maculata* Dumeril, 1953 were active against *S. aureus* [15].

Tigerinins. Tigerinins were found in the subfamily *Dicroglossinae*, *Dicroglossidae* family. These four small (11-12 amino acids), structurally similar C-terminal alpha-amidated proteins have a broad spectrum antimicrobial activity. From the skin of the representatives of the families *Hoplobatrachus* and *Fejervarya* tigerinin-like proteins that are C-terminal alpha-amidated have been allocated. They, as has been shown later, are an important factor in antimicrobial activity [22].

Rana-box containing proteins. The largest number of antimicrobial proteins has been isolated from the skin of frogs of the genus *Rana*. Proteins of ranids have 10-47 amino acid residues and contain a special structure, the rana-box, which is a 7-membered loop with a disulfide bridge at the C-terminus. Numerous of protective proteins of ranids are assigned to 14 families based on the similarity of their sequences. AMPs diversify within a large family and were the subject of many survey studies. Today these families of ranids AMPs are isolated: brevinin-1, brevinin-2, esculentin-1, esculentin-2, ranatuerin-1, palustrin-2, nigro-

cin-2 containing a part of the 7-membered ring; ranatuerin-2 which has a 6-membered ring; japonicin-2 which has an 8-membered ring; ranacyclins which have an 11-membered ring; C-terminal alpha-amidated temporins which are completely circular. Peptides of the brevinin-1 and temporin families have the widest distribution, being found in the majority of Eurasian and New World species. Esculentin-1, esculentin-2, and palustrin-2 have a more restricted distribution in both Eurasian and North American species. To date, peptides of the brevinin-2 family have been found only in Eurasian frogs, but brevinin-2-related peptides, lacking the C-terminal cyclic domain, have been isolated from North American ranids. Peptides of the ranatuerin-1 family have been identified only in the skins of North American bullfrogs of the *Aquarana* species group. Ranatuerin-2 peptides are found in most New World species, but the distribution in Eurasian frogs is much more restricted. Japonicin-1, japonicin-2, and nigrocin-2 have only been found in Asian species [23].

Brevinsins-1 have a broad spectrum of antimicrobial activity and are potent hemolytic. Temporins are potential anti-infective agents due to their small size (8-21 amino acid residues) and the simplicity of the artificial synthesis. Most of them only act against Gram-positive organisms, but temporin-L (*Rana temporaria*, Linnaeus, 1758) and temporin-1DRa (*Rana draytonii* Baird & Girard, 1852) are capable of inhibiting Gram-negative species [15].

Use of AMP in phylogeny. Host defensive proteins from the skin of amphibians can be used as taxonomic and phylogenetic markers to study the evolution of different families of frogs. Studies confirm that cladistical analysis based on the primary structure of the HDPs of ranids can be used as a complement to analysis based on morphological characteristics and comparing nucleotide sequences of mitochondrial and nuclear genes.

One study, however, shows that even within the same family, species belonging to the same genus can synthesize AMPs, while other species can not. Despite the fact that the skin of amphibians from genera *Xenopus* and *Silurana* produces a lot of AMPs, they were not found in the skin of *Pipa pipa*, which also belongs to the family Pipidae [15].

Use of AMP in pharmacology. AMPs also have different pharmacological effects including cardiotoxic, mitotoxic and neurotoxic activity [24]. Due to the widespread use of antibiotics in recent decades, we now have an increase in the number of viruses and bacteria that are resistant to all current antibiotics. This creates a global public health crisis and the urgent need for new antimicrobial agents. Therefore, it is interesting that maculatin and caerin show strong antiviral effect and the ability to prevent the development of HIV by breaking the shell of the virion [25, 26].

Although magainin-2 has only a low activity against Gram-positive bacteria, its counterpart pexiganan with the replacement of lysine, has a broad spectrum of antimicrobial activity and a low toxicity on mammalian cells and has been studied as a therapeutic agent and particularly important against the foot ulcer in diabetic patients. Its mechanism of action is based on the formation of pores. CPF-like protein XT-7 showed moderate hemolytic activity on human red blood cells (LD50 (the amount of a material, given all at once, which causes the death of 50 % of a group of test animals) = 140 µM), limiting its use as a medicine. However, its counterpart [G4K] XT-7 is not hemolytic (LC50 = 500 µM) and retains a high antimicrobial activity. Proton magnetic resonance spectroscopy showed the decrease of analogues toxicity correlated with the decrease of helicity and increase of cationicity.

Among currently surveyed AMPs, esculentin-2LSa is the most suitable for the production of therapeutically important anti-infective agents. Its high activity (MIC = 4 µM) against *S. aureus* gives cause to develop a non-toxic analog with appropriate pharmacokinetic properties for the treatment of methicillin-resistant strains of *S. aureus* (MRSA) based on esculentin-2LSa. Esculentin-2 shows immunomodulatory and anti-tumor properties [27].

Discussion. It is difficult now to draw a definitive conclusion regarding the importance of frog skin peptides in defending the host. It is suggested that AMPs offer definite evolutionary advantage to anurans, but their presence in skin secretions is not essential to survival. It is highly probable that AMPs in the skin do represent a component of the system of innate immunity in the limited number of species that produce them. Besides, these peptides are a potentially valuable source for manufacturing of antibiotics for human due to their antimicrobial properties. All in all, use of AMP in phylogeny and pharmacology make them important substances to explore.

Acknowledgements. Special thanks to R. J. Teschner (University of Konstanz, Germany) for help with ukrainian-english translation.

Список використаних джерел:

1. Jenssen H. Peptide antimicrobial agents / H. Jenssen, P. Hamill, R. E. Hancock // Clin. Microbiol. Rev. – 2006. – № 19. – P. 491–511.
2. Host-defence peptides from the glandular secretions of amphibians: structure and activity / T. L. Pukala, J. H. Bowie, V. M. Maselli et al. // Nat. Prod. Rep. – 2006. – № 23. – P. 368–393.
3. Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms / M. Zasloff // Nature. – 2002. – № 415. – P. 389–395.
4. The ascaphins: a family of antimicrobial peptides from the skin secretions of the most primitive extant frog, *Ascaphus truei* / J. M. Conlon, A. Sonnevend, C. Davidson et al. // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2004. – № 320. – P. 170–175.
5. Developmental and triiodothyronine-induced expression of genes encoding preprotemporins in the skin of Tago's brown frog *Rana tagoi* / A. Ohnuma, J. M. Conlon, H. Kawasaki et al. // Gen. Comp. Endocrinol. – 2006. – № 146. – P. 242–250.
6. Effects of chytrid and carbaryl exposure on survival, growth and skin peptide defenses in foothill yellow-legged frogs / C. Davidson, M. F. Benard, H. B. Shaffer et al. // Environ. Sci. Technol. – 2007. – № 4. – P. 1771–1776.
7. Kilpatrick A. M. The ecology and impact of chytridiomycosis: an emerging disease of amphibians / A. M. Kilpatrick, C. J. Briggs, P. Daszak // Trends Ecol. Evol. – 2010. – № 25. – P. 109–118.
8. Inactivation of viruses infecting ectothermic animals by amphibian and piscine antimicrobial peptides / V. G. Chinchar, L. Bryan, U. Silphadaung et al. // J. Virol. – 2004. – № 323. – P. 268–275.
9. Antimicrobial peptides from amphibian skin potentially inhibit human immunodeficiency virus infection and transfer of virus from dendritic cells to T cells / S. E. VanCompernelle, R. J. Taylor, K. Oswald-Richter et al. // J. Virol. – 2005. – № 79. – P. 1598–1606.
10. Evaluation of the inactivation of infectious *Herpes simplex* virus by host-defense peptides / B. Yasin, M. Pang, J. S. Turner et al. // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. – 2000. – № 19. – P. 187–194.
11. Conformational analysis of the frog skin peptide, plasticin-L1, and its effects on production of proinflammatory cytokines by macrophages / M. A. Scrociapino, G. Manzo et al. // Biochem. – 2013. – № 52. – P. 7231–7241.
12. Caerulein precursor fragment (CPF) peptides from the skin secretions of *Xenopus laevis* and *Silurana epittropicalis* are potent insulin-releasing agents / D. Srinivasan, M. Mechkarska, Y. H. Abdel-Wahab et al. // Biochim. – 2013. – № 95. – P. 429–435.
13. Purification and characterization of novel antimicrobial peptides from the skin secretion of *Hylarana guentheri* / Z. Jianwu, S. McClean, Alan Thompson et al. // Pept. – 2006. – № 27. – P. 3077–3084.
14. Host defense peptides from *Lithobates forreeri*, *Hylarana luatuosa*, and *Hylarana signata* (Ranidae): Phylogenetic relationships inferred from primary structures of ranatuerin-2 and brevinin-2 peptides / J. M. Conlon, J. Kolodziejek, M. Mechkarska et al. // Comp. Biochem. and Phys. – 2014. – № 9. – P. 49–57.
15. Conlon J. M. Antimicrobial peptides from the skins of North American frogs / J. M. Conlon, J. Kolodziejek, N. Nowotny // Biochim. Biophys. Acta. – 2009. – № 1788. – P. 1556–1563.
16. Activities of the frog skin peptide, ascaphin-8 and its lysine-substituted analogs against clinical isolates of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing bacteria / A. Eley, M. Ibrahim, S. E. Kurdi, J. M. Conlon // 2008. – № 29. – P. 25–30.
17. Potent and rapid bactericidal action of alyteserin-1c and its[E4K] analog against multidrug-resistant strains of *Acinetobacter baumannii*

/ J. M. Conlon, E. Ahmed, T. Pal, A. Sonnevend // Pept. – 2010. – № 31. – P. 1806–1810.

18. Mangoni M. L. Biological characterization and modes of action of temporins and bombinins H, multiple forms of short and mildly cationic antimicrobial peptides from amphibian skin / M. L. Mangoni, H. G. Marcellini, M. Simmaco // J. Pept. Sci. – 2007. – № 13, – P. 603–613.

19. Nicolas P. The dermaseptin superfamily: a gene-based combinatorial library of antimicrobial peptides / P. Nicolas, C. El Amri // Biochim. Biophys. Acta. – 2009. – № 1788. – P. 1537–1550.

20. Frost D. R. Amphibian species of the world: an online reference. Version 5.4 [Electronic resource] / D. R. Frost // American Museum of Natural History, New York. – 2010. – Access mode : <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/>

21. Post-secretory events alter the peptide content of the skin secretion of *Hypsiboas raniceps* / B. S. Magalhães, J. A. Melo, J. R. Leite et al. // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2008. – № 377. – P. 1057–1061.

22. Structure-function relationship studies on the frog skin antimicrobial peptide tigerin 1: design of analogs with improved activity and their action on clinical bacterial isolates / N. Sitarum, K. P. Sai, S. Singh et al. // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2008. – № 46(7). – P. 2279–2283.

23. Yeaman M. R. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance / M. R. Yeaman, N. Y. Yount // Pharmacol. Rev. – 2003. – № 55. – P. 27–55.

24. Toxicology and pharmacology of poison poisons of the genus *Bufo* / K. O. Chernoshan, B. M. Bondarenko, V. S. Danilenko et al. // Mod. Tox. Prob. – 2000. – № 4. – P. 6–17.

25. Pereira H. A. Novel therapies based on cationic antimicrobial peptides / H. A. Pereira // Curr. Pharm. Biotechnol. – 2006. – № 7. – P. 229–234.

26. Peschel A. The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance / A. Peschel, H. G. Sahl // Nat. Rev. Microbiol. – 2006. – № 4. – P. 529–536.

27. Esculentin-2ChA: A host-defense peptide with differential cytotoxicity against bacteria, erythrocytes and tumor cells / S. Attoub, M. Mechakarska, A. Sonnevend et al. // Pept. – 2009. – № 39. – P. 95–102.

References:

- Jenssen H., Hamill P., Hancock R. E. Peptide antimicrobial agents. Clin. Microbiol. Rev. 2006;19:491–511.
- Pukala T. L., Bowie J. H., Maselli V. M., Musgrave I. F., Tyler M. J. (2006). Host-defense peptides from the glandular secretions of amphibians: structure and activity. Nat. Prod. Rep. 23, 368–393.
- Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. Nature. 2002;415:389–395.
- Conlon J. M., Sonnevend A., Davidson C., Smith D. D., Nielsen P. F. The ascaphins: a family of antimicrobial peptides from the skin secretions of the most primitive extant frog, *Ascaphus truei*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2004;320:170–175.
- Ohnuma A., Conlon J. M., Kawasaki H., Iwamuro S. Developmental and triiodothyronine-induced expression of genes encoding preprotemporins in the skin of Tago's brown frog *Rana tagoi*. Gen. Comp. Endocrinol. 2006;146:242–250.
- Davidson C., Benard M. F., Shaffer H. B., Parker J. M., O'Leary C., Conlon J. M., Rollins-Smith L. A. Effects of chytrid and carbaryl exposure on survival, growth and skin peptide defenses in foothill yellow-legged frogs. Environ. Sci. Technol. 2007;41:1771–1776.
- Kilpatrick A. M., Briggs C. J., Daszak P. The ecology and impact of chytridiomycosis: an emerging disease of amphibians. Trends Ecol. Evol. 2010;25:109–118.
- Chinchar V. G., Bryan L., Silphadaung U., Noga E., Wade D., Rollins-Smith L. Inactivation of viruses infecting ectothermic animals by amphibian and piscine antimicrobial peptides. Virol. 2004;323:268–275.
- Van Compernelle S. E., Taylor R. J., Oswald-Richter K., Jiang J., Youree B. E., Bowie J. H., Tyler M. J., Conlon J. M., Wade D., Aiken C., Dermody T. S., Kewal Ramani V. N., Rollins-Smith L. A., Unutmaz D. Antimicrobial peptides from amphibian skin potentially inhibit human immunodeficiency virus infection and transfer of virus from dendritic cells to T cells. J. Virol. 2005;79:11598–11606.
- Yasin B., Pang M., Turner J. S., Cho Y., Dinh N. N., Waring A. J., Lehrer R. I., Wagar E. A. Evaluation of the inactivation of infectious Herpes simplex virus by host-defense peptides. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 2000;19:187–194.
- Scorciapino M. A., Manzo G., Rinaldi A. C., Sanna R., Casu M., Pantic J. M., Lukic M. L., Conlon J. M. Conformational analysis of the frog skin peptide, plasticin-L1, and its effects on production of proinflammatory cytokines by macrophages. Biochem. 2013;52:7231–7241.
- Srinivasan D., Mechakarska M., Abdel-Wahab Y. H., Flatt P. 2006;27:3077–3084.
- Conlon J. M., Kolodziejek J., Mechakarska M., Coquet L., Leprince J., Jouenne T., Vaudry H., Nielsen P. F., Nowotny N., King J. D. Host defense peptides from *Lithobates forsteri*, *Hylarana luctuosa*, and *Hylarana signata* (Ranidae): Phylogenetic relationships inferred from primary structures of ranatuerin-2 and brevinin-2 peptides. Comp. Biochem. and Phys. 2014;9:49–57.
- Conlon J. M., Kolodziejek J., Nowotny N. Antimicrobial peptides from the skins of North American frogs. Biochim. Biophys. Acta. 2009;1788:1556–1563.
- Eley A., Ibrahim M., Kurdi S. E., Conlon J. M. Activities of the frog skin peptide, ascaphin-8 and its lysine-substituted analogs against clinical isolates of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing bacteria. Pept. 2008;29:25–30.
- Conlon J. M., Ahmed E., Pal T., Sonnevend A. Potent and rapid bactericidal action of alyteserin-1c and its [E4K] analog against multidrug-resistant strains of *Acinetobacter baumannii*. Pept. 2010;31:1806–1810.
- Mangoni M. L., Marcellini H. G., Simmaco M. Biological characterization and modes of action of temporins and bombinins H, multiple forms of short and mildly cationic anti-microbial peptides from amphibian skin. J. Pept. Sci. 2007;13:603–613.
- Nicolas P., El Amri C. The dermaseptin superfamily: a gene-based combinatorial library of antimicrobial peptides. Biochim. Biophys. Acta. 2009;1788:1537–1550.
- Frost D. R. Amphibian species of the world: an online reference. Version 5.4. American Museum of Natural History, New York. 2010. <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/>
- Magalhães B. S., Melo J. A., Leite J. R., Silva L. P., Prates M. V., Vinecky F., Barbosa E. A., Verly R. M., Mehta A., Nicoli J. R., Bemquerer M. P., Andrade A. C., Bloch C. J. Post-secretory events alter the peptide content of the skin secretion of *Hypsiboas raniceps*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2008;377:1057–1061.
- Sitarum N., Sai K. P., Singh S., Sankaran K., Nagaraj R. Structure-function relationship studies on the frog skin antimicrobial peptide tigerin 1: design of analogs with improved activity and their action on clinical bacterial isolates. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2008;46(7):2279–2283.
- Yeaman M. R., Yount N. Y. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. Pharmacol. Rev. 2003;55:27–55.
- Chernoshan K. O., Bondarenko B. M., Danilenko V. S., Duzhak V. G., Omelyanenko Z. P., Lysenko O. K. Toxicology and pharmacology of poison poisons of the genus *Bufo*. Mod. Tox. Prob. 2000;4:6–17.
- Pereira H. A. Novel therapies based on cationic antimicrobial peptides. Curr. Pharm. Biotechnol. 2006;7:229–234.
- Peschel A., Sahl H. G. The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. Nat. Rev. Microbiol. 2006;4:529–536.
- Attoub S., Mechakarska M., Sonnevend A., Radosavljevic, G., Jovanovic, I., Lukic, M. L., Conlon, J. M. Esculentin-2ChA: A host-defense peptide with differential cytotoxicity against bacteria, erythrocytes and tumor cells. Pept. 2013;39:95–102. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.11.004>

Надійшло до редколегії 12.09.2018

Отримано виправлений варіант 15.10.2018

Підписано до друку 15.10.2018

Received in the editorial 12.09.2018

Received a revised version on 15.10.2018

Signed in the press on 15.10.2018

О. Осирко, студ., Ю. Дудкіна, студ., І. Ніколаєва, асп., Т. Галенова, канд. біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна,
О. Марущак, асп.
Інститут зоології імені І. І. Шмальгаузена НАН України, Київ, Україна

РІЗНОМАНІТТЯ І ВЛАСТИВОСТІ ЗАХИСНИХ ПЕПТИДІВ ІЗ ШКІРНИХ СЕКРЕТІВ БЕЗХВОСТИХ АМФІБІЙ

Катіонні протимікробні білки є важливою частиною вродженого неспецифічного імунітету, першого захисного бар'єру, властивого майже всім живим організмам. Основним завданням таких білків є знищення небезпечних мікроорганізмів (грибків, бактерій, вірусів, паразитів і т. д.). Шкіра амфібій є багатим джерелом таких сполук, що містять відповідні захисні пептидні молекули, які виділяються і депонуються в розміщених на дорзальному боці тіла шкірних залозах. На сьогодні захисні білки були виявлені в усіх родин земноводних, що вказує на можливість використання зв'язку між структурою цих білків та частин генома, відповідальних за їх виробництво, в еволюційних дослідженнях і пошуку філогенетичних зв'язків між окремими групами амфібій. Крім того, антимікробні білки можуть використовуватися в сучасній медицині. Амфібії можуть стати багатим джерелом біологічно активних речовин, використання яких може дати новий виток розвитку фармацевтичної промисловості. У цих речовин було відкрито набагато більше можливостей, ніж вважалося раніше. Наприклад, вони можуть використовуватися як коагулянти або як компоненти протівірусної терапії. Таким чином, вивчення властивостей антимікробних білків в Україні (з 15 видів безхвостих земноводних, що належать до 5 родин (*Pelobatidae*, *Hylidae*, *Bufo*, *Ranidae* і *Vombinatoridae*)) є дуже перспективним і багатообіцяючим напрямом спільних досліджень у галузях біохімії та зоології. У цій статті описуються хімічні особливості і властивості протимікробних білків, відомих зараз з літератури, і їх присутності в різних сімействах безхвостих земноводних. Основна мета роботи – показати мінливість цих речовин у амфібій, щоб дати основу для подальших досліджень антимікробних білків в Україні та вивчення їхнього фармацевтичного потенціалу.

Ключові слова: антимікробні пептиди; амфібії; захисні пептиди; шкірні залози; секрет.

О. Осирко, студ., Ю. Дудкина, студ., И. Николаева, асп., Т. Галенова, канд. биол. наук
 Киевский национальный университет имени Тараса Шевченка, Киев, Украина,
 О. Марущак, асп.
 Институт зоологии имени И. И. Шмальгаузена НАН Украины, Киев, Украина

РАЗНООБРАЗИЕ И СВОЙСТВА ЗАЩИТНЫХ ПЕПТИДОВ ИЗ КОЖНЫХ СЕКРЕТОВ БЕСХВОСТЫХ АМФИБИЙ

Катионные противомикробные белки являются важной частью врожденного неспецифического иммунитета, первого защитного барьера, присущего почти всем живым организмам. Основной задачей таких белков является уничтожение опасных микроорганизмов (грибков, бактерий, вирусов, паразитов и т. д.). Кожа амфибий является богатым источником соединений, содержащих такие молекулы, которые производятся и депонируются в расположенных на дорзальной стороне тела кожных железах. В настоящее время защитные белки были обнаружены у всех семейств земноводных, что указывает на возможность использования связи между структурой этих белков, частей генома, ответственных за их производство в эволюционных исследованиях, и поиске филогенетических связей между отдельными группами амфибий. Более того, антимикробные белки могут использоваться в современной медицине. Амфибии могут стать богатым источником биологически активных веществ, использование которых может дать новый виток фармацевтической промышленности. У этих веществ было открыто гораздо больше возможностей, чем считалось ранее. Например, они могут использоваться в качестве коагулянтов или как компоненты противовирусной терапии. Таким образом, изучение свойств антимикробных белков в Украине (из 15 видов бесхвостых земноводных, относящихся к 5 семействам – Pelobatidae, Hylidae, Bufonidae, Ranidae и Bombinatoridae) является очень перспективным и многообещающим направлением совместных исследований в областях биохимии и зоологии. В этой статье описываются химические особенности и свойства противомикробных белков, известных в настоящее время из литературы, и их присутствия в разных семействах бесхвостых земноводных. Основная цель работы – показать изменчивость этих веществ у амфибий, чтобы создать основу для дальнейших исследований антимикробных белков в Украине и изучения их фармацевтического потенциала.

Ключевые слова: антимикробные пептиды; амфибии; защитные пептиды; кожные железы; секреты.

УДК 616-056.52

Н. Белемеч, асп., Т. Фалалеева, д-р биол. наук,
 Т. Берегова, д-р биол. наук, Л. Остапченко, д-р биол. наук
 ННЦ "Институт биологии та медицини",
 Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна,
 Н. Кобиляк, канд. мед. наук, О. Курик, д-р мед. наук
 Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, Київ, Україна,
 О. Суласва, д-р мед. наук
 Патоморфологічна лабораторія "CSD Health Care", Київ, Україна

МОРФОГЕНЕЗ ПІДШЛУНКОВОЇ ЗАЛОЗИ ЗА УМОВ ГЛУТАМАТ-ІНДУКОВАНОГО ОЖИРІННЯ: МЕХАНІЗМИ КОРИГУЮЧОЇ ДІЇ МЕЛАНІНУ

Досліджено морфогенез підшлункової залози в щурів за умов глутамат-індукованого ожиріння та оцінювання ефектів меланіну за певних умов. Дослідження здійснено на 45 новонароджених самцях щурів Wistar, розділених на 3 групи по 15 тварин у кожній. 1 група – новонародженим щурам інтактної групи підшкірно в кількості 8 мкл/г вводили фізіологічний розчин на 2–10-й день життя. 2 група – новонародженим щурам підшкірно в кількості 8 мкл/г вводили глутамат натрію (ГН) (4 мг/г) відповідно на 2–10-й день життя. 3 група щурів отримувала меланін (1 мг/кг), розчинений у воді (0,25 мл/100 г) (внутрішньошлунково, в/ш). Група II відповідно отримувала 2,5 мл/кг води (в/ш). Меланін було отримано з дріжджоподібних штамів *Pseudonadsoniellabrunnea*(*Nadsoniellanigra* X1 з Української антарктичної станції. Введення меланіну починали через 4 тижні після народження та продовжували двотижневими курсами з перервами у 2 тижні. Протягом 4 місяців після народження щури перебували на звичайному харчовому раціоні. 4-місячних тварин декапітували, забирали підшлункову залозу для гістологічного та імуногістохімічного дослідження. Підшлункову залозу фіксували в 10 % формаліні, зневоднювали і заливали парафіновим воском. Парафінові ділянки 5 мкм були розрізані та забарвлені гематоксиліном та еозином. Оскільки запалення є одним із провідних механізмів ураження підшлункової залози під час ожиріння, прозапальну активацію клітин підшлункової залози аналізували імуногістохімічною оцінкою клітин CD68, експресією NF-kB та TNF-α.

Введення глутамату натрію викликало розвиток ожиріння зі збільшенням обсягу вісцерального жиру, зростанням кількості в ньому прозапальних макрофагів та підвищенням експресії NF-kB і TNFα. У підшлунковій залозі відбувалася гіперплазія інсулярного апарату, асоційована з макрофагальною інфільтрацією і підвищенням експресії COX-2. Введення меланіну запобігало порушенню морфогенезу підшлункової залози у тварин з глутамат-індукованим ожирінням, нівелюючи активацію прозапальних сигнальних шляхів.

Ключові слова: глутамат натрію, ожиріння, клітини CD68, експресія NF-kB і TNF-α, меланін.

Вступ. За висновком Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ), ожиріння є однією з найбільш актуальних проблем у зв'язку з його високою поширеністю по всьому світу, а також його внеском у високі показники супутньої захворюваності та смертності [9]. Метаболічні порушення під час ожиріння призводять до виникнення ряду захворювань, а саме до розвитку цукрового діабету 2 типу, кардіоваскулярної патології (артеріальна гіпертензія, атеросклероз, ішемічна хвороба серця, цереброваскулярні розлади), змінопорно-рухового апарату (остеохондроз хребта та обмінно-дистрофічний поліартрит), уражень гепато-біліарної системи (дискінезія жовчного міхура, хронічний холецистит, жовчнокам'яна хвороба, неалкогольне жирове

ураження печінки), злоскісних новоутворень, зокрема раку легень, молочної залози, раку тіла матки і яєчника тощо. [6, 25]. Ожиріння зменшує тривалість життя на 3–5, а інколи, у разі тяжких форм, на 15 років [29].

Ожиріння, особливо в ранньому онтогенезі, – це багатофакторний процес, який супроводжується змінами харчової поведінки, системних механізмів регуляції метаболізму [3, 25]. Це неминуче позначається не тільки на функціонуванні, а й на морфогенезі підшлункової залози (ПЗ). ПЗ має дві частини: екзокринну, що продукує широкий спектр травних ферментів, і ендокринну, яка формує 1–3 % маси залози і є джерелом панкреатичних гормонів [22, 27]. Ендокринна і екзокринна частини ПЗ розвиваються з одного ембрі-

онального джерела [3, 10] і тісно пов'язані анатомічно, однак при цьому часто ці дві частини вивчаються окремо один від одного [2, 5, 14, 17, 27].

Результати досліджень, присвячених оцінюванню стану екзокринної частини ПЗ у разі ожиріння та цукрового діабету 2 типу (ЦД2), суперечливі. Деякі автори продемонстрували зниження маси ацинусів ПЗ [14, 19]. Інші, навпаки, довели збільшення об'єму ПЗ як за рахунок панкреатичного жиру, так і за рахунок маси ацинусів [13, 21]. Однією з потенційних причин порушень функціонування екзокринної частини ПЗ під час ожиріння вважається запалення [8, 19]. Ця концепція підтверджується фактором частоти асоціації ожиріння з розвитком панкреатиту [9, 16, 26].

З іншого боку, відомо, що ожиріння як фактор ризику розвитку діабету 2 типу пов'язане з гіперінсулінемією [24]. Останній, по суті, є компенсаторним механізмом, спрямованим на підтримку нормоглікемії. Основним джерелом продукції інсуліну є бета-клітини островців ПЗ [20, 22]. Завдяки пластичності і феномену трансдиференціювання можливе збільшення кількості бета-клітин і маси ендокринних островців [1, 2]. Крім того, у разі ожиріння описано збільшення питомої площі островців на 30 % і підвищення маси бета-клітин на 50 % [18, 28]. З іншого боку, надлишкове навантаження на бета-клітини може призводити до їх пошкодження та зниження кількості [14, 30]. Зважаючи на багатфакторність етіологічних чинників, залишається незрозумілим, що первинне – ураження ендо- чи екзокринної частини ПЗ у разі ожиріння? Які механізми та морфогенетичні прояви дисфункції ПЗ у разі ожиріння в ранній постнатальний період? Це, у свою чергу, обмежує можливості корекції дисфункції ПЗ під час ожиріння.

Раніше нами було показано протективні ефекти меланіну, що знижує розвиток глутамат-індукованої ожиріння в ранній постнатальний період і обмежує розвиток неалкогольного жирового пошкодження печінки [4].

Метою цієї роботи було вивчення морфогенезу ПЗ у разі глутамат-індукованого ожиріння та оцінюванню ефектів меланіну за певних умов.

Матеріали й методи. Дослідження виконано на 45 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.

Щурів було розділено на 3 групи по 15 тварин в кожній. Новонародженим щурам I групи підшкірно в

кількості 8 мкл/г вводили 0,9 % NaCl. Новонародженим щурам II та III груп підшкірно в кількості 8 мкл/г вводили глутамат натрію (4 мг/г) відповідно на 2, 4, 6, 8, 10-й день життя [11, 12]. Протягом 4 місяців після народження щури перебували на звичайному харчовому раціоні. III група отримувала меланін (1 мг/кг), розчинений у воді (0,25 мл/100 г) (внутрішньошлунково, в/ш). Група II відповідно отримувала 2,5 мл/кг води (в/ш). Введення починали через 4 тижні після народження та продовжували двотижневими курсами з перервами у 2 тижні. Протягом 4 місяців у щурів усіх груп було зроблено аналіз змін маси тіла. 4-місячних тварин декапітували, збирали ПЗ для гістологічного та імуногістохімічного дослідження [5, 18].

ПЗ фіксували в 10 % нейтральному формаліні протягом 1-2 діб. Далі препарат піддавали зневодненню у розчині ацетилового спирту зростаючих концентрацій (70 %, 80 %, 90 %, 96 % – по одній добі в кожному розчині), просвітленню у діоксані (0,5–2 год.) та хлороформі (1 год.), просочуванню сумішшю парафіну з хлороформом 1:1 (до 2 год. при температурі + 37 °C) та чистим парафіном (2 год. при температурі + 56 °C), після чого заливали у чистий розплавлений парафін. Парафінові зрізи підшлункової залози завтовшки до 5 мкм виготовляли на санному мікротомі, фарбували гематоксиліном з дофарбуванням еозином.

Для оцінки наявності та вираженості запальних змін на тлі експериментального ожиріння було здійснено імуногістохімічне дослідження з оцінкою кількості і розподілу CD68 позитивних клітин [7]. Крім того, оцінювали експресію таких відомих маркерів запалення, як NF- κ B і циклооксигеназа 2 (COX2), а також експресію TNF-альфа імуногістохімічно за стандартним протоколом [5, 15]. Підраховували відсоток імунопозитивних клітин в різних компартментах ПЗ. Інтенсивність імунопозитивних клітин оцінювали напівкількісним методом як слабку (1+), помірну (2+) або виражену (3+) [18, 23].

Під час оцінювання ендокринної частини ПЗ виконували вимірювання діаметра островців і оцінку кількості клітин у межах одного островця.

Статистична обробка даних здійснювалася у пакеті програм "Statistica 8.0". Для аналізу виду розподілу даних було використано Вкритерій Шапіро–Уїлка. Оскільки дані виявилися нормально розподіленими, то для статистичної обробки було використано критерій Лева на для оцінки рівності дисперсій і *t*-критерій Ст'юдента – для незалежних вибірок. Розраховували середнє значення (*M*) і стандарт квадратичне відхилення (*SD*). Значущими вважали відмінності при $p \leq 0,05$.

Результати та обговорення. Розвиток глутамат-індукованого ожиріння супроводжувався накопиченням вісцерального жиру, в межах якого визначалися гіпертрофовані адипоцити, з ділянками запальної інфільтрації. Проведення імуногістохімічного дослідження виявило наявність між адипоцитами і в межах інфільтратів значної кількості прозапальних макрофагів, що експресували NF- κ B і TNF α (рис. 1).

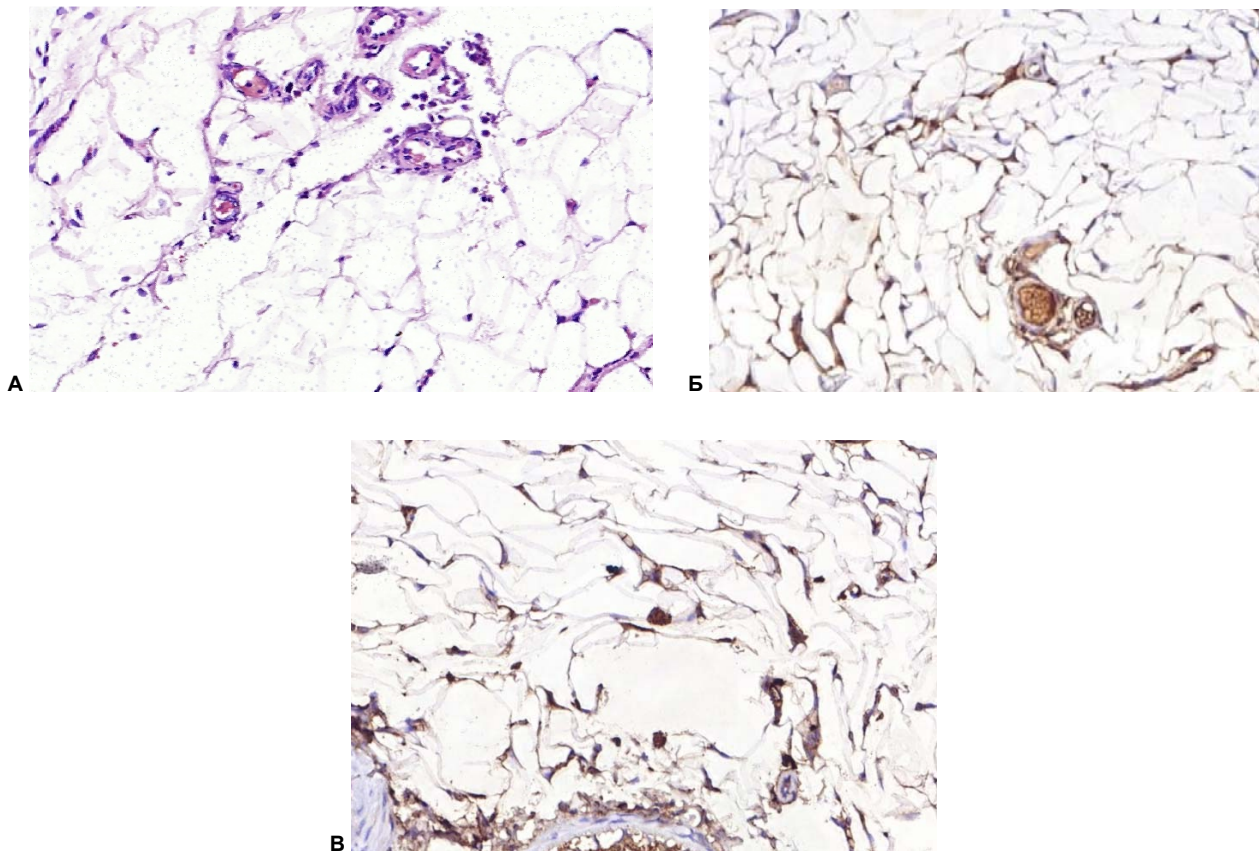


Рис. 1. Жирова тканина за експериментального глутамат-індукованого ожиріння.

А – запальні зміни на тлі гіпертрофії адипоцитів. Забарвлення гематоксиліном і еозином. 36. 100.

Б – експресія NF-kB і В – експресія TNFα. Імуногістохімічне дослідження з використанням МАТ до NF-kB і TNFα. 36. 100

Вивчення морфології ПЗ у тварин з глутамат-індукованим ожирінням виявило зміну пропорцій екзо- і ендокринної частин залози. Ці зміни були обумовлені

збільшенням кількості, розміру і щільності розташування острівців Лангерганса. Вони розташовувалися групами, формуючи пари або каскади (рис. 2).

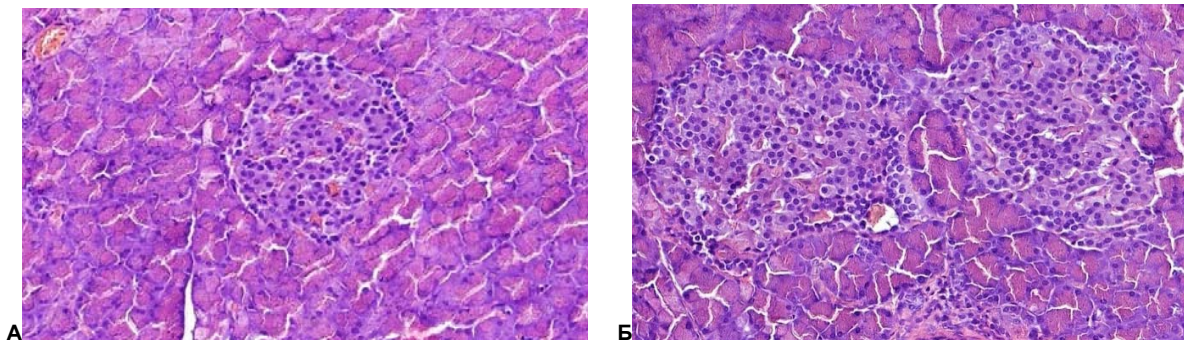


Рис. 2. Збільшення кількості та розмірів ендокринних острівців підшлункової залози за умов глутамат-індукованого ожиріння. Забарвлення гематоксиліном і еозином. 36. 200

Частина острівців мали витягнуту форму, і були розташовані переважно на периферії часточок – іноді близько до міжчасточкових перегородок і протоків. Середній діаметр острівців у тварин експериментальної групи зріс більш, ніж в 2 рази ($P < 0,001$). Це супроводжувалося збільшенням кількості і щільності ендокринних клітин в межах острівця, що дозволяє говорити про гіперплазію інсулоцитів. Середня кількість ендокринних клітин в острівці в межах одного зрізу зросла з 122 ± 8 до 204 ± 15 ($P < 0,001$). При цьому найбільша щільність розташування ендокринних клітин була зареєстрована на периферії острівців. Зміна щільності клітин і розмірів острівців супрово-

джувався незначним збільшення кількості і щільності кровоносних судин з ознака активної перфузії.

Екзокринна частина ПЗ у тварин з глутамат-індукованим ожирінням характеризувалася варіабельними проявами зміни секреторної активності ацинусів – у них варіювала вираженість зимогенної зони. Хоча при цьому не виявлено достовірних змін розмірів ацинусів. У деяких випадках у міжчасточкових перегородках було помічено скупчення адипоцитів великих розмірів.

Характерно ознакою для тварин з глутамат-індукованим ожирінням була наявність у міжчасточкових перегородках лейкоцитарної інфільтрації – переважно в периваскулярних і перидуктальних зонах (рис. 3).

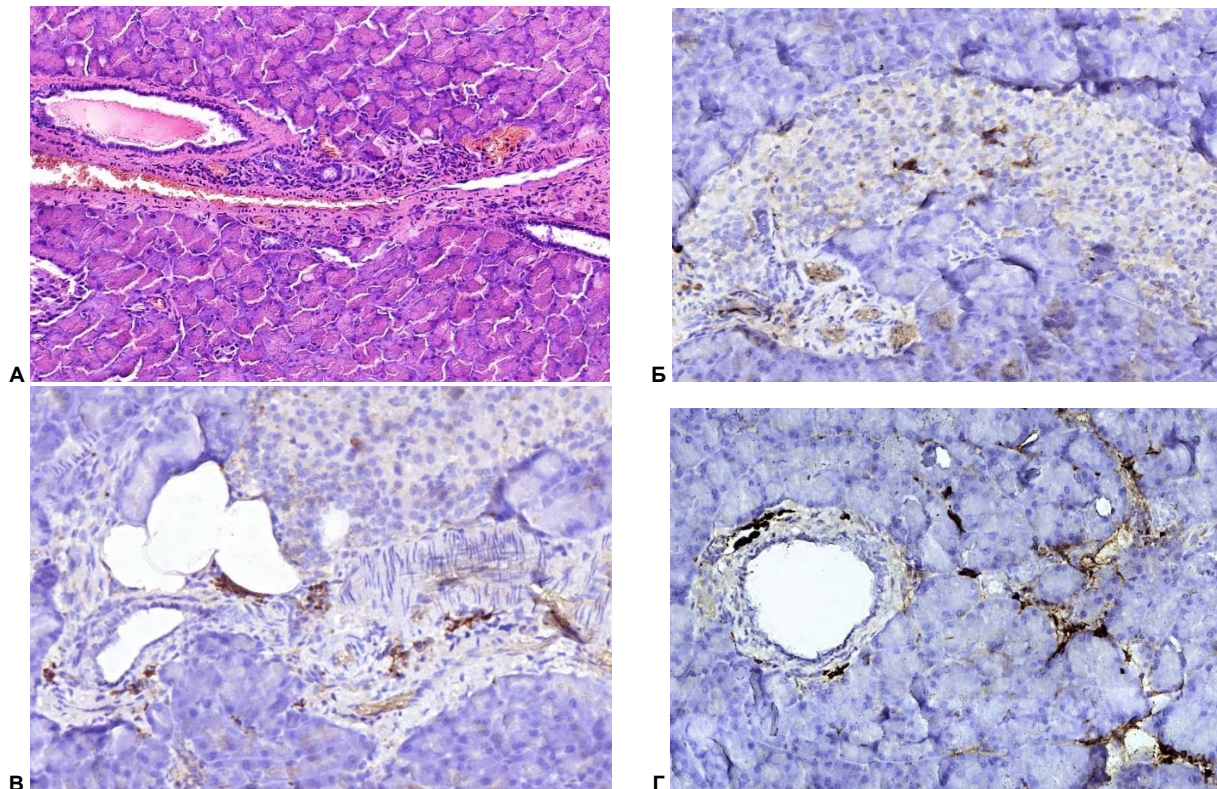


Рис. 3. Запальні зміни в підшлунковій залозі, асоційовані зі збільшенням кількості макрофагів за глутамат-індукованого ожиріння.

А – Лейкоцитарна інфільтрація міжчасточкових перегородок. Забарвлення гематоксиліном і еозиним.

Б–Г – макрофаги в межах острівців (Б), міжчасточкових перегородок (В) і навколо ацинусів (Г).
Імуногістохімічне дослідження до CD68. 36. 100

Виразність інфільтрації варіювала від слабкої до помірної. Проведення імуногістохімічного дослідження виявило значне збільшення кількості макрофагів в екзокринній частині ПЗ – в межах міжчасточкових перегородок і всередині часточок – в періацинарному просторі ($P < 0,001$). Крім того, макрофаги визначалися в межах ендокринних острівців ($2,8 \pm 0,3$ CD68-позитивних клі-

тин в межах одного острівця), хоча в контрольних тварин CD68-позитивних клітин не було виявлено в острівцях. Наявність CD68+ макрофагів у експериментальних тварин була асоційована з підвищенням експресії COX-2 і NF-kB. Експресія COX-2 виявлена у вигляді мозаїчної позитивної реакції в клітинах острівців (рис. 4).

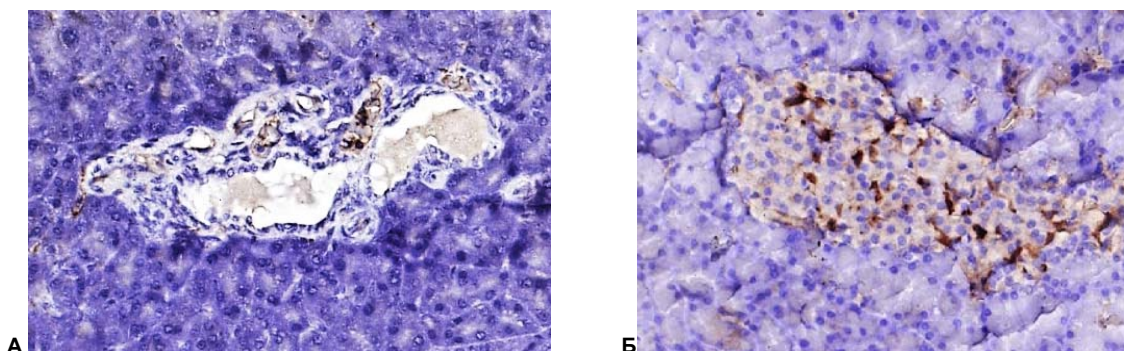


Рис. 4. Експресія COX-2 у міжчасточкових перегородках (А) й острівцях (Б) підшлункової залози за глутамат-індукованого ожиріння. Імуногістохімічне дослідження з використанням МАТ до COX2

В екзокринній частині також було помічено виражену позитивну реакцію на COX-2 і NF-kB, яка виявлена в периваскулярній зоні та в ділянках інфільтрації.

Таким чином, глутамат-індуковане ожиріння супроводжувалося розвитком гіперплазії інсулярного апарату ПЗ і запальними змінами в екзокринній частині залози. Останнє було обумовлено збільшенням кількості макрофагів з активацією експресії COX-2 і NF-kB.

Введення меланіну запобігало патологічним змінам в ПЗ. У межах екзокринної частини ПЗ виявлялися лише поодинокі макрофаги, ознаки значущої лейкоцитарної інфільтрації були відсутні. Ендокринні острівці мали розміри порівняно з такими в контрольній групі. Кількість ендокринних клітин в межах одного острівця була статистично значуще нижча за показник у тварин з глутамат-індукованим ожирінням ($P < 0,001$) і не відрізнялася від такої в контролі. Імуногістохімічне дослідження

дозволило виявити лише поодинокі макрофаги в межах ендо- та екзокринної частини ПЗ, у яких визначалася слабка експресія COX-2.

Таким чином, введення меланіну запобігало порушенню морфогенезу ПЗ у тварин з глутамат-індукованим ожирінням.

Висновки:

1. Введення глутамату натрію викликає розвиток ожиріння зі збільшенням обсягу вісцерального жиру, зростанням кількості в ньому прозапальних макрофагів та підвищенням експресії NF- κ B і TNF α .

2. Під час глутамат-індукованого ожиріння в підшлунковій залозі відбувається гіперплазія інсулярного апарату, асоційована з макрофагальною інфільтрацією і підвищенням експресії COX-2.

3. В екзокринній частині підшлункової залози при MSG-індукованому ожирінні помічено розвиток лейкоцитарної інфільтрації зі збільшенням кількості макрофагів у міжчасточкових перегородках і навколо ацинусів, що супроводжувалося підвищенням активності COX-2 і NF- κ B.

4. Введення меланіну запобігало порушенню морфогенезу підшлункової залози у тварин з глутамат-індукованим ожирінням, нівелюючи активацію прозапальних сигнальних шляхів.

Список використаних джерел:

- Transient cytokine treatment induces acinar cell reprogramming and regenerates functional beta cell mass in diabetic mice / L. Baeyens, M. Lemper, G. Leuckx et al. // *Nat Biotechnol.* – 2014. – Vol. 32(1). – P. 76–83.
- (Re)generating Human Beta Cells: Status, Pitfalls, and Perspectives / L. Baeyens, M. Lemper, W. Staels et al. // *Physiol Rev.* – 2018. – Jul 1. – Vol. 98(3). – P. 1143–1167. doi: 10.1152/physrev.00034.2016
- The islet-acinar axis of the pancreas: more than just insulin / S. G. Barreto, C. J. Carati, J. Toouli et al. // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* – 2010. – Vol. 299(1). – P. 10–G22.
- Effects of polyphenol compounds melanin on NAFLD/NASH prevention. / N. Belemets, N. Kobylak, O. Virchenko et al. // *Biomed Pharmacother.* – 2017. – Vol. 88. – P. 267–276. doi: 10.1016/j.biopha.2017.01.028.
- Regulation of pancreatic β -cell function and mass dynamics by prostaglandin signaling / B. A. Carboneau, R. M. Breyer, M. Gannon // *J Cell Commun Signal.* – 2017. – Vol. 11(2). – P. 105–116. doi: 10.1007/s12079-017-0377-7.
- Inflammation in obesity and diabetes: islet dysfunction and therapeutic opportunity / M. Y. Donath, E. Dalmás, N. S. Sauter et al. // *Cell Metab.* – 2013. – Vol. 17(6). – P. 860–872.
- Eguchi K. Macrophages and islet inflammation in type 2 diabetes / K. Eguchi, I. Manabe // *Diabetes Obes Metab.* – 2013. – Vol. 15 (s3). – P. 152–158.
- Inflammation, autophagy, and obesity: Common features in the pathogenesis of pancreatitis and pancreatic cancer / I. Gukovsky, N. Li, J. Todoric et al. // *Gastroenterology.* – 2013. – Vol. 144(6). – P. 1199–1209.
- Gumbs A. A. Obesity, pancreatitis, and pancreatic cancer / A. A. Gumbs // *Obes Surg.* – 2008. – 18(9). P. 1183–1187.
- Islet inflammation and fibrosis in a spontaneous model of type 2 diabetes, the GK rat. / F. Homo-Delarche, S. Calderari, J. C. Irminger et al. // *Diabetes.* – Vol. 2006. – Vol. 55(6). – P. 1625–1633.
- Probiotics Supplemented with Omega-3 Fatty Acids are More Effective for Hepatic Steatosis Reduction in an Animal Model of Obesity / N. Kobylak, T. Falalyeyeva, P. Bodnar, T. V. Beregovaya // *Probiotics & Antimicro. Prot.* – 2016. – P. 1–8. doi:10.1007/s12602-016-9230-1.
- Comparative experimental investigation on the efficacy of mono- and multiprobiotic strains in non-alcoholic fatty liver disease prevention / N. Kobylak, T. Falalyeyeva, O. Virchenko et al. // *BMC Gastroenterology.* – 2016. – Vol. 16, Issue 1, № 34. – 9 p.
- Pancreatic fat accumulation, fibrosis, and acinar cell injury in the Zucker diabetic fatty rat fed a chronic high-fat diet / A. Matsuda, N. Makino, T. Tozawa et al. // *Pancreas.* – 2014. – Vol. 43(5). – P. 735–743.
- Age-associated changes of islet endocrine cells and the effects of body mass index in Japanese / H. Mizukami, K. Takahashi, W. Inaba et al. // *J Diabetes Investig.* – 2014. – Vol. 5(1). – P. 38–47.
- Morris D. L. Minireview: Emerging concepts in islet macrophage biology in type 2 diabetes / D. L. Morris // *Mol. Endocrinol.* – 2015. – Vol. 29(7). – P. 946–962.
- Lipotoxicity causes multisystem organ failure and exacerbates acute pancreatitis in obesity / S. Navina, C. Acharya, J. P. DeLany et al. // *SciTransl Med.* – 2011. – Vol. 3(107). – P. 107–110.
- Pancreatic beta-cell mass in European subjects with type 2 diabetes / J. Rahier, Y. Guiot, R. M. Goebbels et al. // *Diabetes Obes Metab.* – 2008. – Vol. 10 (Suppl. 4). – P. 32–42.

18. Alterations of Pancreatic Islet Structure, Metabolism and Gene Expression in Diet-Induced Obese C57BL/6J Mice [Electronic resource] / R. Roat, V. Rao, N. M. Doliba et al. // *PLoS ONE.* – 2014. – Vol. 9(2): e86815. – Access mode : <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086815>

19. Increased immune cell infiltration of the exocrine pancreas: A possible contribution to the pathogenesis of type 1 diabetes. / T. Rodriguez-Calvo, O. Ekwall, N. Amiran et al. // *Diabetes.* – 2014. – Vol. 63(11). – P. 3880–3890.

20. Beta-cell mass and turnover in humans: Effects of obesity and aging / Y. Saisho, A. E. Butler, E. Manesso et al. // *Diabetes Care.* – 2013. – Vol. 36(1). – P. 111–117.

21. Saisho Y. Pancreas Volume and Fat Deposition in Diabetes and Normal Physiology: Consideration of the Interplay Between Endocrine and Exocrine Pancreas / Y. Saisho // *Rev. Diabet Stud.* – 2016. – Vol. 13(2-3). – P. 132–147. doi: 10.1900/RDS.2016.13.132

22. Saisho Y. Beta cell dysfunction: Its critical role in prevention and management of type 2 diabetes / Y. Saisho // *World J Diabetes.* – 2015. – Vol. 6(1). – P. 109–124.

23. Cyclooxygenase-2 is overexpressed in chronic pancreatitis. / W. Schlosser, S. Schlosser, M. Ramadani et al. // *Pancreas.* – 2002. – № 25. – P. 26–30

24. Sulaieva O. Sex differences in metabolic control and obesity. / O. N. Sulaieva, N. I. Belemets // *World of Medicine and Biology.* – 2017. – № 13 (61). – P. 185–189

25. Secretory function of white adipose tissue and adipokines: biological effects and clinical significance / O. Sulaieva, Y. Chereshneva, N. Kartashkina et al. // *Georgian Med News.* – 2018. – Jan.(274). P. 116–124.

26. Short-term high-fat feeding induces islet macrophage infiltration and β -cell replication independently of insulin resistance in mice / D. C. Woodland, L. Wei, L. Jacky et al. // *Am J Physiol Endocrinol Metab.* – 2016. – Vol. 311(4). – E763–E771. doi: 10.1152/ajpendo.00092.2016

27. Xavier G. S. X. The Cells of the Islets of Langerhans / G. S. X. Xavier // *J Clin Med.* – 2018. – Vol. 7(3). – P. 54. doi: 10.3390/jcm7030054

28. Beta cells can be generated from endogenous progenitors in injured adult mouse pancreas / X. Xu, J. D'Hoker, G. Stange et al. // *Cell.* – 2008. – Vol. 132(2). – P. 197–207.

29. Yang W. Genetic Epidemiology of Obesity / W. Yang, T. Kelly, J. He // *Epidemiol Rev.* – 2007. – Vol. 29 (1). – P. 49–61.

30. Selective beta-cell loss and alpha-cell expansion in patients with type 2 diabetes mellitus in Korea / K. H. Yoon, S. H. Ko, J. H. Cho et al. // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2003. – Vol. 88(5). – P. 2300–2308.

References:

- Baeyens L., Lemper M., Leuckx G. [et al.] Transient cytokine treatment induces acinar cell reprogramming and regenerates functional beta cell mass in diabetic mice // *Nat Biotechnol.* – 2014. – Vol. 32(1). – P. 76–83.
- Baeyens L., Baeyens L., Lemper M., Staels W. [et al.] (Re)generating Human Beta Cells: Status, Pitfalls, and Perspectives // *Physiol Rev.* – 2018. – Jul 1. – Vol. 98(3). – P. 1143–1167. doi: 10.1152/physrev.00034.2016
- Barreto S., Carati C., Toouli J. [et al.] The islet-acinar axis of the pancreas: more than just insulin // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* – 2010. – Vol. 299(1). – G10–G22.
- Belemets N., Kobylak N., Virchenko O. [et al.] Effects of polyphenol compounds melanin on NAFLD/NASH prevention. // *Biomed Pharmacother.* – 2017. – Vol. 88. – P. 267–276. doi: 10.1016/j.biopha.2017.01.028.
- Carboneau B., Breyer R., Gannon M. Regulation of pancreatic β -cell function and mass dynamics by prostaglandin signaling // *J Cell Commun Signal.* – 2017. – Vol. 11(2): 105–116. Published online 2017 Jan 28. doi: 10.1007/s12079-017-0377-7.
- Donath M., Dalmás E., Sauter N. [et al.] Inflammation in obesity and diabetes: islet dysfunction and therapeutic opportunity // *Cell Metab.* – 2013. – Vol. 17(6). – P. 860–872.
- Eguchi K., Manabe I. Macrophages and islet inflammation in type 2 diabetes // *Diabetes Obes Metab.* – 2013. – Vol. 15 (s3). – P. 152–158.
- Gukovsky I., Li J. [et al.] Todoric Inflammation, autophagy, and obesity: Common features in the pathogenesis of pancreatitis and pancreatic cancer // *Gastroenterology.* – 2013. – Vol. 144(6). – P. 1199–1209.
- Gumbs A. Obesity, pancreatitis, and pancreatic cancer. *Obes Surg.* 2008;18(9):1183–1187.
- Homo-Delarche F., Calderari S., Irminger J. [et al.] Islet inflammation and fibrosis in a spontaneous model of type 2 diabetes, the GK rat. // *Diabetes.* – Vol. 2006. – Vol. 55(6). – P. 1625–1633.
- Kobylak N., Falalyeyeva T., Bodnar P., Beregovaya T. Probiotics Supplemented with Omega-3 Fatty Acids are More Effective for Hepatic Steatosis Reduction in an Animal Model of Obesity // *Probiotics & Antimicro. Prot.* – 2016. – P. 1–8. doi:10.1007/s12602-016-9230-1.
- Kobylak N., Falalyeyeva T., Virchenko O. [et al.] Comparative experimental investigation on the efficacy of mono- and multiprobiotic strains in non-alcoholic fatty liver disease prevention // *BMC Gastroenterology.* – 2016. – Vol. 16, Issue 1, № 34. – 9 p.
- Matsuda A., Makino N., Tozawa T. [et al.] Pancreatic fat accumulation, fibrosis, and acinar cell injury in the Zucker diabetic fatty rat fed a chronic high-fat diet // *Pancreas.* – 2014. – Vol. 43(5). – P. 735–743.
- Mizukami H., Takahashi K., Inaba W. [et al.] Age-associated changes of islet endocrine cells and the effects of body mass index in Japanese // *J Diabetes Investig.* – 2014. – Vol. 5(1). – P. 38–47.
- Morris D. Minireview: Emerging concepts in islet macrophage biology in type 2 diabetes // *Mol. Endocrinol.* – 2015. – Vol. 29(7). – P. 946–962.

16. Navina S., Acharya C., DeLany J. [et al.] Lipotoxicity causes multi-system organ failure and exacerbates acute pancreatitis in obesity // *Sci Transl Med.* – 2011. – Vol. 3(107). – P. 107–110.
 17. Rahier J., Guiot Y., Goebbels R. [et al.] Pancreatic beta-cell mass in European subjects with type 2 diabetes // *Diabetes Obes Metab.* – 2008. – Vol. 10 (Suppl 4). – P. 32–42.
 18. Roat R., Rao V., Doliba N. [et al.] Alterations of Pancreatic Islet Structure, Metabolism and Gene Expression in Diet-Induced Obese C57BL/6J Mice // *PLoS ONE.* – 2014. – Vol. 9(2): e86815. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086815>
 19. Rodriguez-Calvo T., Ekwall O., Amiran N. [et al.] Increased immune cell infiltration of the exocrine pancreas: A possible contribution to the pathogenesis of type 1 diabetes. // *Diabetes.* – 2014. – Vol. 63(11). – P. 3880–3890.
 20. Saisho Y., Butler A., Manesso E. [et al.] Beta-cell mass and turnover in humans: Effects of obesity and aging // *Diabetes Care.* – 2013. – Vol. 36(1). – P. 111–117.
 21. Saisho Y. Pancreas Volume and Fat Deposition in Diabetes and Normal Physiology: Consideration of the Interplay Between Endocrine and Exocrine Pancreas // *Rev Diabet Stud.* – 2016. – Vol. 13(2-3). – P. 132–147. doi: 10.1900/RDS.2016.13.132
 22. Saisho Y. Beta cell dysfunction: Its critical role in prevention and management of type 2 diabetes / Y. Saisho // *World J Diabetes.* – 2015. – Vol. 6(1). – P. 109–124.
 23. Schlosser W., Schlosser S., Ramadani M. [et al.] Cyclooxygenase-2 is overexpressed in chronic pancreatitis. // *Pancreas*, 25 (2002), pp. 26–30
 24. Sulaieva O., Belemets N. Sex differences in metabolic control and obesity. // *World of Medicine and Biology* 13 (61), 185–189
 25. Sulaieva O., Cheresheva Y., Kartashkina N. [et al.] Secretory function of white adipose tissue and adipokines: biological effects and clinical significance. // *Georgian Med News.* 2018 Jan;(274):116–124.
 26. Woodland D., Wei L., Jacky L. [et al.] Short-term high-fat feeding induces islet macrophage infiltration and β -cell replication independently of insulin resistance in mice // *Am J Physiol Endocrinol Metab.* – 2016. – Vol. 311(4). – E763–E771. doi: 10.1152/ajpendo.00092.2016
 27. Xavier G. The Cells of the Islets of Langerhans // *J Clin Med.* – 2018. – Vol. 7(3). P. 54. Published online 2018 Mar 12. doi: 10.3390/jcm7030054
 28. Xu X., D'Hoker J., Stange G. [et al.] Beta cells can be generated from endogenous progenitors in injured adult mouse pancreas // *Cell.* – 2008. – Vol. 132(2). – P. 197–207.
 29. Yang W., Kelly T., He J. Genetic Epidemiology of Obesity // *Epidemiol Rev.* – 2007. – Vol. 29 (1). – P. 49–61.
 30. Yoon K., Ko S., Cho J. [et al.] Selective beta-cell loss and alpha-cell expansion in patients with type 2 diabetes mellitus in Korea // *J. Clin Endocrinol Metab.* – 2003. – Vol. 88(5). – P. 2300–2308.
- Надійшла до редколегії 14.09.2018
Отримано виправлений варіант 15.10.2018
Підписано до друку 15.10.2018
- Received in the editorial 14.09.2018
Received a revised version on 15.10.2018
Signed in the press on 15.10.2018

Н. Белемєць, асп., Т. Фалалеева, д-р биол. наук,
Т. Береговая, д-р биол. наук, Л. Остапченко, д-р биол. наук
УНЦ "Институт биологии и медицины",
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина,
Н. Кобыляк, канд. мед. наук, Е. Курик, д-р мед. наук
Национальный медицинский университет имени А. А. Богомольца, Киев, Украина,
О. Сулаева, д-р мед. наук
Патоморфологическая лаборатория "CSD Health Care", Киев, Украина

МОРФОГЕНЕЗ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В УСЛОВИЯХ ГЛУТАМАТ-ИНДУЦИРОВАННОГО ОЖИРЕНИЯ: МЕХАНИЗМЫ КОРРЕКТИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ МЕЛАНИНА

*Исследован морфогенез поджелудочной железы у крыс в условиях глутамат-индуцированного ожирения и оценке эффектов меланина при данных условиях. Исследования проведены на 45 новорожденных крыс самца линии Wistar, разделенных на 3 группы по 15 животных в каждой. 1 группа – новорожденным крысам интактной группы подкожно в объеме 8 мкл/г вводили физиологический раствор на 2–10-й день жизни. 2 группа – новорожденным крысам подкожно в объеме 8 мкл/г вводили глутамат натрия (ГН) (4 мг/г) соответственно на 2–10-й день жизни. 3 группа – крысы получали меланин (1 мг/кг), растворенный в воде (0,25 мл/100 г) (внутрижелудочно (в/ж)). Группа ГН соответственно получала 2,5 мл/кг воды (в/ж). Меланин был получен из дрожжеподобных штаммов *Nadsoniellanigra* X1 с Украинской антарктической станции. Введение меланина начинали через 4 недели после рождения и продолжали недельными курсами с перерывами в 2 недели. В течение 4 месяцев после рождения крысы находились на обычном пищевом рационе. 4-месячных животных декапитировали, собирали поджелудочную железу для гистологического и иммуногистохимического исследования. Поджелудочную железу фиксировали в 10 % формалине, обезжировали и заливали парафиновым воском. Парафиновые участки 5 мкм были разрезаны и окрашены гематоксилином и эозином. Поскольку воспаление является одним из ведущих механизмов поражения поджелудочной железы при ожирении, провоспалительные клетки поджелудочной анализировали иммуногистохимической оценкой клеток CD68, экспрессией NF- κ B и TNF- α .*

Введение глутамата натрия вызвало развитие ожирения с увеличением объема висцерального жира, ростом количества в нем провоспалительных макрофагов и повышением экспрессии NF- κ B и TNF α . В поджелудочной железе наблюдалась гиперплазия инсулярного аппарата, ассоциированная с макрофагальной инфильтрацией и повышением экспрессии COX-2. Введение меланина предотвращало нарушения морфогенеза поджелудочной железы у животных с глутамат-индуцированным ожирением, нивелируя активацию провоспалительных сигнальных путей.

Ключевые слова: глутамат натрия, ожирение, клетки CD68, экспрессия NF- κ B и TNF- α , меланин.

N. Belemets, PhD-stud., T. Falalyeyeva, DSc, T. Beregova, DSc, L. Ostapchenko, DSc
ESC "Institute of Biology and Medicine", Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine,
N. Kobylak, PhD, O. Kuryk, DSc
Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine,
O. Sulaieva, DSc
Laboratory of Pathology "CSD Health Care", Kyiv, Ukraine

MORPHOGENESIS OF PANCREAS UNDER THE CONDITIONS OF GLUTAMAT-INDUCED OBESITY: MECHANISMS OF CORRECTION ACTION OF MELANIN

*The aim of work was to study the morphogenesis of pancreas in rats with glutamate-induced obesity and to evaluate the effects of melanin under these conditions. We included 45 newborn Wistar male rats, divided into 3 groups of 15 animals each. 1 group – newborns rats of intact group were administered with saline subcutaneously (s.c.) in the volume of 8 μ l/g at 2–10th postnatal days. 2 group – newborns rats of MSG-group received a solution of MSG (4,0 mg/g of body weight) s.c. at 2–10th postnatal days. 3 group – rats received aqueous solution of melanin in dose 1 mg/kg at volume 2,5 ml/kg per os (p.o.). Melanin was obtained from yeast-like fungi *Nadsoniellanigra* X1 strain from Ukrainian Antarctic station. Melanin administration was started at the age of 4 weeks just after wean and continued for 3 months intermittently alternating two-week course of introduction with two-week course of break. Within 4 months after birth, rats had a normal diet. Pancreas tissue was fixed in 10 % formalin, dehydrated and imbedded in paraffin wax. Paraffin sections of 5 μ m were cut and stained with hematoxylin and eosin. As low-grade inflammation is one of the leading mechanisms of pancreas lesion in obesity, the proinflammatory activation of pancreas cells was analyzed by immunohistochemical assessment of CD68 cells, NF- κ B and TNF- α expression.*

The injection of glutamate sodium causes the development of obesity with an increase in the amount of visceral fat, an increase in the number of proinflammatory macrophages in it and an increase in the expression of NF- κ B and TNF α . In the pancreas, there is a hyperplasia of the insular apparatus, associated with macrophage infiltration and an increase in the expression of COX-2. The introduction of melanin prevented the morphogenesis of the pancreas in animals from glutamate-induced obesity, leveling the activation of proinflammatory signaling paths.

Key words: monosodium glutamate, obesity, CD68 cells, NF- κ B and TNF- α expression, melanin.

УДК 616.72-002: 577.122.8

О. Блохіна, асп., О. Короткий, канд. біол. наук,
Л. Кот, канд. біол. наук, Д. Неграй, студ., К. Дворщенко, д-р біол. наук
ННЦ "Інститут біології та медицини",
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

ОКИСНА МОДИФІКАЦІЯ БІЛКІВ У СИРОВАТЦІ КРОВІ ЩУРІВ В УМОВАХ КАРРАГІНАН-ІНДУКОВАНОГО ЗАПАЛЕННЯ ЗАДНЬОЇ КІНЦІВКИ ТА ТРИВАЛОГО ПРОФІЛАКТИЧНОГО ВВЕДЕННЯ ХОНДРОЇТИНУ СУЛЬФАТУ

Досліджено профілактичну дію хондроїтину сульфату на вміст продуктів окисної модифікації білків та рівень сульфгідрильних груп у сироватці крові щурів у разі локального запалення задньої кінцівки.

Дослідження здійснено на білих нелінійних статевозрілих щурах-самцях масою 180–240 г із дотриманням загальних етичних принципів експериментів на тваринах. Усіх тварин поділяли на чотири експериментальні групи. Перша група – контроль: тваринам субплантарно вводили 0,1 мл 0,9 % розчину NaCl у задню праву кінцівку. Друга група – тваринам щоденно протягом 28 днів внутрішньом'язово вводили терапевтичну дозу 3 мг × кг⁻¹ хондроїтину сульфату. Третя група – тваринам щоденно протягом 28 днів внутрішньом'язово вводили 0,1 мл 0,9 % розчину NaCl у задню праву кінцівку та на 29-й день моделювали запальний набряк кінцівки (тваринам субплантарно вводили 0,1 мл 1 % розчину каррагінану у задню праву кінцівку). Четверта група – щурам щоденно протягом 28 днів внутрішньом'язово вводили терапевтичну дозу 3 мг × кг⁻¹ хондроїтину сульфату, після чого на 29-й день моделювали запальний набряк кінцівки. Тварин умертвляли через 3 години після ін'єкції розчину каррагінану згідно з протоколом етичного комітету, після чого швидко робили забір крові для подальших досліджень. Загальна кількість тварин, залучених до експериментальних досліджень, становила 40 особин. Вміст продуктів окисної модифікації білків (ОМБ) та олігопептидів визначали за рівнем карбонільних похідних, які виявляються в реакції з 2,4-динітрофенілгідрaziном. Рівень загальних, білок-зв'язаних та небілкових сульфгідрильних (SH)-груп вимірювали за методом Елмана.

Виявлено, що за каррагінан-індукованого запалення задньої кінцівки в сироватці крові зростає вміст продуктів окисної модифікації білків та знижується вміст сульфгідрильних груп. Показано, що після профілактичного введення препарату на основі хондроїтину сульфату тваринам з каррагінан-індукованим запаленням вищевказані показники відновлювались.

Ключові слова: гостре запалення кінцівки, хондроїтину сульфат, окисна модифікація білків, сироватка крові.

Вступ. На сьогодні захворювання опорно-рухового апарату є актуальною проблемою медицини, а їх профілактика та лікування має першочергове значення для збереження дієздатності населення. Серед них важливе місце посідають хвороби суглобів (артрози, артрити), формування яких супроводжується розвитком запалення [1]. Важливу роль у розвитку та прогресуванні запалення у суглобах відіграє оксидативний стрес, який виникає внаслідок постійної генерації вільних радикалів активованими фагоцитами та за рахунок гіпоксичних процесів під час роботи суглобів, що призводить до пошкодження синовіальних клітин, деструкції хрящової тканини, ерозії кісток та суглобових поверхонь. Крім того, у разі надмірного утворення вільних радикалів спостерігається виснаження всіх ланок антиоксидантного захисту, що також сприяє формуванню пошкоджень тканин суглобового апарату [2].

Оскільки захворювання опорно-рухового апарату, зокрема суглобів, мають прогресуючий характер, необхідно своєчасно приймати міри для того, щоб зупинити або пригальмувати розвиток патологічних змін у організмі. Важливим є здійснення ефективної профілактики цих захворювань, особливо, якщо є генетична схильність до розвитку хвороб суглобів, у разі професійної ймовірності перевантаження опорно-рухового апарату, а також у людей похилого віку.

У зв'язку з цим важливим питанням є пошук засобів для відновлення суглобів. На сьогодні виявлено, що дистрофічні зміни хрящової тканини пов'язані зі зниженням вмісту хондроїтину сульфату, який є природним компонентом міжклітинної речовини хряща поряд з гіалуроновою кислотою та глюкозаміном сульфатом. Хондроїтину сульфат являє собою сульфатований протеоглікан, у якому сульфат ковалентно приєднаний до молекули хондроїтину. Він підтримує пружність та щільність хряща [3]. Тому дослідження препаратів, основу яких становить хондроїтин сульфат, є перспективним у профілактиці та лікуванні захворювань суглобів. У наших експериментах було досліджено препарат "Драстоп", основною складовою частиною якого є хондроїтину сульфат.

Метою роботи було дослідити профілактичну дію хондроїтину сульфату на вміст продуктів окисної модифікації білків та рівень сульфгідрильних груп у сироватці крові щурів під час гострого локального запалення задньої кінцівки.

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

Усіх тварин поділяли на чотири експериментальні групи. Перша група – контроль: тваринам субплантарно вводили 0,1 мл 0,9 % розчину NaCl у задню праву кінцівку. Друга група – тваринам щоденно протягом 28 днів внутрішньом'язово вводили терапевтичну дозу 3 мг × кг⁻¹ хондроїтину сульфату. Третя група – тваринам щоденно протягом 28 днів внутрішньом'язово вводили 0,1 мл 0,9 % розчину NaCl у задню праву кінцівку та на 29 день моделювали запальний набряк кінцівки: тваринам субплантарно вводили 0,1 мл 1 % розчин каррагінану у задню праву кінцівку [4]. Четверта група – тваринам щоденно протягом 28 днів внутрішньом'язово вводили терапевтичну дозу 3 мг × кг⁻¹ хондроїтину сульфату, після чого щурам субплантарно вводили 0,1 мл 1 % розчину каррагінану в задню праву кінцівку. Тварин умертвляли через 3 години після ін'єкції розчину каррагінану згідно з протоколом етичного комітету, після чого швидко робили забір крові для подальших досліджень. Загальна кількість тварин, залучених до експериментальних досліджень, становила 40 особин.

Вміст продуктів окисної модифікації білків (ОМБ) та олігопептидів визначали за рівнем карбонільних похідних, які виявляються в реакції з 2,4-динітрофенілгідрaziном [5]. Рівень загальних, білок-зв'язаних та небілкових сульфгідрильних (SH)-груп вимірювали за методом Елмана [6]. Статистичну обробку результа-

тів дослідження робили загальноприйнятими методами варіаційної статистики [7].

Результати та їх обговорення. Раннім та надійним індикатором розвитку окисного стресу в організмі є окисне пошкодження білків [8, 9]. Індукторами продукції окисно-модифікованих білків виступають активні форми кисню, збільшення вільного заліза, продукти переокисного окиснення ліпідів на фоні зниження роботи антиоксидантної системи. Вільні радикали атакують білки по всій довжині поліпептидного ланцюга, порушуючи не тільки первинну, але і вторинну та третинну їх структуру, що призводить до агрегації або фрагментації білкової молекули. Інтенсивність окисної модифікації білків визначається особливостями їх амінокислотного складу. Акцепторними групами, що здатні перехоплювати електрони, взаємодіючи з активними формами кисню та утворювати аніон-радикали, можуть бути дисульфідні, сульфгідрильні, карбонільні, карбоксильні та аміногрупи білків. Утворення та накопичення таких модифікованих

білків порушує нормальне функціонування організму як на клітинному рівні, так і на системному, що призводить до розвитку різних патологічних станів та формуванню захворювань [10].

У ході експериментальних досліджень виявлено, що в шурів у разі запалення задньої кінцівки, індукованому каррагінаном, у сироватці крові вміст окисно-модифікованих білків зростає (табл. 1). Зокрема, збільшується рівень нейтральних альдегідних продуктів (макс. абсорбції за 356 нм) – у 2,1 раза та нейтральних кетонних продуктів ($E_{\text{max}} = 370$ нм) відповідно – в 1,8 раза порівняно з контролем. За тих самих умов експерименту в сироватці крові кількість основних альдегідних продуктів (максимум поглинання при 430 нм) збільшується в 1,6 раза щодо контрольної групи тварин, при цьому вміст основних кетонних продуктів ($E_{\text{max}} = 530$ нм) зростає в 1,3 раза порівняно з показниками контрольної групи тварин (табл. 1).

Таблиця 1. Вміст продуктів окисної модифікації білків у сироватці крові шурів в умовах каррагінан-індукованого запалення та тривалого профілактичного введення хондроїтину сульфату, ум. од. $\times$ мг білка⁻¹ ($M \pm m$, $n = 10$)

Групи тварин	Показник	Продукти нейтрального характеру		Продукти основного характеру	
		356 нм, альдопохідні	370 нм, кетопохідні	430 нм, альдопохідні	530 нм, кетопохідні
Контроль		0,145 $\pm$ 0,014	0,109 $\pm$ 0,011	0,085 $\pm$ 0,008	0,039 $\pm$ 0,004
Хондроїтин сульфат		0,133 $\pm$ 0,013	0,115 $\pm$ 0,012	0,091 $\pm$ 0,009	0,042 $\pm$ 0,004
Каррагінан		0,302 $\pm$ 0,029*	0,198 $\pm$ 0,017*	0,134 $\pm$ 0,012*	0,052 $\pm$ 0,005
Каррагінан + хондроїтин сульфат		0,191 $\pm$ 0,018#	0,134 $\pm$ 0,013#	0,101 $\pm$ 0,009#	0,044 $\pm$ 0,004#

* – $p < 0,05$ стосовно контролю; # – $p < 0,05$ стосовно групи тварин, яким вводили каррагінан

Після введення препарату на основі хондроїтину сульфату шурам з експериментальною моделлю локального запалення в сироватці крові спостерігається зниження ступеню окиснення білків (табл. 1). Виявлено зниження вмісту нейтральних альдегідних продуктів – у 1,6 раза, нейтральних кетонних продуктів – в 1,5 раза, основних альдегідних продуктів – у 1,3 раза та основних кетонних продуктів – у 1,2 раза порівняно з групою тварин з експериментальною моделлю гострого локального запалення. Показано, що хондропротектор не впливає на рівень досліджуваних показників ОМБ у сироватці крові контрольної групи тварин.

Показником білкової модифікації є окиснення їхніх сульфгідрильних груп, яке може відбуватись як прямим,

так і ферментативним шляхом за участю ферменту глутатіонпероксидази та гідроперекисей ліпідів [11]. Насамперед окисненню піддаються саме сульфгідрильні групи білків, що оберігає від окиснення інші функціональні групи та молекули.

Виявлено, що за умов гострого запалення у сироватці крові шурів вміст сульфгідрильних груп знижується: небілкових SH-груп – у 1,6 раза, білкових та загальних SH-груп – у 1,8 раза стосовно контролю (табл. 2). Виявлене зниження вмісту сульфгідрильних груп у сироватці крові шурів за умов гострого запалення, індукованого каррагінаном, свідчить про накопичення ковалентних зв'язків за участю цистеїну та метіоніну, а також про окиснення SH-груп.

Таблиця 2. Вміст сульфгідрильних (SH-) груп у сироватці крові шурів в умовах каррагінан-індукованого запалення та тривалого профілактичного введення хондроїтину сульфату, мкмоль $\times$ мг білка⁻¹ ($M \pm m$, $n = 10$)

Групи тварин	Показник	небілкові SH-групи	білкові SH-групи	загальні SH-групи
Контроль		0,26 $\pm$ 0,02	4,38 $\pm$ 0,43	4,64 $\pm$ 0,45
Хондроїтин сульфат		0,23 $\pm$ 0,02	4,29 $\pm$ 0,41	4,52 $\pm$ 0,43
Каррагінан		0,17 $\pm$ 0,01*	2,45 $\pm$ 0,21*	2,62 $\pm$ 0,25*
Каррагінан + хондроїтин сульфат		0,19 $\pm$ 0,02*	3,62 $\pm$ 0,34#	3,81 $\pm$ 0,35#

* – $p < 0,05$ стосовно контролю; # – $p < 0,05$ щодо групи тварин, яким вводили каррагінан

У разі тривалого профілактичного введення хондроїтину сульфату тваринам з каррагінан-індукованим запаленням у сироватці крові рівень білкових та загальних сульфгідрильних груп зростає в 1,5 раза порівняно з групою шурів, яким вводили лише каррагінан. За цих експериментальних умов вміст небілкових тіолових груп залишається на рівні групи шурів із гострим запаленням задньої кінцівки (табл. 2).

Аналізуючи отримані нами результати та літературні дані, було виявлено, що в під час гострого запалення

задньої кінцівки в сироватці крові шурів зростає рівень вільних радикалів, що призводить до порушення нативної конформації білків з утворенням білкових агрегатів або фрагментів білкової молекули. Утворення карбонільних похідних білків може відбуватись декількома шляхами. По-перше, за участю залишків проліну, аргініну, лізіну, треоніну з утворенням аддуктів Міхаеля, при цьому карбонілювання аргініну та лізіну супроводжується втратою одного або декількох атомів азоту. По-друге, карбонільні похідні білків можуть формувати-

ся за участю амінокислотних залишків лізину, цистеїну та гістидину є продуктами перекисного окиснення ліпідів. Карбонільні групи білків, які утворились внаслідок перетворення карбоксильних груп під дією вільних радикалів, можуть взаємодіяти з аміногрупами, утворюючи шиффові основи, які є баластом для клітин, що дестабілізує мембрани та сприяє деструкції клітин [12].

Виявлене нами зниження сульфгідрильних груп пов'язане з виснаженням рівня небілкових низькомолекулярних тіолів (цистеїну, глутатіону, дигідролипоевої кислоти та ін.) та порушенням нативної структури і пригніченням каталітичної активності тіолових ферментів за рахунок блокування їх сульфгідрильних груп (глутатіонпероксидази, глутатіонтрансферази, глутатіонредуктази, АТФази, дегідрогенази). Крім того, зменшення рівня тіолових груп може порушувати процеси транспорту та пасивної проникності іонів крізь мембрану, а в крові зміна нативного стану тіолових груп може призвести до порушення функціонування гемоглобіну [13].

Отже, окисна модифікація викликає порушення структурної організації білків, їх агрегацію та денатурацію, зміни заряду білкової молекули, її чутливості до протеолізу, що може призвести до трансформації або втрати функціональної активності протеїнів (каталітичної, регуляторної, транспортної, рецепторної та ін.). Наслідком цих змін буде порушення стану клітинних мембран (проникності, адгезивних властивостей тощо), зміни активності ферментів, клітинної проліферації тощо. Крім того, утворений пул модифікованих білків робить їх більш чутливими до протеолізу, що сприяє подальшій інтенсифікації деструктивних процесів. Окиснені білки здатні виступати джерелами вільних радикалів, виснажувати запаси клітинних антиоксидантів (глутатіон, аскорбінова кислота). У молекулярних механізмах вільнорадикальних процесів окисна модифікація білків може спричинити деструкцію інших молекул (ліпіди, ДНК) клітини, що сприятиме розвитку та прогресуванню захворювань [14, 15]. Відповідно, окиснені білки є не тільки показниками ступеня вільнорадикального пошкодження клітини, але і його активними співучасниками.

Виявлене зниження утворення окиснених білкових молекул у сироватці крові в разі профілактичного тривалого введення хондроїтину сульфату щурам під час локального запалення пов'язане з антизапальними, антирадикальними та регенераційними властивостями. Хондроїтин сульфат є одним з основних компонентів екстрацелюлярного матрикса хряща та є складовою протеогліканових комплексів основної речовини хрящової тканини. Він володіє вираженою гідрофільністю за рахунок наявності карбоксильної та сульфатної груп, що сприяє нормальному функціонуванню хряща та збереженню його еластичності. Хондроїтин сульфат активує анаболічні процеси за рахунок стимуляції синтезу протеогліканів і колагену, а також пригнічує синтез ферментів деструкції хряща (металопротеїнази 3, 9, 13, 14; катепсину-бета, лейкоцитарної еластази) [16].

Висновки. Виявлено, що за умов локального запалення задньої кінцівки, індукованого введенням каррагінану, у сироватці крові зростає рівень окисно-модифікованих білків та знижується вміст сульфгідрильних груп, що свідчить про загальний зсув редокс-балансу крові у прооксидантний бік. Тривале профілактичне введення хондроїтину сульфату щурам з експериментальною моделлю локального запалення призводить до часткового зниження продукції окиснених білкових молекул у сироватці крові.

Список використаних джерел:

1. Man G. Osteoarthritis pathogenesis – a complex process that involves the entire joint [Electronic resource] / G. Man, G. Mologhianu // J. Med. Life. – 2014. – Vol. 7, № 1. – P. 37–41. – Access mode : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
2. Reactive oxygen species and NADPH oxidase 4 involvement in osteoarthritis [Electronic resource] / S. Drevet, G. Gavazzi, L. Grange et al. // Exp. Gerontol. – 2018. – Vol. 111. – P. 107–117. – Access mode : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
3. Chondroitin sulphate: a focus on osteoarthritis [Electronic resource] / M. Bishnoi, A. Jain, P. Hurkat, S. Jain // Glycoconj. J. – 2016. – Vol. 33, № 5. – P. 693–705. – Access mode : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
4. Morris C. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse [Electronic resource] / C. J. Morris // Methods Mol. Biol. – 2003. – Vol. 225. – P. 115–121. – Access mode : <http://link.springer.com/protocol/10.1385/1-59259-374-7%3A115>
5. Окислительные модификации белков сыворотки крови человека, метод ее определения [Электронный ресурс] / Е. Дубинина, С. Бурмистров, Д. Ходов, И. Порогов // Вопросы медицинской химии. – 1995. – № 1. – С. 24–26. – Режим доступа : <http://pbmc.ibmc.msk.ru/index.php/ru/article/PBMC-1995-41-1-24-ru>
6. Ellman G. Tissue sulfhydryl groups [Electronic resource] / G. Ellman // Arch. Biochem. Biophys. – 1959. – Vol. 82, № 1. – P. 70–77. – Access mode : <http://aufsi.auburn.edu/recommendedmethods/01B06.pdf>
7. Реброва О. Статистический анализ медицинских данных [Electronic resource] / О. Реброва. – М.: Информполиграф, 2002. – 305 с. – Access mode : <http://www.twirpx.com/file/1440496/>
8. Dahl J. Protein quality control under oxidative stress conditions [Electronic resource] / J. Dahl, M. Gray, U. Jakob // J. Mol. Biol. – 2015. – Vol. 427, № 7. – P. 1549–1563. – Access mode : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
9. Redox control of protein degradation [Electronic resource] / M. Pajares, N. Jiménez-Moreno, I. Dias et al. // Redox. Biol. – 2015. – Vol. 6. – P. 409–420. – Access mode : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
10. Breusing N. Biomarkers of protein oxidation from a chemical, biological and medical point of view [Electronic resource] / N. Breusing, T. Grune // Exp. Gerontol. – 2010. – Vol. 45, № 10. – P. 733–737. – Access mode : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
11. Vázquez-Torres A. Redox active thiol sensors of oxidative and nitrosative stress [Electronic resource] / A. Vázquez-Torres // Antioxid. Redox. Signal. – 2012. – Vol. 17, № 9. – P. 1201–1214. – Access mode : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
12. Lipoxidation adducts with peptides and proteins: deleterious modifications or signaling mechanisms? [Electronic resource] / R. Domingues, P. Domingues, T. Melo et al. // J. Proteomics. – 2013. – Vol. 92. – P. 110–131. – Access mode : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
13. Meyer A. Glutathione homeostasis and redox-regulation by sulfhydryl groups [Electronic resource] / A. Meyer, R. Hell // Photosynth. Res. – 2005. – Vol. 86. – P. 435–457. – Access mode : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
14. Davies M. Protein oxidation and peroxidation [Electronic resource] / M. Davies // Biochem. J. – 2016. – Vol. 473, № 7. – P. 805–825. – Access mode : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
15. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease [Electronic resource] / M. Valko, D. Leibfriz, J. Moncol et al. // Int. J. Biochem. Cell Biol. – 2007. – Vol. 39. – P. 44–84. – Access mode : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
16. Discrepancies in composition and biological effects of different formulations of chondroitin sulfate [Electronic resource] / J. Martel-Pelletier, A. Farran, E. Montell et al. // Molecules. – 2015. – Vol. 20, № 3. – P. 4277–4289. – Access mode : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

References:

1. Man G.S., Mologhianu G. Osteoarthritis pathogenesis – a complex process that involves the entire joint // J. Med. Life. – 2014. – Vol. 7, №1. – P. 37–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
2. Drevet S., Gavazzi G., Grange L. et al. Reactive oxygen species and NADPH oxidase 4 involvement in osteoarthritis // Exp. Gerontol. – 2018. – Vol. 111. – P. 107–117. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
3. Bishnoi M., Jain A., Hurkat P., Jain S.K. Chondroitin sulphate: a focus on osteoarthritis // Glycoconj. J. – 2016. – Vol. 33, №5. – P. 693–705. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
4. Morris C.J. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse // Methods Mol. Biol. – 2003. – Vol. 225. – P. 115–121. Available from: <http://link.springer.com/protocol/10.1385/1-59259-374-7%3A115>
5. Дубинина Е.Е., Бурмистров С.О., Ходов Д.А., Порогов И.Г. Окислительные модификации белков сыворотки крови человека, метод ее определения // Вопросы медицинской химии. – 1995. – № 1. – С. 24–26. Available from: <http://pbmc.ibmc.msk.ru/index.php/ru/article/PBMC-1995-41-1-24-ru>
6. Ellman G. Tissue sulfhydryl groups / G. Ellman // Arch. Biochem. Biophys. – 1959. – Vol. 82, №1. – P. 70–77. Available from: <http://aufsi.auburn.edu/recommendedmethods/01B06.pdf>
7. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. – М.: Информполиграф, 2002. – 305 с. Available from: <http://www.twirpx.com/file/1440496/>

8. Dahl J.U., Gray M.J., Jakob U. Protein quality control under oxidative stress conditions // J. Mol. Biol. 2015. – Vol. 427, №7. – P. 1549-1563. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

9. Pajares M., Jiménez-Moreno N., Dias I.H. et al. Redox control of protein degradation // Redox. Biol. – 2015. – Vol. 6. – P. 409-420. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

10. Breusing N., Grune T. Biomarkers of protein oxidation from a chemical, biological and medical point of view // Exp. Gerontol. – 2010. – Vol. 45, №10. – P. 733-737. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

11. Vázquez-Torres A. Redox active thiol sensors of oxidative and nitrosative stress // Antioxid. Redox. Signal. – 2012. – Vol. 17, №9. – P. 1201-1214. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

12. Domingues R.M., Domingues P., Melo T. et al. Lipoxidation adducts with peptides and proteins: deleterious modifications or signaling mechanisms? // J. Proteomics. – 2013. – Vol. 92. – P. 110-131. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

13. Meyer A. Glutathione homeostasis and redox-regulation by sulfhydryl groups / A. Meyer, R. Hell // Photosynth. Res. – 2005. – Vol. 86. – P. 435-457. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

14. Davies M.J. Protein oxidation and peroxidation // Biochem. J. – 2016. – Vol. 473, №7. – P. 805-825. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

15. Valko M., Leibfriz D., Moncol J. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease // Int. J. Biochem. Cell Biol. – 2007. – Vol. 39. – P. 44-84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

16. Martel-Pelletier J., Farran A., Montell E. et al. Discrepancies in composition and biological effects of different formulations of chondroitin sulfate // Molecules. – 2015. – Vol. 20, №3. – P. 4277-4289. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Надійшла до редколегії 14.09.2018

Отримано виправлений варіант 15.10.2018

Підписано до друку 15.10.2018

Received in the editorial 14.09.2018

Received a revised version on 15.10.2018

Signed in the press on 15.10.2018

О. Блохина, асп., А. Короткий, канд.биол. наук, Л. Кот, канд. биол. наук, Д. Неграй, студ., Е. Дворщенко, д-р биол. наук
УНЦ "Институт биологии и медицины",
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

ОКИСЛИТЕЛЬНАЯ МОДИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ КРЫС В УСЛОВИЯХ КАРРАГИНАН-ИНДУЦИРОВАННОГО ВОСПАЛЕНИЯ ЗАДНЕЙ КОНЕЧНОСТИ И ДЛИТЕЛЬНОГО ПРОФИЛАКТИЧЕСКОГО ВВЕДЕНИЯ ХОНДРОИТИНА СУЛЬФАТА

Исследовано профилактическое действие хондроитина сульфата на содержание продуктов окислительной модификации белков и уровень сульфгидрильных групп в сыворотке крови крыс при локальном воспалении задней конечности.

Исследования проведены на белых нелинейных половозрелых крысах-самцах массой 180-240 г с соблюдением общих этических принципов экспериментов на животных. Всех животных разделяли на четыре экспериментальные группы. Первая группа – контроль: животным субплантарно вводили 0,1 мл 0,9 % раствора NaCl в заднюю правую конечность. Вторая группа – животным ежедневно в течение 28 суток внутримышечно вводили терапевтическую дозу 3 мг × кг-1 хондроитина сульфата. Третья группа – животным ежедневно в течение 28 суток внутримышечно вводили 0,1 мл 0,9 % раствора NaCl в заднюю правую конечность и на 29-й день моделировали воспалительный отек конечности (животным субплантарно вводили 0,1 мл 1 % раствор каррагинан в заднюю правую конечность). Четвертая группа – крысам ежедневно в течение 28 дней внутримышечно вводили терапевтическую дозу 3 мг × кг-1 хондроитина сульфата, после чего на 29-й день моделировали воспалительный отек конечности. Животных умерщвляли через 3:00 после инъекции раствора каррагинана согласно протоколу этического комитета, после чего быстро делали забор крови для дальнейших исследований. Общее количество животных, вовлеченных в экспериментальные исследования, составила 40 особей. Содержание продуктов окислительной модификации белков (ОМБ) и олигопептидов определяли по уровню карбонильных производных, которые проявляются в реакции с 2,4-динитрофенилгидразином. Уровень общих, белок-связанных и небелковых сульфгидрильных (SH)-групп измеряли по методу Элмана.

Установлено, что при каррагинан-индуцированном воспалении задней конечности в сыворотке крови возрастает содержание продуктов окислительной модификации белков и снижается содержание сульфгидрильных групп. Показано, что при профилактическом введении препарата на основе хондроитин сульфата животным с каррагинан-индуцированным воспалением вышеуказанные показатели восстанавливались.

Ключевые слова: острое воспаление конечности, хондроитин сульфат, окислительная модификация белков, сыворотка крови.

O. Blokhina, PhD, stud., O. Korotkiy, PhD, L. Kot, PhD, D. Negray, stud., K. Dvorshchenko, DSc
ESC "Institute of Biology and Medicine",
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

OXIDATIVE MODIFICATION OF PROTEINS IN SERUM OF RATS UNDER CONDITIONS OF CARRAGEENAN-INDUCED INFLAMMATION BACK LIMB AND PROLONGED PROPHYLACTIC ADMINISTRATION OF CHONDROITIN SULFATE

The aim of the work was to investigate the preventive effect of Chondroitin Sulfate on the content of products of oxidative modification of proteins and the level of sulfhydryl groups in blood serum of rats at local inflammation of the hind limb.

The studies were conducted on white non-linear, sexually mature male rats weighing 180–240 g, in compliance with the general ethical principles of experiments on animals. All animals were divided into four experimental groups. The first group – control: animals sub-planar injected 0,1 ml of 0,9 % NaCl solution into the posterior right limb. The second group – animals received a therapeutic dose of 3 mg x kg-1 chondroitin sulfate daily for 28 days daily. The third group – animals were infused intramuscularly with 0,1 ml of 0,9 % NaCl solution in the posterior right limb for 28 days and for 29 days inflammatory edema of the limb was stimulated (animals were sub-planar injected with 0,1 ml of 1 % carrageenan solution to the posterior right limb). The fourth group – for 28 days rats were daily intramuscularly injected with a therapeutic dose of 3 mg x kg-1 chondroitin sulfate, after which on 29th day, inflammatory edema of the limb was stimulated. Animals were killed 3 hours after injection of carrageenan solution according to the protocol of the ethical committee, and then blood sampling for further research was quickly taken. The total number of animals involved in experimental studies was 40 individuals. The content of the products of oxidative modification of proteins (OMP) and oligopeptides was determined by the level of carbonyl derivatives that were detected in reaction with 2,4-dinitrophenylhydrazine. The level of total, protein-bound and non-protein sulfhydryl (SH) -groups was measured by the Elman method.

It has been established that with carrageenan-induced inflammation of the posterior limb, the content of the products of oxidative modification of proteins increases and the content of sulfhydryl groups decreases in the serum. It was shown that the prophylactic administration of chondroitin sulfate based drug on animals with carrageenan-induced inflammation restored the abovementioned parameters.

Key words: acute inflammation of the limb, chondroitin sulfate, oxidative modification of proteins, blood serum.

УДК 581.1:581.17.581.2(633.11)

О. Бобошко, асп., О. Панюта, канд. біол. наук, О. Артеменко, канд. біол. наук, Н. Таран, д-р біол. наук, проф.
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна,
В. Ємельянов, канд. біол. наук

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, Київ, Україна

ПАТОГЕН-ІНДУКОВАНЕ НАКОПИЧЕННЯ КАЛОЗИ ТА ФЕНОЛЬНИХ СПОЛУК У ПРОРОСТКАХ ОЗИМОЇ ПШЕНИЦІ

Однією з перших реакцій рослин на дію патогенів є накопичення калози та/або фенольних сполук, що призводить до укріплення клітинної стінки в місцях контакту рослини-живителя і патогену. Локальна захисна реакція стає сигналом, який викликає системні механізми захисту, що охоплюють весь рослинний організм. У зв'язку з цим метою роботи було визначення вмісту калози та фенольних сполук у проростках озимої пшениці сортів Миронівська 808 і Ренан, як конституційних, так і індукованих інфікуванням збудником очкової плямистості в діапазоні активних концентрацій їхніх титрів, та порівняння накопичення досліджуваних речовин у часі. Виділення та кількісне визначення калози проводили за модифікованим методом Каусса та ін. Для визначення загального вмісту фенольних сполук використовували реактив Фоліна-Чокальта. Визначено вміст конституційних і патоген-індукованих калози та фенольних сполук у проростках сортів озимої пшениці Миронівська 808 та Ренан. Виявлено, що у проростків пшениці відносно стійкого сорту Ренан вміст конституційних калози та фенольних сполук на початкових етапах вегетації вищий, ніж у проростків сприйнятливого сорту Миронівська 808, що пов'язано з генетично детермінованою стійкістю цього сорту до збудника очкової плямистості. У проростків пшениці сорту Миронівська 808 виявлено інтенсивніше патоген-індуковане накопичення калози порівняно з проростками сорту Ренан, але це не вплинуло на сумарну ефективність захисту від патогену. Крім того, найбільше патоген-індуковане накопичення калози у проростків пшениці відносно стійкого сорту Ренан відбувалось за використання інокулюма в концентрації 10^4 КУО/мл, а у проростків сприйнятливого сорту Миронівська 808 – 10^2 КУО/мл. З'ясовано, що більша кількість конституційних калози та фенольних сполук, а також інтенсивне їх накопичення за інфікування у проростків пшениці сорту Ренан є вирішальним фактором стійкості до збудника очкової плямистості.

Ключові слова: калоза, фенольні сполуки, пшениця, збудник очкової плямистості.

Вступ. Однією з перших реакцій рослин на патогенез є укріплення клітинних стінок, яке відбувається за рахунок того, що з зовнішньої сторони плазмалемми на суміжному з нею боці клітинної стінки накопичується калоза [1]. Крім того, що грани калози є механічним бар'єром на шляху гіфів грибів, вони також є місцем накопичення антимікробних вторинних метаболітів, у тому числі і фенолів. Такі надмолекулярні комплекси синергічно [2] перешкоджають проникненню патогену до клітини. У субепідермальних шарах рослинних тканин, які зазнали впливу стресу різного типу, у тому числі за інвазії патогену, часто синтезуються і накопичуються фенольні сполуки [3]. Формування стійкого фізико-хімічно-механічного бар'єра внаслідок зв'язування інвазійного агента з компонентами клітинної стінки сприяє утворенню кластерних структур і зумовлює підвищену стійкість тканин рослини до дії ферментних комплексів патогенів [4]. Крім того, синтезовані рослиною фенольні сполуки є природною альтернативою хімічним засобам контролю патогену сільськогосподарських культур [5, 6], що безперечно можна використовувати у біотехнології рослин, наприклад, ініціацією підвищення імунітету шляхом попереднього праймування [7, 8]. За розпізнаванням потенційних сигналів патогенезу та їх послідовної трансдукції відбувається генетично детермінована реалізація біохімічних реакцій імунної відповіді у рослинних клітинах, у тому числі синтез та накопичення фенолів [9]. Останнє призводить до виникнення у рослини патоген-асоційованих молекулярних патернів (PAMPs), так званого PAMP-тримерного імунітету [10]. У результаті цього розвиток та поширення інфекції найчастіше обмежується задовго до того, як патоген зможе проникнути у внутрішні шари рослинних тканин [11].

У разі пошкодження і захворювання в рослинних клітинах активується фермент поліфенол-оксидаза, яка окиснює феноли до високотоксичних хінонів. Такі сполуки отруюють клітини рослини-господаря та водночас вбивають патогенні мікроорганізми, інактивуючи їхні екзоферменти. Надалі рослини можуть перетворювати ці речовини на лігнін і, тим самим, нейтралізувати дію патогенів. Захисна дія "консервованих" фенольних сполук пов'язана з їх здатністю запобігати або

знижувати вплив оксидантного стресу на рослину та з їх використанням рослинними клітинами за умов повторного патогенезу або впливу інших несприятливих факторів середовища [12]. Антиоксидантні властивості фенолів зумовлені їх високою акцепторною активністю до радикалів. Вони здатні протистояти їхнім вільним електронам, що дозволяє стабілізувати та інактивувати ланцюгові реакції, у тому числі, знижувати надлишок активних форм кисню [13].

Калоза та фенольні сполуки входять до складу папіл – напівсферичних капсулоподібних утворень між плазмалемою та клітинною стінкою, та є динамічними компонентами патоген-індукованої імунної (PTI-pattern-triggered immunity) відповіді [14]. Тобто система захисту рослинного організму формується під впливом дестабілізуючих факторів середовища, які послідовно викликають зміни концентрацій та співвідношення складових речовин, що призводить до появи нових хімічних конгломератів та зв'язків, які кооперуючись формують нові надструктурні бар'єри для патогенів. За рахунок кооперативної поведінки зазначених компонентів захисної системи PTI посилюються механічні властивості клітинної стінки, забезпечується швидка та ефективна реалізація локальної біохімічної реакції-відповіді рослинних клітин та тканин на дію екстрацелюлярних ферментативних комплексів патогену чи механічного стресу та ін. [14]. У зв'язку з цим вивчення механізмів конституційної, індукованої та системної стійкості рослин, пов'язаних із накопиченням калози та синтезом фенольних сполук, як незамінних молекулярних захисних речовин, є вельми актуальним.

Мета дослідження передбачала визначення вмісту калози та фенольних сполук у проростках озимої пшениці сортів Миронівська 808 і Ренан, як конституційних, так і індукованих інфікуванням збудником очкової плямистості – гемібіотрофним грибом *Pseudocercospora herpotrichoides* (Fron) Deighton (сучасна назва гриба *Oculimacula yallundae* (Wallwork & Spooner) Crous & W. Gams)) у діапазоні активних концентрацій їхніх титрів та порівняння накопичення обраних захисних речовин у часі.

Матеріали та методи. Використовували проростки озимої пшениці двох сортів – сприйнятливо до збудника очкової плямистості сорту Миронівська 808 та відносно стійкого сорту Ренан, що містить ген стійкості *Pch1* [15]. Пшеницю вирощували на піщаній культурі. Семидобові проростки інфікували суспензією конідій у концентрації 10^2 – 10^5 колонієутворюючих одиниць на мл (КУО/мл) [16] високовірulentного штаму 543 7/1 *P. herpotrichoides* із колекції Інституту захисту рослин НААН України. Контрольні варіанти обробляли дистильованою водою. Відбір рослинного матеріалу проводили кожні 24 години протягом 5 діб.

Виділення та кількісне визначення калози здійснювали за модифікованим методом Каусса та ін. [17]. Довжина хвилі збудження (λ_{ex}) становила 397 нм, а довжина хвилі вимірів (λ_{em}) – 490 нм.

Для визначення загального вмісту фенольних сполук використовували реактив Фоліна–Чокальта. Для побудови калібрувальної кривої і розрахунку вмісту загальної суми фенолів в екстрактах з етанолом використовували ферулову кислоту, як домінуючу фенольну речовину у злакових рослинах [18].

Рослинний матеріал висушували у провітрюваній сушильній шафі за 60°C. Розтирали 100 мг сухого матеріалу зі скляним порошком та екстрагували в 1 мл 95 % етанолу протягом 24 год. Виміри робили на спектрофотометрі за довжини хвилі 765 нм.

Досліди виконували в триразовому біологічному та аналітичному повторях. Результати опрацьовували статистично з використанням програми Microsoft Excel 2008.

Результати та їх обговорення. В ході експериментальної роботи було визначено кількість конституційної та патоген-індукованої калози у проростках пшениці досліджуваних сортів. Протягом 96 год відбувалося накопичення цього полісахариду, а в наступні 24 год (через 120 год) кількість калози не змінювалась (рис. 1). Динаміка вмісту конституційної калози у проростків

пшениці відносно стійкого сорту Ренан і сприйнятливо сорту Миронівська 808 була подібною. Слід звернути увагу, що протягом 48 год вміст калози у проростків пшениці обох сортів був майже однаковий, а через 72 год у проростків сорту Ренан збільшився на 20 % порівняно із проростками сорту Миронівська 808 і ця різниця зберігалася до закінчення експерименту. Протягом 120 год кількість конституційної калози у проростках пшениці сорту Ренан зросла в 1,6 раза, а в проростках сорту Миронівська 808 – у 1,4 раза. Тобто конституційна калоза інтенсивніше накопичувалась у проростків відносно стійкого сорту Ренан, ніж у проростків сприйнятливо сорту Миронівська 808.

Інокуляція суспензією конідій збудника очкової плямистості індукувала накопичення калози в проростках обох досліджуваних сортів, але кількість патоген-індукованої калози залежала від концентрації інокулята (рис. 1, А). Найбільше накопичення патоген-індукованої калози у проростків пшениці відносно стійкого сорту Ренан виявили за обробки суспензією конідій у концентрації 10^4 КУО/мл. За використання цієї концентрації інокулята вміст калози протягом експерименту зростав на 64–100 % порівняно з контролем. За впливом на інтенсивність накопичення патоген-індукованої калози у проростків пшениці сорту Ренан використані концентрації інокулята розміщуються у такому порядку: 10^4 КУО/мл > 10^5 КУО/мл > 10^3 КУО/мл > 10^2 КУО/мл.

У проростків пшениці сприйнятливо сорту Миронівська 808 найінтенсивніше патоген-індукована калоза накопичувалась за обробки суспензією конідій у концентрації 10^4 КУО/мл (рис. 1, Б). Вміст патоген-індукованої калози порівняно з вмістом конституційної калози протягом експерименту зростав на 114–160 %. Послідовність концентрацій інокулята за зменшенням індуктивного впливу на відкладання калози для проростків пшениці сорту Миронівська 808 така: 10^2 КУО/мл > 10^3 КУО/мл > 10^4 КУО/мл > 10^5 КУО/мл.

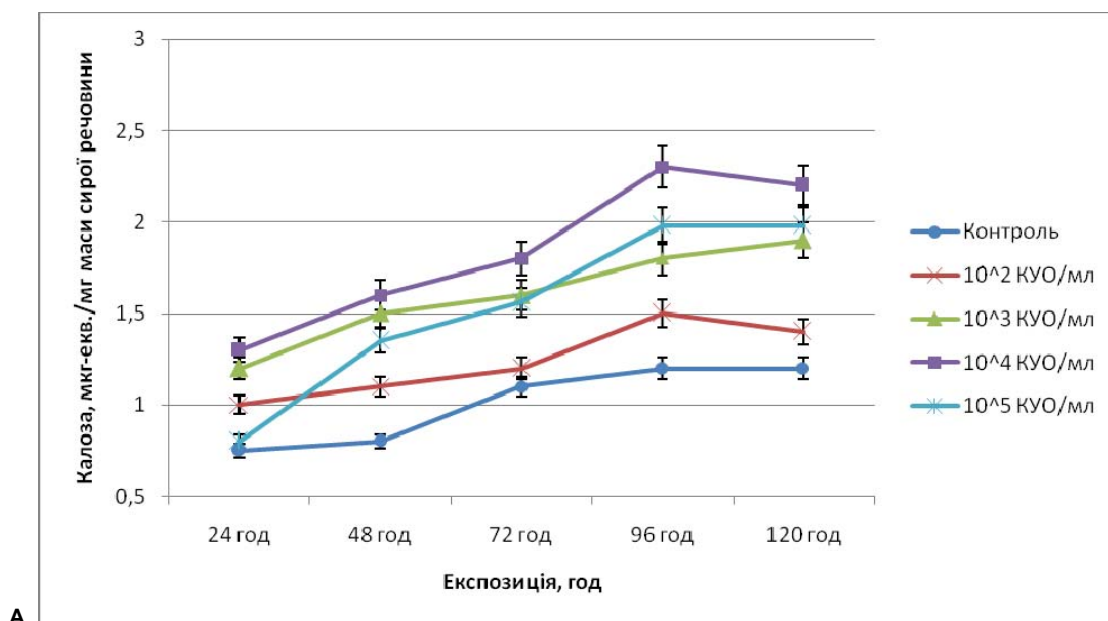


Рис. 1. Вміст калози у проростках пшениці сортів Ренан (А) і Миронівська 808 (Б) за інокуляції суспензією конідій *P. herpotrichoides*

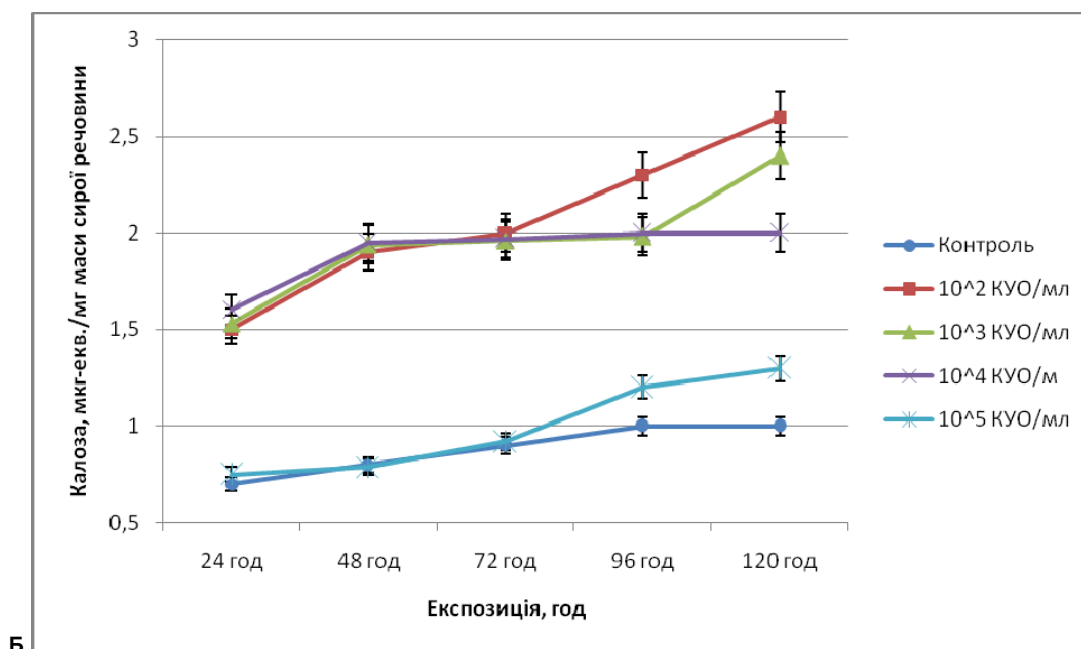


Рис. 1 (продовження). Вміст калози у проростках пшениці сортів Ренан (А) і Миронівська 808 (Б) за інокуляції суспензією конідій *P. herpotrichoides*

Як бачимо, найбільше патоген-індуковане накопичення калози у проростків пшениці відносно стійкого сорту Ренан відбувалось за використання інокулянта у концентрації 10^4 КУО/мл, а у проростків сприйнятливого сорту Миронівська 808 – 10^2 КУО/мл, що в 100 разів нижче, ніж концентрація для проростків відносно стійкого сорту. На нашу думку, це пов'язано з різним рівнем сприйнятливості досліджуваних сортів до збудника очкової плямистості.

Через 120 год вміст патоген-індукованої калози у проростків пшениці відносно стійкого сорту Ренан, за обробки інокулятом у концентрації 10^4 КУО/мл, був нижчим, ніж у проростків сприйнятливого сорту Миронівська 808, за обробки інокулятом у концентрації 10^2 КУО/мл – на 15 %, хоча вміст конституційної калози через 120 год у проростків сорту Ренан був вищим, ніж у проростків сорту Миронівська 808 на 20 %. Виявлена залежність вмісту калози від концентрації інокулянта свідчить, що у проростків пшениці відносно стійкого сорту Ренан активуються специфічні складові мультикомпонентної системи захисту від патогену. Вони пов'язані з відкладанням калози, яка обмежує доступ поживних речовин до патогену та ізолює його. Крім того, відбувається порушення транспорту речовин по флоемі, по якій передається сигнал індукції системної стійкості, унаслідок чого рівень активації захисних реакцій знижується.

Визначення кількості конституційних і патоген-індукованих фенольних сполук у проростків пшениці обох досліджуваних сортів показало, що збільшення відбувалось протягом всього експерименту і було прямо пропорційним підвищенню концентрації інокулянта.

Накопичення конституційних фенольних сполук у проростків пшениці сортів Ренан та Миронівська 808 відбувалось протягом всього експерименту (рис. 2). Максимальний вміст фенолів у проростків сорту Ренан спостерігали через 120 год, він був у 2,4 раза більший порівняно з 24 год дослідження (рис. 2, А).

Максимальний вміст конституційних фенольних сполук у проростків сорту Миронівська 808 виявили також через 120 год після інфікування, він у 4,3 раза був більший, ніж у перші 24 години експерименту (рис. 2, Б). Хоча конституційні фенольні сполуки інтенсивніше накопичувались у проростків пшениці сприйнятливого сорту Миронівська 808, ніж у проростків відносно стійкого сорту Ренан, проте, протягом 120 год вміст фенольних сполук у проростків пшениці сорту Ренан був вищим порівняно з сортом Миронівська 808 у 1,1–2,6 раза.

Дослідження вмісту патоген-індукованих фенольних сполук показали, що через 24 год після інокуляції кількість фенольних сполук збільшилася порівняно з контролем у проростків обох сортів. Слід зазначити, що збільшення відбувалось пропорційно підвищенню концентрації інокулянта. За інтенсивністю патоген-індукованого накопичення фенольних сполук у проростків пшениці сортів Ренан та Миронівська 808 використані концентрації інокулянта розміщуються у такому порядку: 10^5 КУО/мл > 10^4 КУО/мл > 10^3 КУО/мл > 10^2 КУО/мл (рис. 2).

Найінтенсивніше накопичення фенольних сполук у інфікованих проростків пшениці сортів Ренан та Миронівська 808 відбувалось через 24 год та становило відповідно 132–199 % і 252–395 % стосовно контролю (рис. 2). У проростків сприйнятливого сорту Миронівська 808 виявлено більший приріст вмісту патоген-індукованих фенольних сполук порівняно з контролем, але вміст патоген-індукованих фенольних сполук у проростків відносно стійкого сорту Ренан був у 1,2 раза вищим, ніж у проростків сорту Миронівська 808. Варто зазначити, що добовий приріст вмісту фенольних сполук у інфікованих зразках обох сортів надалі поступово зменшувався.

За обробки суспензією конідій у концентрації 10^5 КУО/млу проростків пшениці сорту Ренан кількість патоген-індукованих фенольних сполук з 24 год по 120 год зросла на 23 %, а у проростків сорту Миронівська 808 – на 37 %.

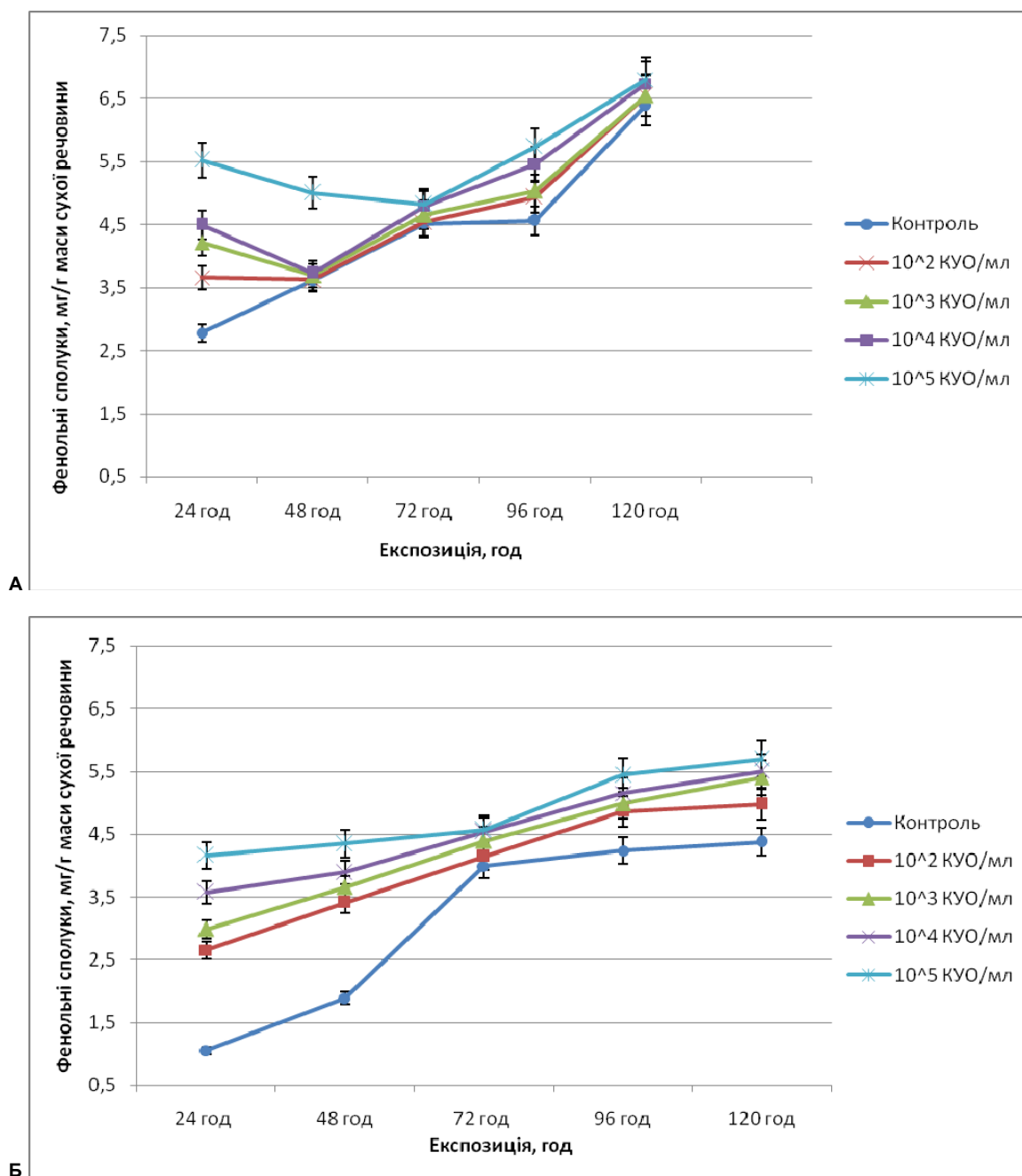


Рис. 2. Вміст фенольних сполук у проростках пшениці сортів Ренан (А) і Миронівська 808 (Б) за інюкуляції суспензією конідій *P. herpotrichoides*

Більший вміст фенольних сполук, як конституційних так і патоген-індукованих, протягом 120 годин помічено у проростків відносно стійкого сорту Ренан. Проте приріст вмісту фенолів стосовно контролю більший у проростків пшениці сприйнятливої сорту Миронівська 808.

Таким чином, у 7–12-добових проростків пшениці відносно стійкого сорту Ренан вміст конституційних фенольних сполук більший, ніж у проростків сприйнятливої сорту Миронівська 808. Інтенсивне накопичення фенолів у проростків обох сортів відбувалося в перші 24 год після інфікування. Починаючи з 48 год інфікування у проростків сорту Ренан інтенсивність накопичення фенольних сполук була нижчою, ніж у проростків сорту Миронівська 808. Такі результати свідчать про те, що ймовірно, антиоксидантна функція фенолів реалізується на ранніх стадіях стресової відповіді, а згодом їх накопичення у тканинах рослин може гальмувати ріст і фотосинтетичні процеси [19]. Саме тому зменшення накопичення фенольних сполук у проростків пшениці

сортів Ренан, що зазнали стресу під впливом патогенного гриба, доцільно розглядати як компенсаторний ефект, тобто в перші 24 год розвитку інфекція пригнічується фенолами і в результаті не потрібно витрачати енергетичні ресурси для синтезу фенольних сполук за відсутності патогену. Високий вміст цих сполук у проростках пшениці досліджуваних сортів за патогенезу підтверджує їхню участь у реакції-відповіді рослинного організму на стрес, як антиоксидантів. Отримані результати свідчать про важливе значення фенольних сполук в адаптації рослин за патогенезу.

Результати проведених досліджень по визначенню вмісту калози та фенольних сполук у проростках пшениці сприйнятливої і відносно стійкого до збудника очкової плямистості сортів свідчать про можливий зв'язок накопичення цих речовин за патогенезу: у разі зменшення вмісту калози – збільшується вміст фенольних сполук і навпаки. Наприклад, за інфікування протягом експерименту у проростків пшениці відносно

стійкого сорту Ренан вміст калози був нижчий, ніж у проростків сприйнятливого сорту Миронівська 808 (рис. 1), але вміст фенольних сполук – вищий (рис. 2). Імовірно, калоза і фенольні сполуки діють як скоординований захисний комплекс.

Висновки. Отже, нами виявлено, що у проростків пшениці відносно стійкого сорту Ренан вищий вміст конституційних калози та фенольних сполук пов'язаний з генетично детермінованою (містять ген *Pch1*) стійкістю цього сорту до збудника очкової плямистості *Pseudocercospora herpotrichoides*. У проростків сприйнятливого сорту Миронівська 808 виявлено інтенсивніше патоген-індуковане накопичення калози порівняно з проростками несприйнятливого сорту Ренан, але це не вплинуло на сумарну ефективність захисту від патогену. Можна припустити, що більша кількість конституційної калози та фенольних сполук, а також швидкість індукції їх синтезу й накопичення визначають ефективність реакції-відповіді сорту та можуть бути вирішальним фактором його стійкості до патогенного гриба *P. herpotrichoides*.

Список використаних джерел:

1. Callose deposition in the processing of the cells of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) biotic elicitors / V. Emelyanov, J. Kravchuk, S. Poliakovskiy, O. Dmitriev // Cytology and Genetics. – 2008. – Vol. 42, № 2. – P. 21–28.
2. Prigogine I. Modern thermodynamics / I. Prigogine, D. Kondepudi // From Heat Engines to Dissipative Structures. – M.: Mir, 2002. – 462 p.
3. Modulation of chlorogenic acid biosynthesis in *Solanum lycopersicum*; consequences for phenolic accumulation and UV-tolerance / C. Cle, L. Hill, R. Niggeweg et al. // Phytochemistry. – 2008. – Vol. 69, № 11. – P. 2149–2156.
4. Zeyen R. Epidermal cell papillae / R. Zeyen, T. Carver, M. Lyngkjær // The Powdery Mildews: a comprehensive treatise. – MN, USA: APS Press, 2002. – P. 107–125.
5. Anti-cariogenic effects of polyphenols from plant stimulant beverages (cocoa, coffee, tea) / G. Ferrazzano, I. Amato, A. Ingenito et al. // Fitoterapia. – 2009. – Vol. 80, № 20. – P. 255–262.
6. Antioxidant and antibacterial activities of polyphenols from ethnomedicinal plants of Burkina Faso / D. Karou, M. Dicko, J. Simpore, A. Traore // African Journal of Biotechnology. – 2005. – Vol. 4, № 8. – P. 823–828.
7. Priming: getting ready for battle / U. Conrath, G. Beckers, V. Flors et al. // Mol. Plant-Microbe Interact. – 2006. – Vol. 19, № 10. – P. 1062–1071.
8. Primed plants do not forget / V. Pastor, E. Luna, B. Mauch-Mani et al. // Environmental and Experimental Botany. – 2012. – Vol. 94. – P. 46–56.
9. Priming, induction and modulation of plant defense responses by bacteria lipopolysaccharides / M. Newman, J. Dow, A. Molinaro, M. Parrilli // Journal of Endotoxin Research. – 2007. – Vol. 13. – P. 69–84.
10. Zipfel C. Pattern-recognition receptors in plant innate immunity / C. Zipfel // Current Opinion in Immunology. – 2008. – Vol. 20, № 1. – P. 10–16.
11. Nicaise V. Recent advances in PAMP-triggered immunity against bacteria: pattern recognition receptors watch over and raise the alarm / V. Nicaise, M. Roux, C. Zipfel // Plant Physiology. – 2009. – Vol. 150, № 4. – P. 1638–1647.
12. Plotnikova L. Cytological, molecular and genetic bases of plant species immunity to fungal pathogens / L. Plotnikova // Mycology and Phytopathology. – 2008. Vol. 42, № 5. – P. 393–410.
13. Differential accumulation of callose, arabinoxylan and cellulose in nonpenetrated versus penetrated papillae on leaves of barley infected with *Blumeria graminis* f. sp. *Hordei* / J. Chowdhury, M. Henderson, P. Schweizer et al. // New Phytologist. – 2014. – Vol. 3, № 204. – P. 650–660.
14. Underwood W. The Plant Cell Wall: A Dynamic Barrier Against Pathogen Invasion / W. Underwood // Front. Plant. Sci. – 2012. – Vol. 3. – № 8. – P. 483–593.
15. Wei L. Advances and prospects in wheat eyespot research: Contribution from genetics and molecular tools / L. Wei // Journal of Phytopathology. – 2011. – Vol. 7, № 8. – P. 235–243.
16. Panyuta O. Method of infection to assess the stability of winter wheat to the pathogen *Tserkosporelozu* / O. Panyuta, V. Belava, N. Taran // UA Patent № 389960, Ukraine, A01N 1/04, Bull. № 9, 2014.

17. Kauss H. The degrees of polymerization and N-acetylation of chitosan determine its ability to elicit callose formation in suspension cells and protoplasts of *Catharanthus roseus* / H. Kauss, W. Jeblick, A. Domard // Planta. – 1989. – Vol. 178, issue 3. – P. 385–392.

18. Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions / K. Kim, R. Tsao, R. Yang, S. Cui // Food Chemistry. – Vol. 95, issue 3. – P. 466–473.

19. Features of physiological and biochemical processes of spring wheat plants after using fungicide / N. Lysenko, E. Prudnikova, N. Khilkova, E. Tchekalin // Scientific notes of Orel state university. Series: Natural, technical and medical sciences. – 2012. – № 6–1. – P. 385–388.

References:

1. Emelyanov V., Kravchuk J., Poliakovskiy S., Dmitriev O. Callose deposition in the processing of the cells of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) biotic elicitors, Cytology and Genetics, 2008, vol. 42, № 2, pp. 21–28.
2. Prigogine I., Kondepudi D. Modern thermodynamics. From Heat Engines to Dissipative Structures, M.: Mir, 2002 – 462 p.
3. Cle C., Hill L., Niggeweg R., Martin, C., Guisez Y., Prinsen E., Jansen M. Modulation of chlorogenic acid biosynthesis in *Solanum lycopersicum*; consequences for phenolic accumulation and UV-tolerance, Phytochemistry, 2008, vol. 69, № 11, pp. 2149–2156.
4. Zeyen R., Carver T., Lyngkjær M. Epidermal cell papillae. The Powdery Mildews: a comprehensive treatise. MN, USA: APS Press; 2002. pp. 107–125.
5. Ferrazzano G., Amato I., Ingenito A., Natale A., Pollio A. Anti-cariogenic effects of polyphenols from plant stimulant beverages (cocoa, coffee, tea), Fitoterapia, 2009, vol. 80, № 20, pp. 255–262.
6. Karou D., Dicko M., Simpore J., Traore A. Antioxidant and antibacterial activities of polyphenols from ethnomedicinal plants of Burkina Faso, African Journal of Biotechnology, 2005, vol. 4, № 8, pp. 823–828.
7. Conrath U., Beckers G., Flors V., Garcia-Agustin P., Jakab G., Mauch F., Newman M., Pieterse C., Poinssot B., Pozo M., Pugin A., Schaffrath U., Ton J., Wendehenne D., Zimmerli L., Mauch-Mani B. Priming: getting ready for battle, Mol. Plant-Microbe Interact, 2006, vol. 19, № 10, pp. 1062–1071.
8. Pastor V., Luna E., Mauch-Mani B., Ton J., Flors V. Primed plants do not forget. Environmental and Experimental Botany, 2012, vol. 94, pp. 46–56.
9. Newman M., Dow J., Molinaro A., Parrilli M. Priming induction and modulation of plant defense responses by bacteria lipopolysaccharides, Journal of Endotoxin Research, 2007, vol. 13, pp. 69–84.
10. Zipfel C. Pattern-recognition receptors in plant innate immunity, Current Opinion in Immunology, 2008, vol. 20, № 1, pp. 10–16.
11. Nicaise V., Roux M., Zipfel C. Recent advances in PAMP-triggered immunity against bacteria: pattern recognition receptors watch over and raise the alarm, Plant Physiology, 2009, vol. 150, № 4, pp. 1638–1647.
12. Plotnikova L. Cytological, molecular and genetic bases of plant species immunity to fungal pathogens, Mycology and Phytopathology, 2008, vol. 42, № 5, pp. 393–410.
13. Chowdhury J., Henderson M., Schweizer P., Burton R., Fincher G., Little A. Differential accumulation of callose, arabinoxylan and cellulose in nonpenetrated versus penetrated papillae on leaves of barley infected with *Blumeria graminis* f. sp. *Hordei*, New Phytologist, 2014, vol. 3, № 204, pp. 650–660.
14. Underwood W. The Plant Cell Wall: A Dynamic Barrier Against Pathogen Invasion, Front. Plant. Sci., 2012, vol. 3, № 8, pp. 483–593.
15. Wei L. Advances and prospects in wheat eyespot research: Contribution from genetics and molecular tools. Journal of Phytopathology, 2011.
16. Panyuta O., Belava V., Taran N. Method of infection to assess the stability of winter wheat to the pathogen *Tserkosporelozu*, UA Patent no. 389960, Ukraine, A01N 1/04, Bull. № 9, 2014.
17. Kauss H., Jeblick W., Domard A. The degrees of polymerization and N-acetylation of chitosan determine its ability to elicit callose formation in suspension cells and protoplasts of *Catharanthus roseus*, Planta, 1989, vol. 178, issue 3, pp. 385–392.
18. Kim K., Tsao R., Cui S. Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions, Food Chemistry, vol. 95, issue 3, pp. 466–473.
19. Lysenko N., Prudnikova E., Khilkova N., Tchekalin E. Features of physiological and biochemical processes of spring wheat plants after using fungicide, Scientific notes of Orel state university. Series: Natural, technical and medical sciences, 2012, № 6-1, pp. 385–388.

Надійшла до редколегії 17.09.2018

Отримано виправлений варіант 18.10.2018

Підписано до друку 18.10.2018

Received in the editorial 17.09.2018

Received a revised version on 18.10.2018

Signed in the press on 18.10.2018

Е. Бобошко, асп., О. Панюта, канд. биол. наук, А. Артеменко, канд. биол. наук, Н. Таран, д-р биол. наук, проф.
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна,
В. Емельянов, канд. биол. наук
Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, Киев, Украина

ПАТОГЕН-ИНДУЦИРОВАННОЕ НАКОПЛЕНИЕ КАЛЛОЗЫ И ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ПРОРОСТКАХ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ

Одной из первых реакций растений на патогены является накопление каллозы и/или фенольных соединений, что приводит к укреплению клеточной стенки в местах контакта растения-хозяина и патогена. Локальная защитная реакция становится сигналом, который

вызывает системные механизмы защиты, охватывающие весь растительный организм. В связи с этим целью работы было определение содержания каллозы и фенольных соединений в проростках озимой пшеницы сортов Мироновская 808 и Ренан, как конституционных, так и индуцированных инфицированием возбудителем очковой пятнистости в диапазоне активных концентраций их титров, и сравнение накопления исследуемых веществ во времени. Выделение и количественное определение каллозы проводили по модифицированному методу Каусса и др. Для определения общего содержания фенольных соединений использовали реактив Фолина-Чокальта. Определено содержание конституционных и патоген-индуцированных каллозы и фенольных соединений в проростках сортов озимой пшеницы Мироновская 808 и Ренан. Установлено, что у проростков пшеницы относительно устойчивого сорта Ренан содержание конституционных каллозы и фенольных соединений на начальных этапах вегетации выше, чем у проростков восприимчивого сорта Мироновская 808, что связано с генетически детерминированной устойчивостью этого сорта к возбудителю очковой пятнистости. У проростков пшеницы сорта Мироновская 808 выявлено более интенсивное патоген-индуцированное накопление каллозы по сравнению с проростками сорта Ренан, но это не повлияло на суммарную эффективность защиты от патогена. Кроме того, наибольшее патоген-индуцированное накопление каллозы у проростков пшеницы относительно устойчивого сорта Ренан происходило при использовании инокулята в концентрации 10^4 КОЕ/мл, а у проростков восприимчивого сорта Мироновская 808 – 10^2 КОЕ/мл. Выяснено, что большее количество конституционных каллозы и фенольных соединений, а также интенсивное их накопление при инфицировании у проростков пшеницы сорта Ренан является решающим фактором устойчивости к возбудителю очковой пятнистости.

Ключевые слова: каллоза, фенольные соединения, пшеница, возбудитель очковой пятнистости.

O. Boboshko, PhD-stud., O. Panyuta, PhD, Associate Prof., O. Artemenko, PhD, Associate Prof., N. Taran, DSc, Prof.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine,
V. Emelyanov, PhD
Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, Kyiv, Ukraine

PATHOGEN-INDUCED CALLOSE AND PHENOLIC COMPOUNDS ACCUMULATION IN WINTER WHEAT SEEDLINGS

Callose and/or phenolic compounds accumulation, which leads to the plant cell wall reinforcement in the places of the host plant and pathogen contact, is one of the first plants reactions on to the pathogen. The local protective reaction causes systemic protective mechanisms that cover the entire plant organism. The purpose of the work was determination of callose and phenolic compounds content in winter wheat seedlings of Myronivska 808 and Renan varieties as constitutional and induced by the eyespot causal agent in the range of their titres active concentrations and comparison of these substances accumulation in time. Callose determination was carried according to the modified Kauss et al. method. Phenolic compounds quantification assay was based on Folin-Ciocalteu method. The content of constitutional and pathogen-induced callose and phenolic compounds in the winter wheat seedlings of Myronivska 808 and Renan varieties was determined. The higher content of constitutional callose and phenolic compounds at the initial stages of vegetation was established in the wheat seedlings of relatively resistant variety Renan than in the seedlings of the susceptible variety Myronivska 808, which is related with genetically determined resistance of this variety to the eyespot causal agent. More intensive pathogen-induced accumulation of callose was observed in wheat seedlings of Myronivska 808 variety, but this did not affect the overall effectiveness of protection against pathogen. The highest pathogen-induced callose accumulation in wheat seedlings of a relatively resistant variety Renan was under inoculum concentration 10^4 CFU/ml and in seedlings of the susceptible variety Myronivska 808 – 10^2 CFU/ml. It has been shown that the higher content of constitutional callose and phenolic compounds and their intensive accumulation under infection in the wheat seedlings of Renan variety, is a determinative factor of the resistance to the eyespot causal agent.

Keywords: callose, phenolic compounds, wheat, eyespot causal agent.

УДК 578.85/86

Т. Руднєва, канд. біол. наук, Т. Шевченко, канд. біол. наук,
О. Шевченко, канд. біол. наук, І. Будзанівська, д-р біол. наук
ННЦ "Інститут біології та медицини",
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

ВІРУС ЗЕЛЕНОЇ КРАПЧАСТОЇ МОЗАЇКИ ОГІРКА В АГРОЦЕНОЗАХ УКРАЇНИ

Вірус зеленої крапчастої мозаїки огірка (ВЗКМО, роду *Tobamovirus*) – дуже поширений у світі патоген, що однаково ефективно уражує як рослини закритого, так і відкритого ґрунту. Коло рослин-хазяїв цього вірусу обмежується рослинами родини гарбузових (*Cucurbitaceae*), а втрати врожаю від ураження ВЗКМО можуть становити 25–50 %. На сьогодні, незважаючи на багатий арсенал противірусних заходів, вірус зеленої крапчастої мозаїки огірка повністю елімінувати з посадкового матеріалу, на жаль, не вдається. В екологічних умовах України вірус зеленої крапчастої мозаїки огірка регулярно виявляється виключно на тепличних культурах огірків. Однак дослідження зарубіжних учених вказують на широке поширення ВЗКМО на рослинах кавунів, динь, огірків та кабачків як у закритому, так і у відкритому ґрунті. Зважаючи на таку ситуацію та беручи до уваги велику шкідливість ВЗКМО, дослідження питання щодо поширення вірусу на території України є дуже актуальним. Метою роботи було дослідження поширення вірусу зеленої крапчастої мозаїки огірка на рослинах родини гарбузових в умовах відкритого ґрунту на території України. Методи: імуноферментний аналіз, електронна мікроскопія, статистичні методи. Результати: проаналізовано поширення вірусу зеленої крапчастої мозаїки огірка (ВЗКМО) на овочевих культурах рослин родини гарбузових в умовах відкритого ґрунту на території України. Виявлено, що на території нашої країни в умовах відкритого ґрунту ВЗКМО практично не зустрічається. За останні вісім років було зафіксовано лише поодинокі випадки ураження рослин огірків, кабачків, кавунів та динь в агроценозах Київської та Полтавської областей. Причому в половині випадків була змішана інфекція, представлена сукупністю двох чи трьох вірусів. Наприклад, серед 250 досліджуваних зразків вірус зеленої крапчастої мозаїки огірка виявили лише в п'яти зразках рослин, що становить 2,4 % від загальної кількості. Моноінфекція спостерігалася лише на огірках і кавунах, на динях і кабачках була змішана інфекція. На рослинах динь було виявлено змішану інфекцію у вигляді ВЗКМО і вірусу мозаїки кавуна 2 (ВМК 2 родини *Potyviridae*), ВМК 2 і вірусу жовтої мозаїки цукіні (ВЖМЦ родини *Potyviridae*). Що стосується кабачків, то вони виявилися ураженими сумішшю ВЗКМО і вірусом огіркової мозаїки (ВОМ, родини *Bromoviridae*). Перевірено насіння огірків, кабачків, цукіні, динь та кавунів різних комерційних фірм, що продають насіння в Україні, і виявлено, що деякий відсоток цього насіння контамінований вірусом зеленої крапчастої мозаїки огірка. Висновки: у результаті багаторічних досліджень було виявлено, що вірус зеленої крапчастої мозаїки огірка на території України практично не уражує рослини родини гарбузових у відкритому ґрунті. Нами було перевірено різні комерційні сорти насіння гарбузових рослин щодо вірусної контамінації і виявлено, що 16 % його уражене вірусом зеленої крапчастої мозаїки огірка, а отже, є потенційно небезпечним резервуаром вірусної інфекції і, як наслідок, серйозною причиною появи захворювань рослин родини гарбузових у відкритому ґрунті.

Ключові слова: вірус зеленої крапчастої мозаїки огірка, агроценози, відкритий ґрунт, овочеві культури, насіння.

Вступ. Вірус зеленої крапчастої мозаїки огірка (ВЗКМО, роду *Tobamovirus*) – дуже поширений у світі патоген, що однаково ефективно уражує як рослини

закритого, так і відкритого ґрунту. Коло рослин-хазяїв цього вірусу обмежується рослинами родини гарбузових (*Cucurbitaceae*) і залежно від стадії ураження рос-

лин викликає симптоми різного ступеня важкості. Наприклад, втрати врожаю від ураження ВЗКМО можуть становити 25–50 %, а в окремих випадках, коли рослини інфікуються на стадії проростків, призводити і до повної втрати врожаю [1].

ВЗКМО зустрічається у багатьох країнах світу [19]. Завдяки своїм біологічним властивостям вірус може тривалий час зберігатися в ґрунті, не втрачаючи при цьому інфекційності, а здатність ВЗКМО ефективно передаватися насінням сприяє передачі і поширенню вірусу між різними країнами внаслідок експортно-імпортних відносин [12, 19].

На сьогодні розроблено різні методи боротьби з вірусом зеленої крапчастої мозаїки огірка, серед яких найбільш популярними є термічні і хімічні методи знезараження насіння. Однак, незважаючи на багатий арсенал противірусних заходів, вірус зеленої крапчастої мозаїки огірка повністю елімінувати з посадкового матеріалу, на жаль, не вдається [21].

Дослідження вірусу зеленої крапчастої мозаїки огірка на території України розпочалося в середині 1960-х років. Тоді вперше було ідентифіковано українські ізоляти вірусу на тепличних огірках в Київській області, описано їхні фізико-хімічні властивості і показано, що в екологічних умовах України ВЗКМО зустрічається лише в умовах закритого ґрунту на культурах огірків [3].

Після багаторічної перерви, починаючи з 2000 року, дослідження вірусу зеленої крапчастої мозаїки огірка в екологічних умовах України знову стало актуальним через масові ураження рослин огірків цим вірусом у тепличних господарствах. На той час нами було ідентифіковано та виділено нові ізоляти ВЗКМО, досліджено їх серологічні, фізичні та молекулярно-біологічні властивості, на основі отриманих антивірусних сироваток до ВЗКМО створено високоефективні тест-системи для непрямого імуноферментного аналізу (ІФА) [10]. Сиквенування послідовностей гену капсидного білка ізолятів та порівняння їх з уже відомими штамами та ізолятами з ГенБанку дало можливість виявити, що на території України циркулюють ізоляти, високогомологічні до російських та грецьких ізолятів ВЗКМО [9]. Нами було доведено, що в екологічних умовах України вірус зеленої крапчастої мозаїки огірка передається виключно через ґрунт, хоча ми детектували високий відсоток ураженості комерційного насіння рослин гарбузових [6].

Необхідно відмітити, що на території України в період з 2000 по 2008 роки вірус зеленої крапчастої мозаїки огірка зустрічався виключно на рослинах огірків закритого ґрунту. Нами не було виявлено випадків інфікування рослин кабачків, цукіні, динь, кавунів та гарбузів у відкритому ґрунті [9]. З іншого боку, дослідження зарубіжних вчених [11, 12, 14, 18] зазначають велике поширення ВЗКМО на рослинах кавунів, динь, огірків та кабачків як у закритому, так і у відкритому ґрунті. Зважаючи на таку ситуацію та беручи до уваги велику шкідливість ВЗКМО, дослідження питання щодо поширення вірусу на території України є дуже актуальним. Ми здійснюємо постійний моніторинг рослин родини гарбузових як відкритого, так і закритого ґрунту на наявність ВЗКМО та вивчаємо властивості нових вірусних ізолятів. Оскільки вірус зеленої крапчастої мозаїки огірка – високоефективний патоген, здатний призводити до повної втрати врожаю, треба постійно робити його моніторинг, щоб попередити поширення вірусу в агроценозах і по можливості запобігти масовому ураженню рослин та втратам врожаю.

Зважаючи на все вищесказане, метою роботи було дослідження поширення вірусу зеленої крапчастої мозаїки огірка на рослинах родини гарбузових в умовах відкритого ґрунту на території України.

Матеріали і методи. Об'єктом досліджень слугували рослини огірків, кабачків, цукіні, гарбузів, кавунів та динь з симптомами вірусної етіології, відібрані з відкритого ґрунту різних регіонів України.

Для вірусологічних досліджень відбирали листки середнього або верхнього ярусу рослин та плоди у десяти точках з двох суміжних рядів [4].

Аналіз зразків на наявність вірусних антигенів здійснювався з використанням сендвіч імуноферментного аналізу. Аналіз робили в полістиролових планшетах "Labsystem". Результати реєстрували на рідері Dynatech за довжини хвилі 405 нм [13].

Зразки для ІФА готували шляхом гомогенізації інфікованого рослинного матеріалу в 0,1M PBS + 0.001M EDTA у співвідношенні 1:2 з наступним центрифугуванням у режимі 4 тис. об/хв протягом 20 хв при 4 °C на центрифугі PC-6 [16]. Отриманий гомогенат використовували в імуноферментному аналізі.

Детекцію рослинного матеріалу на наявність вірусних антигенів здійснювали з тест-системою для сендвіч-ІФА фірми "Primediagnostics", Нідерланди.

Зразки, що дали позитивний результат в ІФА були використані в електронно-мікроскопічних дослідженнях. Частково очищені вірусні препарати наносили на мідні сіточки діаметром 3 мм з плівкою-підкладкою, виготовленою з 0,2 % розчину формвару ("Serva", Німеччина) Спочатку на сіточки наносили препарат вірусу, витримували 2 хвилини, залишки препарату видаляли за допомогою фільтрувального паперу. Потім виконували негативне контрастування високоочищених вірусних препаратів 2-відсотковим розчином ураніацетату ("Serva", Німеччина) протягом 2 хв [5]. Препарати досліджували за інструментального збільшення 40–60 тис. разів на електронному мікроскопі EM-120 (Суми, Україна).

Комерційне насіння рослин родини гарбузових на наявність антигенів ВЗКМО перевіряли методом сендвіч ІФА з використанням тест-системи для сендвіч-ІФА фірми "Primediagnostics" (Нідерланди). Перед проведенням аналізу насіння витримували протягом 12 годин у дистильованій воді при кімнатній температурі. Надалі матеріал гомогенізували в 0,1 M PBS у співвідношенні 1:2 з подальшим центрифугуванням у режимі 5 тис. об/хв протягом 15 хв при 4 °C на центрифугі PC-6. Отриманий гомогенат використовували для детекції вірусів. Результати реєстрували на рідері Termo Labsystems Opsis MR (США) із програмним забезпеченням Dynex Revelation Quicklink при довжинах хвиль 405/630 нм.

Результати та обговорення. Згідно з вітчизняними літературними даними, на території України вірус зеленої крапчастої мозаїки огірка зустрічається лише у тепличних господарствах [2]. У 60–70-х роках він був зареєстрований у тепличних господарствах Київської області, але відомостей щодо поширення цього вірусу у інших областях України немає.

У наших попередніх дослідженнях було визначено, що вірус зеленої крапчастої мозаїки огірка на території України уражує виключно огірки закритого ґрунту, та не зустрічається на рослинах родини Гарбузових у відкритому ґрунті [9]. За вісім років, з 2000-го по 2008-й рік включно, ВЗКМО було детектовано в різних тепличних господарствах Дніпропетровської, Миколаївської, Сумської, Харківської, Черкаської областей та Автономної Республіки Крим (рис. 1).



Рис. 1. Симптоми темно-зеленого пухирчастого здуття листкової пластинки на рослині огірка, спричинені ВЗКМО

У вищезазначених тепличних господарствах ВЗКМО викликав серйозні втрати врожаю огірків через масове ураження рослин. А плоди, що розвивалися на таких вірусифікованих рослинах, мали зовсім не комерційний вигляд – із пухирчастими здуттями на шкірці, різноманітними деформаціями та плямами.

В умовах же відкритого ґрунту обстежених нами семи регіонів України (Вінницької, Житомирської, Запорізької, Київської, Полтавської та Херсонської) не було зафіксовано жодного випадку контамінації рослин родини гарбузових вірусом зеленої крапчастої мозаїки огірка.

Однак ситуація з поширенням ВЗКМО у світі виглядала зовсім інакше. За період з 2007-го по 2016-й рік включно вірус значно розширив свій ареал, переколювавши на території, де раніше не зустрічався [15, 18]. Наприклад, починаючи з 2013 року, ВЗКМО вперше було зареєстровано в Канаді, США, Австралії, де в умовах відкритого ґрунту на рослинах кавунів та динь вірус викликав суворі симптоми і, як наслідок, колосальні збитки продукції [12, 22]. На думку зарубіжних дос-

лідників, вірус зеленої крапчастої мозаїки огірка на нові території потрапив саме з комерційним вірусифікованим насінням, яке використовувалося, як посадковий матеріал. Адже згідно з результатами філогенетичного аналізу, усі нові штами ВЗКМО, як-от канадські, із США чи австралійські, мають азіатське походження [18].

Зважаючи на таку ситуацію, свої подальші дослідження ми вирішили зосередити на пошуку ВЗКМО саме на рослинах родини гарбузових в умовах відкритого ґрунту. У період з 2009-го по 2017-й рік включно нами було обстежено рослини у Вінницькій, Київській, Кіровоградській, Львівській, Полтавській та Черкаській областях. Для досліджень відбирали рослини огірків, кабачків, патисонів, гарбузів, динь та кавунів з симптомами світло-зеленої та темно-зеленої мозаїки, нитковидності та гофрування листкової пластинки. Часто на уражених рослинах спостерігалась темно-зелена та світло-зелена плямистість листкової пластинки, а на плодах – темно-зелена пухирчастість, бугристість та бліде забарвлення (рис. 2, 3).



Рис. 2. Жовто-зелена мозаїка листкової пластинки рослини кавуна, спричинена вірусом зеленої крапчастої мозаїки огірка



Рис. 3. Темно-зелені пухирчасті здуття листової пластинки та пожовтіння листової пластинки рослини дині, викликані змішаною вірусною інфекцією вірусу зеленої крапчастої мозаїки огірка, вірусом мозаїки кавуна 2 та вірусом жовтої мозаїки цукіні

Разом за підзвітний період було відібрано та проаналізовано близько 250 зразків рослин родини гарбузових.

Методом імуноферментного аналізу було показано наявність вірусу зеленої крапчастої мозаїки огірка у

зразках з відкритого ґрунту Київської та Полтавської областей (табл. 1).

Таблиця 1. Результати тестування рослин родини Гарбузових з відкритого ґрунту різних регіонів України на наявність ВЗКМО

Область	Культури рослин, відібрані для досліджень	Наявність ВЗКМО	Культури рослин, на яких виявлено ВЗКМО	Тип інфекції (моно-, змішана)
Вінницька	огірки, кабачки, цукіні	–		
Київська	огірки, кабачки, цукіні, гарбузи	+	огірки	моноінфекція
Кіровоградська	огірки, кабачки, кавуни, дині	–		
Львівська	огірки, кабачки, цукіні	–		
Полтавська	огірки, кабачки, цукіні, гарбузи, кавуни, дині, патисони	+	кавуни дині кабачки	моноінфекція змішана інфекція змішана інфекція
Черкаська	огірки, кабачки, гарбузи	–		

Проте це були лише поодинокі випадки, до того ж половину з них становила змішана вірусна інфекція. Серед 250 досліджуваних зразків вірус зеленої крапча-

стої мозаїки огірка виявили лише в п'яти зразках рослин, що становить 2,4 % від загальної кількості (рис. 4).



Рис. 4. Зведені дані щодо поширення ВЗКМО в гарбузових рослинах, які культивуються в умовах відкритого ґрунту

Таким чином, ВЗКМО у відкритому ґрунті було виявлено на рослинах огірків у Київській області, а також на рослинах кавунів, кабачків та динь в Полтавській області. Причому моноінфекція спостерігалася лише у випа-

дку огірків та кавунів, на динях і кабачках була змішана інфекція, представлена сукупністю одразу двох чи трьох вірусів (рис. 5).

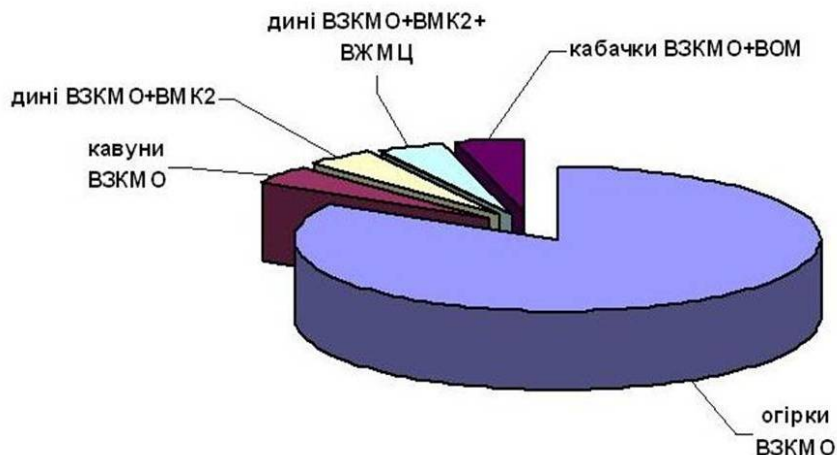


Рис. 5. Розподіл моно- та змішаної інфекції серед симптоматичних зразків гарбузових рослин, уражених ВЗКМО

Наприклад, на рослинах динь було виявлено змішану інфекцію у вигляді ВЗКМО і вірусу мозаїки кавуна 2 (ВМК 2 родини Potyviridae), ВМК 2 і вірусу жовтої мозаїки цукіні (ВЖМЦ родини Potyviridae). Що стосується кабачків, то вони виявилися ураженими сумішшю ВЗКМО і вірусом огіркової мозаїки (ВОМ, родини Bromoviridae).

Досліджувані зразки рослин родини гарбузових на наявність вірусу мозаїки кавуна 2, вірусу жовтої мозаїки цукіні та вірусу огіркової мозаїки ми аналізували не випадково, адже ці віруси є найбільш поширеними патогенами в умовах відкритого ґрунту на представниках вищезазначеної родини у багатьох країнах світу [17]. На відміну від вірусу зеленої крапчастої мозаїки огірка, який є видоспецифічним і уражує переважно представників родини Cucurbitaceae, дані віруси мають широку спеціалізацію і інфікують не лише різні

види рослини в межах певної родини, а й представників з абсолютно різних родин [23].

В останні роки ці вірусні патогени набули значного поширення в агроєкологічних умовах нашої країни. Ми регулярно виявляли ВМК 2, ВЖМЦ та ВОМ в умовах відкритого ґрунту на гарбузових культурах [7, 8]. Таким чином, для більш чіткого розуміння стану поширення вірусних захворювань рослин родин гарбузових в умовах відкритого ґрунту України, огірки, кабачки, гарбузи, патисони, цукіні, дині та кавуни ми аналізували не лише на наявність ВЗКМО, а і на інші, поширені в агроценозах України віруси.

Результати ІФА на наявність моноінфекції ВЗКМО у рослинах відкритого ґрунту було підтверджено результатами електронної мікроскопії. У полі зору мікроскопа спостерігали паличкоподібні віріони, за розмірами характерні для цього вірусу (рис. 6).

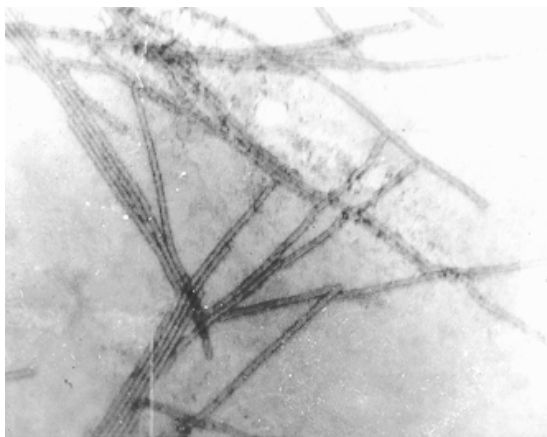


Рис. 6. Електронномікроскопічне зображення вірусу зеленої крапчастої мозаїки огірка: розмір вірусних часток 280–300 x 15 нм (інструментальне збільшення x 40000)

Як показали результати досліджень, на території України в умовах відкритого ґрунту вірус зеленої крапчастої мозаїки огірка практично не зустрічається.

Специфіку поширення вірусу зеленої крапчастої мозаїки огірка у тепличних господарствах України і майже повну її відсутність у відкритому ґрунті ми пов'язуємо зі способом передачі вірусу. Оскільки вірус дуже ефективно передається з ґрунтовим розчином, то погана стерилізація ґрунту (а часто і повна її відсутність у тепличних господарствах нашої країни) призводить до циклічного перезараження рослин і неможливості тривалого позбавлення від вірусної інфекції. У наших попередніх дослідженнях було виявлено, що для тепличних госпо-

дарств України основним шляхом поширення вірусу зеленої крапчастої мозаїки огірка є вірусифікований ґрунт [9]. Рослинні рештки розкладаючись вивільнюють вірус, який, потрапивши у ґрунт, зберігається там досить тривалий час, а під час висівання насіння у такий ґрунт відбувається швидке інфікування проростків. Окремо нами було проаналізовано насіння огірків, що використовувалося як посадковий матеріал у різних тепличних господарствах, і показано, що воно не містило вірусних антигенів. Таким чином, за результатами наших досліджень, для українських тепличних господарств основним і найбільш небезпечним джерелом ВЗКМО є вірусифікований ґрунт.

За літературними даними, ВЗКМО дуже ефективно передається насінням: вірус міститься на верхній частині плівки насіння і його передача потомству відбувається внаслідок травмування тканини паростків, куди й потрапляє інфекція [2]. Саме завдяки вірусконтамінованому комерційному насінню, обмін яким відбувається під час експортно-імпортних відносин, вірус зеленої

крапчастої мозаїки огірка подолав міжконтинентальні бар'єри [12] і на сьогодні є одним із найбільш поширених вірусів у світі [12].

У своїх дослідженнях ми також робили перевірку різних сортів комерційного насіння на наявність ВЗКМО і виявили, що лише незначну його кількість було контаміновано вірусними антигенами (табл. 2).

Таблиця 2. Результати перевірки насіння різних сортів рослин родини *Cucurbitaceae* на наявність ВЗКМО

Фірма-виробник	Вид рослини	Сорт рослини	E405, о.о	Наявність ВЗКМО
№ 1	Диня	Леся		—
		Тітовка		—
	Кавун	Ананас		—
		Кримсон світ		—
		Чальстон Грей		—
	Огірок	Парад		—
		Лялюк		—
		Паризький корнішон		—
		Кустовий		—
		Ізид F1		—
№ 2	Кавун	Орфей		—
	Огірок	Засолочний-65		—
		Далекохідний 27		—
		Міг		—
		Ізящний		—
№ 3	Диня	Голубчик		—
		Колхозниця		—
	Кавун	Золотиста	0,325 ± 0,005	+
		Огоньок		—
		Грибовський		—
№ 4	Огірок	Лялюк		—
		Джерело		—
	Кавун	Огоньок		—
		Фотон		—
	Кабачок	Іскандер		—
		Скворушка		—
	Диня	Тітовка		—
		МашаF1		—
		АстеріксF1		—
		АмурF1		—
		МаріндаF1		—
		МатільдаF1		—
		АтлантикF1		—
		КарінF1		—
№ 5	Огірок	АнулькаF1		—
		ФенксF1		—
	Диня	ЛьошаF1		—
		Апоміксис Коняєвих		—
		Дідона		—
		Таврійський		—
		Скворушка		—
		Сахарний малиш		—
		Дубовка		—
		Медовий аромат		—
№ 6	Кавун	Ультраскоростиглий		—
		Регія F1		—
№ 7	Огірок	Отелло F1		—
		Малиш F1	0,256 ± 0,008	+
№ 8	Огірок	Парад	0,234 ± 0,006	+
		Водограй	0,348 ± 0,011	+
	Огірок	Лялюк	0,280 ± 0,008	+
		Кустовий	0,410 ± 0,014	+
	Огірок	Засолочний	0,560 ± 0,012	+
		Фенікс	0,640 ± 0,011	+
	Огірок	Паризький корнішон	0,520 ± 0,018	+
		Джерело	0,604 ± 0,014	+
	Огірок	Ніжинський		—
		Закусочний		—
№ 9	Огірок	Сквирський F1		—
		СМФ		—
		ДС-27		—
		Левадний		—
№ 10	Огірок	Лінія П1		—
				—

Ми перевірили більше шістдесят сортів насіння огірка, кабачків, цукіні, динь та кавунів десяти різних комерційних фірм, що займаються продажем насіння. Результати ІФА показали наявність ВЗКМО у насінні огіроків, що належало фірмі № 9 та насінні дині "Золотиста" фірми № 3.

Наприклад, з шістдесят трьох сортів насіння десять виявилися вірусконтамінованими, що становить 16 % від загальної кількості перевіреного насіння. Отже, нами було показано, що на сьогодні в Україні комерційне вірусконтаміноване насіння може бути цілком імовірною причиною появи вірусного захворювання на рослинах родини гарбузових.

Таким чином, протягом останніх десяти років на території України вірус зеленої крапчастої мозаїки огірка циркулює переважно на рослинах огіроків у закритому ґрунті та практично не уражує рослини родини гарбузових у відкритому ґрунті. Таку ситуацію ми пояснюємо специфікою передачі ВЗКМО. Адже згідно з літературними даними, вірус зеленої крапчастої мозаїки огірка не передається комахами, а це, у свою чергу, значно обмежує його ареал [23]. До того ж, як уже було зазначено, цей вірус має вузьке коло рослин-хазяїв і, крім родини гарбузових та кількох видів дикорослих рослин, він не має інших хазяїв. Оскільки найбільш поширений шлях поширення для цього вірусу – з вірусконтамінованим насінням, а згідно з результатами наших досліджень, на комерційному ринку України такого насіння незначний відсоток, то саме це є лімітуючим фактором поширення ВЗКМО на рослинах відкритого ґрунту в агроекологічних умовах нашої країни.

Висновки. У результаті багаторічних досліджень було виявлено, що вірус зеленої крапчастої мозаїки огірка на території України практично не уражує рослини родини гарбузових у відкритому ґрунті. Нами було перевірено різні комерційні сорти насіння гарбузових рослин щодо вірусної контамінації і виявлено, що 16 % його уражене вірусом зеленої крапчастої мозаїки огірка, а отже, є потенційно небезпечним резерватом вірусної інфекції і, як наслідок, ефективним джерелом поширення вірусу.

Список використаних джерел:

- Білик М. О. Захист овочевих культур від хвороб і шкідників у закритому ґрунті : навч. посіб. / М. О. Білик, М. Д. Євтушенко, Ф. М. Марютін. – Харків : Еспада, 2003. – 464 с.
- Вірусні хвороби сільськогосподарських культур / С. М. Московець, А. Д. Бобир, Л. Ю. Глушак, А. М. Онищенко. – К. : Урожай, 1975. – 152 с.
- Глушак Л. Ю. Вирусные заболевания огурцов на Украине : автореф. дис. ... канд. биол. наук : спец. 06.01.11 "Защита растений от вредителей и болезней" / Л. Ю. Глушак. – К., 1969. – 24 с.
- Омелюта В. П. Облік шкідників і хвороб сільськогосподарських культур / В. П. Омелюта, І. В. Григорович, В. С. Чабан. – К. : Урожай, 1986. – 296 с.
- Практикум по общей вирусологии / под ред. И. Г. Атабекова. – М. : Издательство Московского Университета. – 1981. – 192 с.
- Контроль насінневої вірусної інфекції у рослин родини Cucurbitaceae та її профілактика / Т. О. Руднева, Т. П. Шевченко, В. О. Нацевич і др. // Агроекологічний журнал. – 2011. – № 2. – С. 85–88.
- Моніторинг вірусу мозаїки кавуна 2 у агроценозах Київської та Полтавської областей / Т. О. Руднева, Т. П. Шевченко, В. О. Цвігун, В. П. Поліщук // Мікробіологія і біотехнологія. – 2013. – № 4. – С. 55–62.
- Поширення вірусних захворювань рослин родини Cucurbitaceae на території України / Т. О. Руднева, Т. П. Шевченко, А. С. Бисов, В. П. Поліщук // Агроекологічний журнал. – 2008. – № 2. – С. 62–66.
- Руднева Т. О. Характеристика українських ізолятів вірусу зеленої крапчастої мозаїки огірка : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.00.06. "Вирусология" / Т. О. Руднева. – К., 2009. – 23 с.
- Характеристика ізолятів вірусу зеленої крапчастої мозаїки огірка, виділених з різних регіонів України / Т. О. Руднева, І. Г. Будзанівська, А. С. Рижкова та ін. // Мікробіологічний журнал. – 2005. – Т. 67, № 6. – С. 96–103.
- Gug-Seoun. Occurrence of Two Tobamovirus Diseases in Cucurbits and Control Measures in Korea / Gug-Seoun Choi // Plant Pathology journal. – 2001. – Vol. 17. – № 5. – P. 243–248.

12. Detection in Australia of Cucumber green mottle mosaic virus in seed lots of cucurbit crops / Fiona Constable, Andrew Daly, Mary Ann Terras at al. // Australasian Plant Disease Notes. – 2018. – P. 13–18.

13. ELISA. Theory and practice / Ed. J. R. Crowther / – N.-Y. : Humana Press, 1995. – P. 223.

14. Destruction of Cucumber Green Mottle Mosaic Virus by Heat Treatment and Rapid Detection of Virus Inactivation by RT-PCR / Sang-Min Kim, San-Hyun Nam, Jung-Myung Lee et al. // Mol. Cells. – 2003. – Vol. 16, № 3. – P. 338–342.

15. Dombrovsky A. Cucumber green mottle mosaic virus: Rapidly Increasing Global Distribution, Etiology, Epidemiology, and Management / A. Dombrovsky, LTT Tran-Nguyen, RAC Jones // Annual reviews. – 2017. – Vol. 55, № 4. – P. 231–256.

16. Hill S. A. Methods in Plant Virology / S. A. Hill. – Oxford : Alden Press. – 1984.

17. Lecoq Herve. Viruses and Virus Diseases of the Vegetables in the Mediterranean Basin / Herve Lecoq and Cecile Desbiez. // Academic Press. – 2012. – № 84. – 592 p.

18. Ling K. S. First Report of Cucumber green mottle mosaic virus Infecting Greenhouse Cucumber in Canada / K. S. Ling, R. Li, W. Zhang // Disease Notes. – 2014. – Vol. 98, № 5. – P. 701.

19. Detection of Cucumber Green Mottle Mosaic Tobamovirus (CGMMV) in Three Growth Stages of Japanese Cucumber in the Highland Area of Northern Thailand / S. Nontajak, S. Vulyasevi, N. Jonglaekha, P. Smitamana // International Journal of Agricultural Technology. – 2014. – Vol. 10, № 1. – P. 277–287.

20. Rao A. L. N. Transmission Studies with Cucumber Green Mottle Mosaic Virus / A. L. N. Rao, A. Varma // Journal of Phytopathology. – 2008. – Vol. 109, № 4. – P. 325–331.

21. Seed disinfection treatments do not sufficiently eliminate the infectivity of Cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV) on cucurbit seeds / V. Reingold, O. Lachman, O. Blaosov, A. Dombrovsky // Plant Pathology. – 2015. – № 8. – P. 245–255.

22. First Report of Cucumber green mottle mosaic virus on Melon in the United States / T. Tian, K. Posis, C. J. Maroon-Lango at al. // Plant disease. – 2014. – Vol. 98, № 8. – P. 1163.

23. Virus taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses / A. King, M. Adams, E. Lefkowitz et al. – London : Academic Press, 2012. – 1327 p.

References:

- Bilyk M., Jevtushenko M., Marjutin F. Protection of vegetable crops from diseases and pests in the closed ground. Kharkiv: Espada; 2003. Ukrainian.
- Moskovets S., Bobyr A., Glushak L., Onyschenko A. Viral diseases of crops. Kyiv: Urozhay; 1975. Ukrainian.
- Glushak L. [Viral diseases of cucumbers in Ukraine] [dissertation]. Kyiv: Institute of Microbiology and Virology. acad. Zabolotny D.K.; 1969. Ukrainian.
- Omeljuta V., Grygorovych I., Chaban V. Accounting of pests and diseases of agricultural crops. Kyiv: Urozhay; 1986. Ukrainian.
- Workshop on General Virology. Atabekov I. G., editor. Moscow: Publishing house of Moscow University; 1981.
- Rudnieva T., Shevchenko T., Natseyevych V., Polischuk V., Boyko A. Control of seed virus infection in plants Cucurbitaceae family and its prevention. Agroecological journal. 2011; (2): 85 – 88. Ukrainian.
- Rudnieva T., Shevchenko T., Tsvigun V., Polischuk V. Monitoring of Watermelon mosaic virus 2 in agrocenoses of Kyiv and Poltava regions. Microbiology and Biotechnology. 2013; (4), 55 – 62. Ukrainian. doi: 10.18524/2307-4663.
- Rudnieva T., Shevchenko T., Bysov A., Polischuk V. Virus diseases of Cucurbitaceae plants on the territory of Ukraine. Agroecological journal. 2008; (2), 62–66. Ukrainian.
- Rudnieva T.A. [Characterization of Ukrainian isolates of Cucumber green mottle mosaic virus] [dissertation]. Kyiv: Taras Shevchenko National University of Kyiv; 2009. Ukrainian.
- Rudneva T., Budzanivska I., Ryzhkova A., Shevchenko T., Demjanenko F., Polischuk V. Characterization of Ukrainian isolates of cucumber green mottle mosaic virus isolated from different regions of Ukraine. Mikrobiologichnyi Zhurnal. 2005; 67(6): 96–103. Ukrainian.
- Choi Gug-Seoun Occurrence of Two Tobamovirus Diseases in Cucurbits and Control Measures in Korea. Plant Pathology journal. 2001; 17(5): 243 – 248.
- Constable Fiona, Daly Andrew, Terras Mary Ann, Penrose Lindsay, Dall David Detection in Australia of Cucumber green mottle mosaic virus in seed lots of cucurbit crops. Australasian Plant Disease Notes. 2018; 13 – 18. doi: 10.1007/s13314-018-0302-9.
- Crowther J. ELISA. Theory and practice. New York: Humana Press; 1995.
- Kim Sang-Min, Nam San-Hyun, Lee Jung-Myung Destruction of Cucumber Green Mottle Mosaic Virus by Heat Treatment and Rapid Detection of Virus Inactivation by RT-PCR. Mol.Cells. 2003; 16(3): 338–342.
- Dombrovsky A., Tran-Nguyen LTT, Jones RAC Cucumber green mottle mosaic virus: Rapidly Increasing Global Distribution, Etiology, Epidemiology, and Management. Annual review of phytopathology. 2017; 55(4): 231–256. doi: 10.1146/annurev-phyto-080516-035349.
- Hill S. Methods in Plant Virology. Oxford: Alden Press; 1984.
- Lecoq Herve, Desbiez Cecile Viruses and Virus Diseases of the Vegetables in the Mediterranean Basin. London: Academic Press, 2012.

18. Ling K.S., Zhang R. Li, W. First Report of Cucumber green mottle mosaic virus Infecting Greenhouse Cucumber in Canada. *Disease Notes*. 2014; 98(5): 701. doi: 10.1094/PDIS-09-13-0996-PDN.

19. Nontajak S., Vulyasevi S., Jonglaekha N., Smitamana P. Detection of Cucumber Green Mottle Mosaic Tobamovirus (CGMMV) in Three Growth Stages of Japanese Cucumber in the Highland Area of Northern Thailand. *International Journal of Agricultural Technology*. 2014; 10(1): 277 – 287.

20. Rao A. L. N., Varma A. Transmission Studies with Cucumber Green Mottle Mosaic Virus. *Journal of Phytopathology*. 2008; 109(4): 325 – 331.

21. Reingold V., Lachman O., Blaosov E., Dombrovsky A. Seed disinfection treatments do not sufficiently eliminate the infectivity of Cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV) on cucurbit seeds. *Plant Pathology*. 2015; (64), 245 – 255. doi: 10.1111/ppa.12260

22. Tian T., Posis K., Maroon-Lango C.J., Mavrodieva V., Haymes S., Pitman T.L., Falk B.W. First Report of Cucumber green mottle mosaic virus on Melon in the United States. *Plant disease*. 2014; 98(8): 1163. doi: 10.1094/PDIS-02-14-0176-PDN.

23. King A., Adams M., Lefkowitz E. Virus taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. London: Academic Press, 2012.

Надійшла до редколегії 19.09.2018

Отримано виправлений варіант 20.10.2018

Підписано до друку 20.10.2018

Received in the editorial 19.09.2018

Received a revised version on 20.10.2018

Signed in the press on 20.10.2018

Т. Руднева, канд. биол. наук, Т. Шевченко, канд. биол. наук, А. Шевченко, канд. биол. наук, И. Будзанивская, д-р биол. наук
УНЦ "Институт биологии и медицины",
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

ВИРУС ЗЕЛеной КРАПЧАТОЙ МОЗАИКИ ОГУРЦА В АГРОЦЕНОЗАХ УКРАИНЫ

Вирус зеленой крапчатой мозаики огурца (ВЗКМО, рода *Tobamovirus*) распространен во многих странах мира и с одинаковой эффективностью поражает растения как закрытого, так и открытого грунта. Круг растений-хозяев этого вируса ограничивается растениями семейства тыквенных (*Cucurbitaceae*), а потери урожая от поражения ВЗКМО могут составлять от 25 до 50 %. На сегодня, несмотря на богатый арсенал противовирусных средств, вирус зеленой крапчатой мозаики огурца полностью элиминировать из посадочного материала, к сожалению, не удастся. В экологических условиях Украины вирус зеленой крапчатой мозаики огурца регулярно детектируется исключительно на тепличных культурах огурцов. Однако исследования зарубежных ученых указывают на широкое распространение ВЗКМО на растениях арбузов, дынь, огурцов и кабачков как в закрытом, так и в открытом грунте. Учитывая такую ситуацию и принимая во внимание большую вредоносность ВЗКМО, исследование вопроса о распространении вируса на территории Украины является очень актуальным. Целью работы было исследование распространения вируса зеленой крапчатой мозаики огурца на растениях семейства тыквенных в условиях открытого грунта на территории Украины. Методы: иммуноферментный анализ, электронная микроскопия, статистические методы. Результаты: проанализировано распространение вируса зеленой крапчатой мозаики огурца (ВЗКМО) на овощных культурах растений семейства тыквенных в условиях открытого грунта на территории Украины. Установлено, что на территории нашей страны в условиях открытого грунта ВЗКМО практически не встречается. За последние восемь лет были зафиксированы лишь единичные случаи поражения растений огурца, кабачка, тыквы и дыни в агроценозах Киевской и Полтавской областей. Причем в половине случаев наблюдалась смешанная инфекция, представленная двумя или тремя вирусами. Так, среди 250 исследованных образцов вирус зеленой крапчатой мозаики огурца был обнаружен лишь в пяти образцах растений, что составляет 2,4 % от общего количества образцов. Следует отметить, что моноинфекция наблюдалась исключительно на огурцах и арбузах, тогда как на дынях и кабачках детектировали смешанную инфекцию. На растениях дыни детектировали смешанную инфекцию в виде ВЗКМО и вируса арбузной мозаики 2 (ВАМ 2 семейства *Potyviridae*) или ВАМ 2 и вируса желтой мозаики цуккини (ВЖМЦ семейства *Potyviridae*). Что касается кабачков, то они были инфицированы смесью ВЗКМО и вирусом огуречной мозаики (ВОМ, семейства *Bromoviridae*). Проверены семена огурцов, кабачков, цуккини, дынь и арбузов различных коммерческих фирм, занимающихся продажей семян в Украине, и установлено, что некоторый процент этих семян контаминирован вирусом зеленой крапчатой мозаики огурца. Выводы: в результате многолетних исследований было установлено, что вирус зеленой крапчатой мозаики огурца на территории Украины практически не поражает растения семейства тыквенных в открытом грунте. Нами были проверены коммерческие сорта семян тыквенных растений относительно вирусной контаминации и установлено, что 16 % из них поражены вирусом зеленой крапчатой мозаики огурца, а потому являются потенциально опасным резервуаром вирусной инфекции и, как следствие, серьезной причиной появления заболеваний растений семейства тыквенных в открытом грунте.

Ключевые слова: вирус зеленой крапчатой мозаики огурца, агроценозы, открытый грунт, овощные растения, семена.

T. Rudnieva, PhD, T. Shevchenko, PhD, A. Shevchenko, PhD, I. Budzanivska, Dr. Sc.
ESC "Institute of Biology and Medicine",
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

CUCUMBER GREEN MOTTLE MOSAIC VIRUS IN AGROECOSYSTEMS OF UKRAINE

Cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV) is a widespread pathogen capable of infecting plants cultivated in both greenhouse and open-field conditions with equal efficiency. The host range of CGMMV is restricted to cucurbit plants whereas induced crop losses may reach 25–50 %. Despite the wide array of available antiviral techniques, CGMMV could not be completely removed from the seed/planting material. In Ukraine, Cucumber green mottle mosaic virus occurs almost exclusively on greenhouse cucumbers. However, data from other countries suggest wide spread of CGMMV on watermelons, melons, cucumbers and squashes grown in both greenhouse and open-field conditions. In this view and taking into account high pathogenicity of CGMMV, we aimed at studying spread of Cucumber green mottle mosaic virus in Ukraine on cucurbit plants in the open-field conditions. Methods: enzyme-linked immunosorbent assay, electron microscopy, statistical methods. Results : Spread of Cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV) on cucurbit vegetable crops grown in open-field conditions was analyzed in Ukraine. It was shown that CGMMV is an extremely rare pathogen in open-field conditions in our country. During the last 8 years we have confirmed only several cases of CGMMV infection on cucumbers, squash, pumpkin and melon in Kyiv and Poltava regions. Additionally, half of these cases were mixed infection of 2–3 viruses. From 250 collected samples, CGMMV was detected in 5 plants totaling to only 2,4 %. Importantly, mono-infection of CGMMV was shown exclusively on cucumbers and watermelons, whereas melons and squashes were mixed infected. Melons were typically infected with CGMMV and Watermelon mosaic virus 2 (WMV 2) or with WMV 2 and Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV). Squash plants were infected with CGMMV and Cucumber mosaic virus (CMV). Consequently, we have checked commercially available seeds of cucumber, squash, zucchini, melon and watermelon from different producers in Ukraine for virus contamination and have confirmed the occurrence of CGMMV in some seed batches. Conclusions: Long-term observations in Ukraine showed that Cucumber green mottle mosaic virus infected mostly cucumbers cultivated in greenhouses and was only rarely found in cucurbits grown in open-field conditions. Screening of commercially available seed material indicated that 16 % of it was contaminated with CGMMV. Basing on available data, it is presumed that virus-contaminated seed material may pose a major threat of CGMMV occurrence and spread on cucurbits cultivated in open-field conditions.

Key words: Cucumber green mottle mosaic virus, agroecosystems, open-field conditions, vegetable crops, seed.

УДК.581.143.01/07:577.125

В. Стороженко, канд. біол. наук, Н. Светлова, канд. біол. наук, М. Коваленко, асп.,
Л. Бацманова, канд. біол. наук, Н. Таран, д-р біол. наук, проф.
ННЦ "Інститут біології та медицини",
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

ІНДУКЦІЯ СТІЙКОСТІ ПРОРОСТКІВ ПШЕНИЦІ ДО ДІЇ МОДЕЛЬОВАНОЇ ПОСУХИ КОЛОЇДНИМ РОЗЧИНОМ НАНОЧАСТИНОК Cu^{2+} І Zn^{2+}

Досліджено вплив колоїдного розчину наночастинок Cu^{2+} і Zn^{2+} на про/антиоксидантний баланс, вміст фотосинтетичних пігментів (хлорофілів а, b і каротиноїдів), співвідношення хлорофілів та морфометричні показники (відносний вміст води в листках, площа листової поверхні) проростків озимої пшениці *Triticum aestivum* L. сортів Акведук (степовий екотип, стійкий до посухи) та Столична (лісостеповий екотип, чутливий до посухи) в умовах модельованої посухи. Посуху створювали шляхом припинення поливу на 8 добу після появи сходів та підтримання вологості ґрунту на рівні 30 % від повної вологоємності протягом 3 діб. Передпосівну обробку насіння наночастинками Cu^{2+} і Zn^{2+} виконували шляхом замочування в дослідному розчині (1 частина маточного колоїдного розчину : 100 частин води) протягом 4 годин. Контрольний варіант замочували в дистильованій воді. Потім насіння відмивали та висаджували в піщану культуру. Виявлено сортову специфічність впливу колоїдного розчину наночастинок металів на проростки сортів Акведук і Столична. Передпосівна обробка насіння наночастинками Cu^{2+} і Zn^{2+} призводила до істотних змін про/антиоксидантного балансу в листках проростків, які полягали у зниженні рівня накопичення ТБК-активних продуктів, підвищенні активності ключових антиоксидантних ферментів (супероксиддисмутази та каталази), стабілізації вмісту фотосинтетичних пігментів, збільшенні відносного вмісту води в листках і площі листової поверхні за умов модельованої посухи.

Загалом за умов посухи передпосівна обробка насіння колоїдним розчином наночастинок спричиняла позитивний вплив на про/антиоксидантний баланс рослин і морфометричні параметри листків більшою мірою у проростків сорту степового екотипу (Акведук) і меншою – у проростків сорту лісостепового екотипу (Столична).

Ключові слова: наночастинки Cu^{2+} і Zn^{2+} , пшениця, передпосівна обробка насіння, ТБК-активні продукти, супероксиддисмутаза, каталаза.

Зміни клімату найчастіше пов'язують із глобальним потеплінням і посухами. Виходячи із сучасних прогнозів, передбачається, що до 2025 року приблизно 1,8 мільярда людей зіткнуться з абсолютною нестачею води і 65 % населення у світі будуть жити в умовах часткової нестачі води [1].

У світовому масштабі зернові злаки займають більш ніж 50 % загального врожаю, а використання зерна має першорядну важливість для виробництва їжі та промислової сировини [2].

Водночас зернові культури дуже потерпають від недостатнього водозабезпечення, демонструючи різні морфологічні, фізіологічні, біохімічні та молекулярні реакції на посуху. У вегетативні та генеративні фази розвитку рослин посуха може викликати негативні зворотні і незворотні зміни фізіологічного стану рослин [3–6].

При цьому сучасні агротехнології, спрямовані на підвищення врожайності часто не враховують екологічний фактор, особливо в країнах, що розвиваються. Водночас вартість добрив і меліорації з кожним роком підвищується у зв'язку з подорожчанням вартості первинних ресурсів, необхідних для їх впровадження в агровиробництво, що ставить під загрозу продовольчу безпеку багатьох країн. У зв'язку з цим для вирішення питання підвищення врожайності агрокультур і стабільного природокористування в умовах посухи необхідно є розробка нових екологічно безпечних підходів, які не потребують великих фінансових витрат. Вони мають базуватися на принципі стимулювання адаптаційного потенціалу рослин в умовах посухи за рахунок пластичних та енергетичних резервів рослини [7].

Використання нанотехнологій, на нашу думку, може допомогти у вирішенні цього питання. Цьому може послужити як відносна дешевизна виробництва наночастинок [8], так і низькі витрати цих препаратів на посівних площах [9], а також їх слабка фітотоксичність.

Вплив наночастинок на фізіологічний стан рослин пшениці на різних рівнях їх організації, починаючи з молекулярного, було вивчено у багатьох рослин. Відомо, що наночастинок в різних концентраціях можуть індукувати як позитивні, так і негативні біологічні ефекти [10]. У багатьох роботах описувався токсичний вплив наночастинок на ріст рослин, їх розвиток і репродукцію [11–14].

Водночас результати наших попередніх робіт показали, що наночастинок, отримані шляхом фізичного синтезу, мають більш низьку фітотоксичність [15] порівняно з наночастинками, отриманими шляхом хімічного синтезу.

Особливий інтерес викликає питання використання бінарних композицій наночастинок в агротехнологіях для підвищення біологічної продуктивності агрокультур у зв'язку з його недостатнім дослідженням. Зокрема, найбільш актуальним є пошук способів підвищення адаптаційного потенціалу культурних рослин у стресових умовах за допомогою нанопрепаратів.

У зв'язку з цим цікавими та перспективними також є результати, отримані на агрокультурах, зокрема на озимій пшениці, яка була вирощена в умовах водного дефіциту в представленому експерименті.

Метою цієї роботи було визначення впливу колоїдного розчину наночастинок Cu^{2+} і Zn^{2+} на про/антиоксидантний баланс та морфометричні параметри проростків пшениці сортів пшениці лісостепового і степового екотипів в умовах посухи.

Матеріали та методи досліджень. У роботі було використано сорти рослин озимої пшениці *Triticum aestivum* L. Столична (лісостеповий екотип, чутливий до посухи сорт) і Акведук (степовий екотип, стійкий до посухи сорт).

У досліді проводили передпосівну обробку насіння пшениці колоїдним розчином наночастинок металів Cu^{2+} і Zn^{2+} . Варіанти досліді були такими: 1 – контроль (вирощування за оптимальних умов водозабезпечення), 2 – передпосівна обробка колоїдним розчином наночастинок Cu^{2+} і Zn^{2+} , вирощування за оптимальних умов водозабезпечення, 3 – посуха, 4 – посуха, передпосівна обробка насіння колоїдним розчином наночастинок Cu^{2+} і Zn^{2+} .

Колоїдний розчин було створено на кафедрі технології конструкційних матеріалів і матеріалознавства Національного університету біорізноманіття та природокористування України шляхом диспергування гранул міді і цинку імпульсами електричного струму з амплітудою 100–2000 А [16]. Насіння замочували в дослідних розчинах (1 частина маточного колоїдного розчину : 100 частин води) на 4 години, а потім відмивали дисти-

льованою водою і поміщали в термостат на добу за температури 25°C. Контрольний варіант замочували в дистильованій воді. Потім насіння висаджували в піщану культуру і вирощували за температури 25°C (фотоперіод 16 год, густина потоку фотонів 250 мк/моль · м²с⁻¹), і поливали дистильованою водою. Вологість ґрунту підтримували на рівні 70 % від повної вологоємності [17]. Густина посіву становила 70 рослин на одну вегетаційну посудину (0,29 м²). Модельовану посуху створювали на 8 добу після появи сходів шляхом припинення поливу і підтримували на рівні 30 % від ПВ протягом 3 діб. Після цього вимірювали фізіологічні та біохімічні показники проростків. Інтенсивність перекисного окиснення ліпідів визначали за вмістом ТБК-активних продуктів, використовуючи реакцію з 2-тіобарбітуровою кислотою [18]. Активність супероксиддисмутази (СОД) вимірювали за Гіанополітисом і Райзом [19], каталази за Кумаром та ін. [20]. Вміст фотосинтетичних пігментів в листках визначали після їх екстракції диметилсульфоксидом

при температурі 63°C протягом 3 год. [21]. Відносний вміст води в листках визначали за Смартом [22], а площу листової поверхні – за Чанда [23]. Експеримент було здійснено в 3 біологічних і аналітичних повторностях. Статистичну обробку експериментальних результатів здійснювали за допомогою програми "Microsoft Excel".

Результати та їх обговорення. Аналіз отриманих в роботі результатів демонструє, що вирощування проростків пшениці в умовах посухи призводило до збільшення вмісту ТБК-активних продуктів в фотосинтетичних тканинах як сорту Столична (на 27 %), так і сорту Акведук (на 30 %), що є свідченням розвитку окиснювального стресу. Водночас слід зазначити, що передпосівна обробка наночастинками металів не викликала підвищення вмісту ТБК-активних продуктів під час вирощування проростків за нормальних умов, а в умовах посухи сприяла зниженню їх вмісту в листках сорту Столична на 11 % і сорту Акведук – на 22 % (рис. 1).

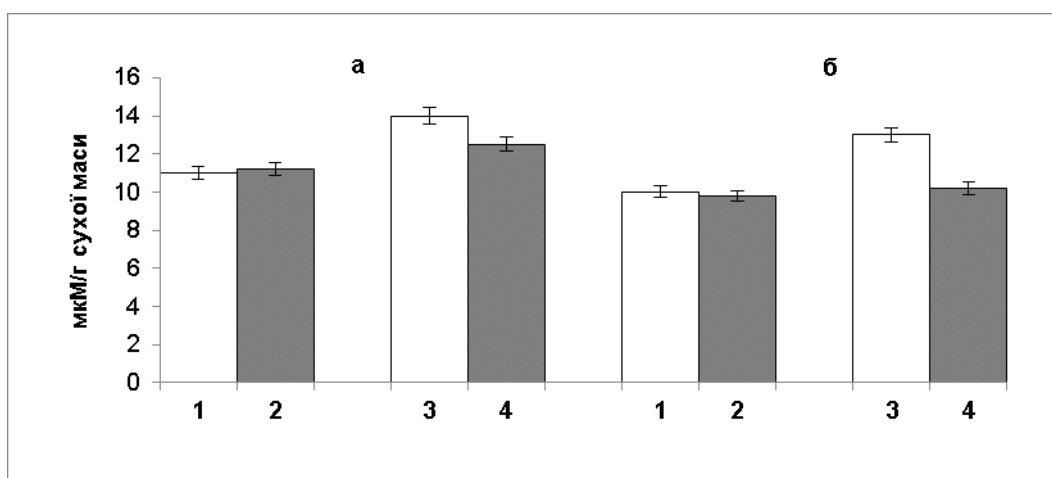


Рис. 1. Вплив колоїдного розчину наночастинок Cu²⁺ і Zn²⁺ на вміст ТБК-активних продуктів в листках проростків озимої пшениці сортів Столична (а) і Акведук (б) в умовах посухи: 1 – контроль, 3 – посуха, 2 – Cu²⁺ і Zn²⁺, 4 – Cu²⁺ і Zn²⁺ + посуха

Активність СОД в листках проростків сорту лісостепоного еко типу Столична за нормальних умов була вищою ніж у сорту степового еко типу Акведук на 31 %. Також з'ясувалося, що обробка насіння колоїдним розчином наночастинок Cu²⁺ і Zn²⁺ викликала збільшення

активності СОД на 22 % в умовах модельованої посухи в листках проростків сорту степового еко типу Акведук порівняно з проростками цього сорту, які перебували в умовах посухи без передпосівної обробки рослин наночастинами (рис. 2).

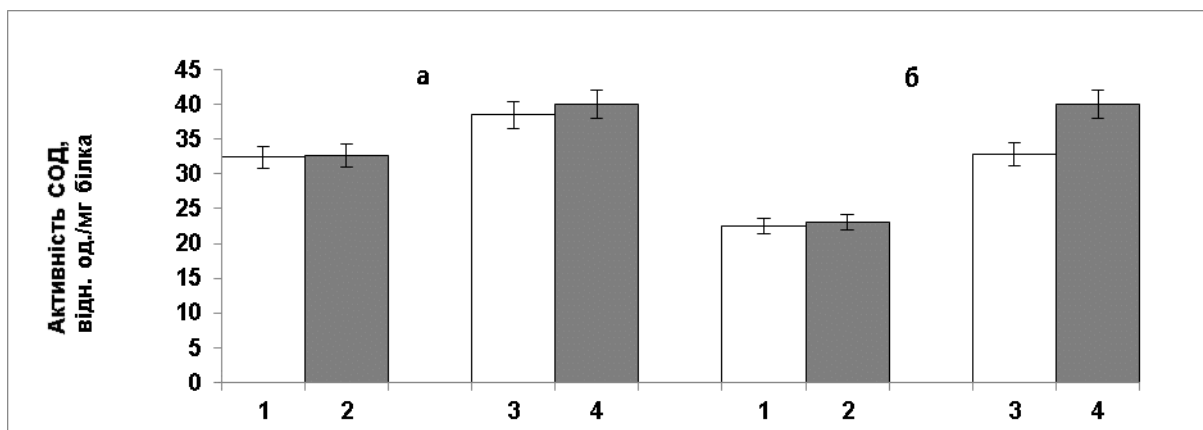


Рис. 2. Вплив колоїдного розчину наночастинок Cu²⁺ і Zn²⁺ на активність СОД в листках проростків озимої пшениці сортів Столична (а) і Акведук (б) в умовах посухи: 1 – контроль, 3 – посуха, 2 – Cu²⁺ і Zn²⁺, 4 – Cu²⁺ і Zn²⁺ + посуха

Водночас подібну тенденцію спостерігали і для каталази. Активність цього ферменту змінювалася у проростків після екзогенної обробки рослин наночастинками. У той же час для сорту Акведук, наночастинки металів індукували підвищення активності каталази на 21 % в умовах посухи порівняно з проростками, які перебували в умовах модельованої посухи без передпосівної обробки насіння наночастинками (рис. 3). Виходячи з нашої гіпотези, активація антиоксидантної системи рослин під впливом бінарної композиції наночастинок Cu^{2+} і Zn^{2+} в нашій роботі, пов'язана з можливим залученням наночастинок в ензиматичні реакції мета-

болізму рослин. Ця гіпотеза підтверджується тим, що наночастинки можуть транспортуватися через клітини епідермісу і завдяки своїм малим розмірам, можливий їх контакт з високомолекулярними органічними сполуками клітини. У той же час, була доведена можливість міжклітинного транспорту наночастинок через плазмодесми [24]. На нашу думку, зниження рівня накопичення ТБК-активних продуктів в нашому експерименті в умовах посухи після передпосівної обробки насіння рослин пов'язано з підвищенням активності антиоксидантних ферментів СОД і каталази, за рахунок чого знижувався рівень утворення ТБК-активних продуктів (рис. 1–3).

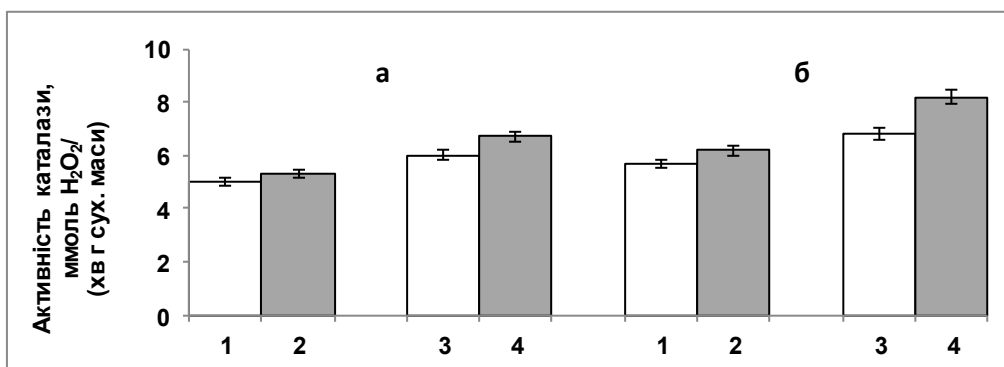


Рис. 3. Вплив колоїдного розчину наночастинок Cu^{2+} і Zn^{2+} на активність каталази в листках проростків озимої пшениці сортів Столична (а) і Акведук (б) в умовах посухи: 1 – контроль, 3 – посуха, 2 – Cu^{2+} і Zn^{2+} , 4 – Cu^{2+} і Zn^{2+} + посуха

Вміст фотосинтетичних пігментів в листках проростків озимої пшениці лісостепового (Столична) і степового (Акведук) до посухи сортів також відрізнявся як в умовах модельованої посухи після передпосівної обробки проростків колоїдним розчином наночастинок, так і без цієї обробки. За нормальних умов вміст хлорофілів у листках озимої пшениці сорту Акведук був на 13 % вищим порівняно із сортом Столична. Після обробки насіння колоїдним розчином наночастинок Cu^{2+} і Zn^{2+} спостерігали збільшення на 13 % вмісту хлорофілів в листках пшениці сорту Столична порівняно з контролем, а в сорту Акведук достовірних відмінностей за вмістом хлорофілу між цими двома варіантами не спостерігали.

Модельована посуха на рівні 30 % від ПВ індукувала істотне зниження загального вмісту хлорофілів в листках проростків обох сортів Столична та Акведук, причому для сорту Акведук воно було більш істотним (на 45 %) порівняно із сортом Столична (на 29 %). У листках пшениці обох сортів після передпосівної обробки насіння спостерігали менш суттєве зниження вмісту хлорофілів за дії посухи ніж без обробки в умовах водного стресу. Зокрема, колоїдний розчин наночастинок Cu^{2+} і Zn^{2+} індукував зменшення вмісту хлорофілів на 18 % і 22 % за дії посухи порівняно з контролем (рис. 4).

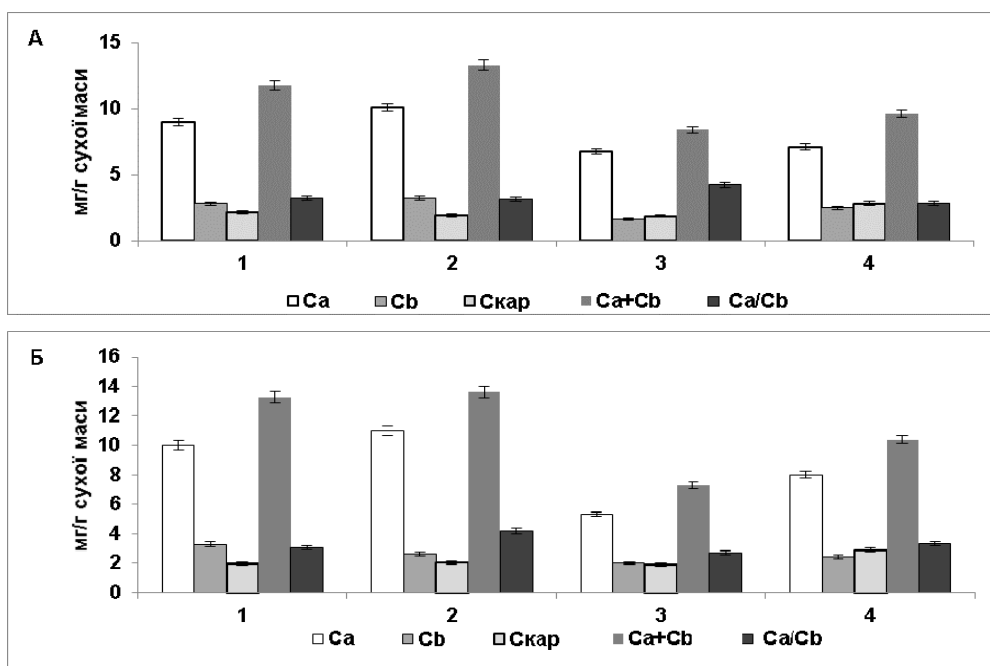


Рис. 4. Вміст фотосинтетичних пігментів в листках озимої пшениці сортів Столична (А) і Акведук (Б): 1 – контроль; 2 – Cu^{2+} і Zn^{2+} ; 3 – посуха; 4 – посуха + Cu^{2+} і Zn^{2+}

Водночас спостерігали зміни вмісту окремих форм хлорофілу та їх співвідношень для окремих варіантів досліду. Передпосівна обробка насіння колоїдним розчином наночастинок індукувала підвищення вмісту хл а в листках на 12 % у сорту Столична та на 10 % у сорту Акведук. У сорту Столична вміст хл а в умовах посухи знижувався на 24 %, проте передпосівна обробка колоїдним розчином наночастинок Cu^{2+} і Zn^{2+} індукувала зниження вмісту хл а на 21 % за дії водного стресу. Для сорту Акведук спостерігали подібну тенденцію – посуха викликала зменшення вмісту хл а на 47 %, хоча передпосівна обробка колоїдним розчином наночастинок індукувала зниження вмісту хл а лише на 20 % (рис. 4). Вміст хл b також варіював в умовах посухи без обробки та з обробкою розчином наночастинок Cu^{2+} і Zn^{2+} . У сорту Столична спостерігали збільшення вмісту хл b в листках на 14 %, а у сорту Акведук він знижувався на 20 % після передпосівної обробки насіння. У той же час за умов посухи спостерігали зниження вмісту хл b на 43 % у сорту Столична та на 40 % у сорту Акведук. У проростків пшениці після передпосівної обробки наночастинок за дії посухи спостерігали зниження вмісту хлорофілів у сорту Столична на 11 % і у сорту Акведук на 27 %. Співвідношення хл а / хл b в листках проростків пшениці змінювалося за сумісної дії наночастинок і посухи. Змін співвідношення хл а / хл b в листках проростків сорту Столична після передпосівної обробки наночастинок Cu^{2+} і Zn^{2+} не спостерігали, а у сорту Акведук воно збільшувалося на 37 %. Посуха індукувала збільшення співвідношення хл а / хл b на 32 % в листках сорту Столична, а у сорту Акведук – зниження на 18 %. Передпосівна обробка наночастинок Cu^{2+} і Zn^{2+} викликала зниження співвідношення хл а / хл b на 12 % в листках сорту Столична та його підвищення в листках сорту Акведук на 37 %. Посуха, навпаки, індукувала підвищення співвідношення хл а/хл b на 32 % у чутливого сорту Столична та зниження на 12 % у стійкого до дії посухи сорту Акведук (рис. 4).

Зміни вмісту фотосинтетичних пігментів в листках у відповідь на вплив нанопрепаратів були продемонстровані в роботах [25, 26]. Цікаві результати були отримані на рослинах сої з додаванням наночастинок суперпа-

рамагнетичного оксиду заліза (SPIONs) в гідропонне середовище. Спостерігали збільшення вмісту хлорофілу в субапикальних листках сої, хоча це і не призводило до збільшення фотосинтетичної продуктивності. Було також помічено, що дія SPIONs на вміст хлорофілів може мати вплив на фотохімічні реакції [25]. Крім того, було підтверджено включення наночастинок у фотосинтетичний метаболізм. Зокрема, було доведено, що наночастинки золота можуть виступати як штучним акцептором, так і донором електронів під час фотосинтезу [27].

Збільшення співвідношення хл а/хл b за дії наночастинок може свідчити про зміну стехіометрії світлозбиральних комплексів ФС I і ФС II і, опосередковано, про зміну їхньої активності по відношенню одна до одної [28].

Вміст каротиноїдів в листках пшениці сорту Столична після впливу наночастинок Cu^{2+} і Zn^{2+} знижувався на 10 %. У сорту Акведук наночастинки не чинили впливу на вміст каротиноїдів в листках за нормальних умов водного режиму.

В умовах посухи загальний вміст каротиноїдів знижувався на 14 % в листках сорту Столична, а в листках сорту Акведук не відрізнялася від контролю. У той же час після попередньої обробки насіння наночастинок Cu^{2+} і Zn^{2+} за дії посухи вміст каротиноїдів збільшилася на 31 % в листках сорту Столична та на 50 % в листках сорту Акведук.

У нашій роботі збільшення вмісту каротиноїдів в листках проростків, вирощених з насіння, передпосівна обробка якого здійснювалася розчином наночастинок після впливу посухи демонструє добре відомий адаптаційний механізм [29]. Зокрема, каротиноїди з одного боку є низькомолекулярними антиоксидантами, біосинтез яких в листках збільшується у відповідь на стрес за рахунок гасіння активних форм кисню, а з іншого – за рахунок фізико-хімічних властивостей своїх молекул вони розширюють спектр поглинання доступної для рослин світлової радіації.

Істотне підвищення вмісту каротиноїдів у проростках посухостійкого сорту Акведук порівняно з нестійким до посухи сортом Столична поряд з високою активністю СОД і каталази в їх листках вказують на більш високий антиоксидантний статус досліджених рослин.

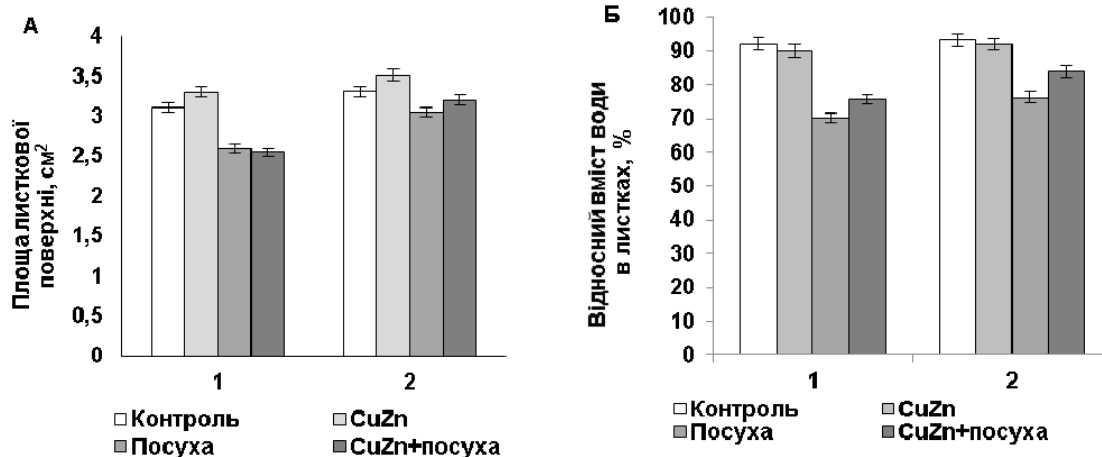


Рис. 5. Площа листової поверхні (А) і відносний вміст води в листках (Б) озимої пшениці сортів Столична та Акведук за дії посухи і колоїдного розчину наночастинок Cu^{2+} і Zn^{2+} :

1 – Столична, 2 – Акведук

Передпосівна обробка насіння пшениці колоїдним розчином наночастинок не викликала змін розмірів площі листової поверхні за нормальних умов водного режиму рослин у обох сортів. Посуха індукувала зменшення площі листової поверхні у проростків сорту

Столична на 16 % і Акведук на 8 %. У той же час дія наночастинок за посухи індукувала невелике збільшення площі листової поверхні у посухостійкого сорту Акведук (на 5 % порівняно з попереднім варіантом) (рис. 5).

Тенденцію збільшення площі листової поверхні листків за дії наночастинок було описано в роботі [30], присвяченій вивченню впливу трьох різних фізичних форм наночастинок оксиду цинку на морфометричні показники рослин кукурудзи. Спостерігалось збільшення площі листової поверхні рослин під впливом всіх трьох форм окремо.

Відносний вміст води в листках після обробки насіння колоїдним розчином наночастинок за нормальних умов водозабезпечення не змінювався в рослинах обох сортів, хоча в умовах посухи спостерігали зниження цього показника – на 24 % в проростках сорту Столична та 18 % в проростках сорту Акведук відповідно. Навпаки, сумісний вплив колоїдного розчину наночастинок і посухи індукував підвищення відносного вмісту води в листках на 8 % у рослин сорту Столична та 10 % у рослин сорту Акведук порівняно з проростками обох сортів, які перебували в умовах посухи (рис. 5).

Позитивний вплив на фізіологічний стан проростків за дії посухи було виявлено за змінами відносного вмісту води в листках, яке було вищим у проростків, вирощених з насіння яке було попередньо оброблене колоїдним розчином наночастинок Cu^{2+} і Zn^{2+} . Подібний ефект був виявлений після впливу наночастинок анальциту на рослини пшениці і кукурудзи [31].

Таким чином, в умовах посухи спостерігався адаптивний ефект впливу наночастинок Cu^{2+} і Zn^{2+} на стан фотосинтетичного апарату, який проявлявся як у вигляді змін вмісту і співвідношення фотосинтетичних пігментів, так і на рівні антиоксидантної системи, і в кінцевому підсумку на рівні організму – за показниками водного режиму проростків і їх морфометричних параметрів.

Висновки. В умовах посухи колоїдний розчин наночастинок Cu^{2+} і Zn^{2+} спричиняв позитивний вплив на про / антиоксидантний баланс рослин і морфометричні параметри листків більшою мірою у проростків сорту степового екотипу (Акведук) і в меншій – у проростків сорту лісостепового екотипу (Столична). Спостерігалось зниження рівня накопичення ТБК-активних продуктів і підвищення активності антиоксидантних ферментів – СОД і каталази, що характеризує підвищення антиоксидантного статусу рослин за дії наночастинок в умовах посухи.

Зміна співвідношення хлорофілу в листках (хл а/хл b) поряд з підвищенням вмістом каротиноїдів в листках характеризувало прояв адаптації рослин до посухи за дії колоїдного розчину наночастинок Cu^{2+} і Zn^{2+} . На додаток, зміни морфометричних параметрів рослин, таких як площа листової поверхні і відносний вміст води в листках є наслідком індукції адаптаційних механізмів у досліджених рослин в умовах посухи на організменному рівні.

Список використаних джерел:

1. Nezhadahmadi A. Drought tolerance in wheat / A. Nezhadahmadi, Z. H. Prodhan, G. Faruq // *Sci World J.* – 2013. – № 610721. doi: 10.1155/2013/610721.
2. Mochida K. Unlocking Triticeae genomics to sustainably feed the future / K. Mochida, K. Shinozaki // *Plant Cell Physiol.* – 2013. – № 54. – P. 1931–1950.
3. Accumulation of osmoprotectants in wheat varieties of different drought tolerance/ Z. S. Szegletes, L. Erdei, I. Tari, L. Cseuz // *Cereal Res. Commun.* – 2000. – № 28. – P. 403–410.
4. Zhu J. K. Salt and drought stress signal transduction in plants / J. K. Zhu // *Ann Rev Plant Biol.* – 2002. – № 53. – P. 247–273.
5. Lawlor D. W. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants / D. W. Lawlor, G. Cornic // *Plant Cell Environ.* – 2002. – № 25. – P. 275–294.
6. Yordanov I. Plant responses to drought, acclimation, and stress tolerance/ I. Yordanov, V. Velikova, T. Tsonev // *Photosynthetica.* – 2000. – № 38. – P. 171–186.
7. Kang Y. Climate change impacts on crop yield, crop water productivity and food security / Y. Kang, S. Khan, X. Ma // *Prog Nat Sci.* – 2009. – № 19. – P. 1665–1674.
8. Biocompatible magnetite/gold nanohybrid contrast agents via green chemistry for MRI and CT bioimaging / S. Narayanan, B. N. Sathy, U. Mony et al. // *ACS Appl Mater Interfaces.* – 2012. – № 4. – P. 251–260.
9. Using a colloidal solution of metal nanoparticles as micronutrient fertilizer for Cereals / L. M. Batsmanova, L. M. Gonchar, N. Yu. Taran et al. // *Proc. Int. Conf. Nanomaterials: Appl. Properties.* – 2013. – Vol. 2(4). – P. 04NABM14-1–04NABM14-2.
10. The effect of copper and zinc nanoparticles on the growth parameters, contents of ascorbic acid, and qualitative composition of amino acids and acylcarnitines in *Pistia stratiotes* L. (Araceae) / O. Olkhovych, M. Volkogon, N. Taran et al. – *Nanoscale Res Lett.* – 2016. – Vol. 11. № 218. doi:1186/s11671-016-1422-9
11. Silver nanoparticle toxicity effect on growth and cellular viability of the aquatic plant *Lemna gibba* / A. Oukarroum, L. Barhoumi, L. Pirastru, D. Dewez // *Environ. Toxicol. Chem.* – 2013. – № 32(4). – P. 902–907.
12. Chichiriccò G. Penetration and toxicity of nanomaterials in higher plants / G. Chichiriccò, A. Poma // *Nanomaterials.* – 2015. – № 5(2). – P. 851–873.
13. Mustafa G. Toxicity of heavy metals and metal-containing nanoparticles on plants / G. Mustafa, S. Komatsu // *Biochimica et Biophysica Acta.* – 2016. – № 1864 (8). – P. 932–944.
14. Silver and titanium dioxide nanoparticle toxicity in plants: a review of current research / A. Cox, P. Venkatachalam, S. Sahi, N. Sharma // *Plant Physiol Biochem.* – 2016 – № 107. – P. 147–163.
15. Phytotoxicity of colloidal solutions of metal-containing nanoparticles / I. O. Konotop, M. S. Kovalenko, V. Z. Ulynets et al. // *Cytol Genet.* – 2014. – № 48(2). – P. 99–102.
16. Mother colloidal solution of metals / K. H. Lopatko, E. H. Afandilants, S. M. Kalenska, O. L. Tonkha. B01J 13/00 Patent of Ukraine № 38459, 12 Jan 2009.
17. Современные методы исследования и оценки засухо- и жароустойчивости растений : метод. пособ. / И. А. Григорюк, В. И. Ткачев, С. В. Савинский, Н. Н. Мусиенко. – К. : Науковий світ, 2003. – 139 с.
18. Андреева Л. И. Модификация метода определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой / Л. И. Андреева, Л. А. Кожемякин, А. А. Кишкун // *Лаб. дело.* – 1988. – № 11. – С. 41–43.
19. Giannopolitis C. N. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants / C. N. Giannopolitis, S. K. Ries // *Plant Physiol.* – 1977. – № 59(2). – P. 309–314.
20. Kumar C. N. Changes in lipid peroxidation and lipolytic and free-radical scavenging enzyme during aging and sprouting of potato (*Solanum tuberosum* L.) seed-tubers / C. N. Kumar, N. Knowles // *Plant Physiol.* – 1993. – № 102. – P.115–124.
21. Wellburn A. R. The spectral determination of chlorophylls a and b as well as the total carotenoids using various solvents with spectrophotometers of different resolution / A. R. Wellburn // *J Plant Physiol.* – 1994. – № 144(3). – P. 307–313.
22. Smart R. E. Rapid estimates of relative water content/ R. E. Smart, G. E. Bingham // *Plant Physiol.* – 1974. – № 53(2). – P. 258–260.
23. Chanda S. V. Estimation of leaf area in wheat using linear measurements / S. V. Chanda, Y. D. Singh // *Plant Breed Seed Sci.* – 2002. – № 46(2). – P. 75–79.
24. Transport of gold nanoparticles through plasmodesmata and precipitation of gold ions in woody poplar / G. Zhai, K. S. Walters, D. W. Peate, P. J. J. Alvarez, J. L. Schnoor // *Environ Sci Technol Lett.* – 2014. – № 1(2). – P. 146–151.
25. Effects of magnetite nanoparticles on soybean chlorophyll / M. H. Ghafariyan, M. J. Malakouti, M. R. Dadpour et al. // *Environ Sci Technol.* – 2013. – № 47(18). – P. 10645–10652.
26. Interaction between chlorophyll and silver nanoparticles: a close analysis of chlorophyll fluorescence quenching. / W. F. Falco, A. M. Queiroz, J. Fernandes et al. // *J Photochem Photobiol A Chem.* – 2015. – № 299. – P. 203–209.
27. Barazzouk S. Photoinduced electron transfer between chlorophyll a and gold nanoparticles/ S. Barazzouk, P. V. Kamat, S. Hotchandani // *J. Phys. Chem. B.* – 2005. – № 109 (2). – P. 716–723.
28. Green B. R. The chlorophyll-carotenoid proteins of oxygenic photosynthesis/ B. R. Green, D. G. Durnford // *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* – 1996. – № 47. – P. 685–714.
29. Havaux M. The violaxanthin cycle protects plants from photooxidative damage by more than one mechanism/ M. Havaux, K. K. Niyogi // *Proc Natl Acad Sci. USA.* – 1999. – № 96. – P. 8762–8767.
30. The effects of zinc oxide nanoparticles on growth parameters of corn (SC704)/ M. Taheri, H. A. Qarache, A. A. Qarache, M. Yoosefi // *STEM Fellowship J.* – 2015. – № 1(2). – P. 17–20.
31. Enhancement of drought resistance in wheat and corn by nanoparticles of natural mineral analcite/ N. V. Zaimenko, N. P. Didyk, O. I. Dzyuba et al. // *Ecologia Balkanica* – 2014. – № 6(1). – P. 1–10.

References:

1. Nezhadahmadi A., Prodhan G. Faruq Drought tolerance in wheat/ *Sci World J.* – 2013. – 610721. doi: 10.1155/2013/610721.
2. Mochida K., Shinozaki K. Unlocking Triticeae genomics to sustainably feed the future/ *Plant Cell Physiol.* – 2013. – 54. – P.1931–1950.
3. Szegletes Z., Erdei L., Tari I., L. Cseuz Accumulation of osmoprotectants in wheat varieties of different drought tolerance // *Cereal Res. Commun.* – 2000. – № 28. – P. 403–410.
4. Zhu J. Salt and drought stress signal transduction in plants // *Ann Rev Plant Biol* – 2002. – 53. – P. 247–273.
5. Lawlor D., Cornic G. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants // *Plant Cell Environ.* – 2002. – 25. – P. 275–294.
6. Yordanov I., Velikova V., Tsonev T. Plant responses to drought, acclimation, and stress tolerance// *Photosynthetica.* – 2000. – 38. – P. 171–186.

7. Kang Y., Khan S., Ma X. Climate change impacts on crop yield, crop water productivity and food security // *Prog Nat Sci*. – 2009. – 19. – P. 1665–1674.
8. Narayanan S., Sathy B., Mony U., Koyakutty M., Nair S., Menon D. Biocompatible magnetite/gold nanohybrid contrast agents via green chemistry for MRI and CT bioimaging // *ACS Appl Mater Interfaces*. – 2012. – 4. – P. 251–260.
9. Batsmanova L., Gonchar L., Taran N., Okanenko A. Using a colloidal solution of metal nanoparticles as micronutrient fertilizer for Cereals // *Proc Int Conf Nanomaterials Appl Properties*. – 2013. – 2(4). – P. 04NABM14-1–04NABM14-2.
10. Olkhovych O., Volkogon M., Taran N., Batsmanova L., Kravchenko I. (2016) The effect of copper and zinc nanoparticles on the growth parameters, contents of ascorbic acid, and qualitative composition of amino acids and acylcarnitines in *Pistia stratiotes* L. (Araceae). – *Nanoscale Res Lett*. – 11 – 218. doi:10.1186/s11671-016-1422-9
11. Oukarroum A., Barhoumi L., Pirastru L., Dewez D. Silver nanoparticle toxicity effect on growth and cellular viability of the aquatic plant *Lemna gibba* // *Environ. Toxicol. Chem.* – 2013. – 32(4). – P. 902–907.
12. Chichiricò G., Poma A. Penetration and toxicity of nanomaterials in higher plants // *Nanomaterials*. – 2015. – 5(2). – P. 851–873.
13. Mustafa G., Komatsu S. Toxicity of heavy metals and metal-containing nanoparticles on plants // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2016. – 1864 (8). – P. 932–944.
14. Cox A., Venkatachalam P., Sahi S., Sharma N. Silver and titanium dioxide nanoparticle toxicity in plants: a review of current research // *Plant Physiol Biochem*. – 2016 – 107. – P. 147–163.
15. Konotop I., Kovalenko M., Ulynets V., Meleshko A., Batsmanova L., Taran N. Phytotoxicity of colloidal solutions of metal-containing nanoparticles // *Cytol Genet*. – 2014. – 48(2). – P. 99–102.
16. Lopatko K., Aftandilias E., Kalenska S., Tonkha O. Mother colloidal solution of metals. B01J 13/00 Patent of Ukraine No. 38459 12 Jan 2009.
17. Григорюк И., Ткачев В., Савинский С., Мусиенко Н. Современные методы исследования и оценки засухи и жароустойчивости растений: Метод. пособ. – К.: Науковий світ, 2003. – 139 с.
18. Андреева Л., Кожемякин Л., Кишкун А. Модификация метода определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой // *Лаб. дело*. – 1988. – № 11. – С. 41–43.
19. Giannopolitis C., Ries S. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants // *Plant Physiol*. – 1977. – 59(2). – P. 309–314.
20. Kumar C., Knowles N. Changes in lipid peroxidation and lipolytic and free-radical scavenging enzyme during aging and sprouting of potato (*Solanum tuberosum* L.) seed-tubers // *Plant Physiol*. – 1993. – 102. – P. 115–124.
21. Wellburn A., The spectral determination of chlorophylls a and b as well as the total carotenoids using various solvents with spectrophotometers of different resolution // *J Plant Physiol*. – 1994. – 144(3). – P. 307–313.
22. Smart R., Bingham G. Rapid estimates of relative water content // *Plant Physiol*. – 1974. – 53(2). – P. 258–260.
23. Chanda S., Singh Y. Estimation of leaf area in wheat using linear measurements // *Plant Breed Seed Sci*. – 2002. – 46(2). – P. 75–79.
24. Zhai G., Walters K., Peate D., Alvarez P., Schnoor J. Transport of gold nanoparticles through plasmodesmata and precipitation of gold ions in woody poplar // *Environ Sci Technol Lett*. – 2014. – 1(2). – P. 146–151.
25. Ghafariyan M., Malakouti M., Dadpour M., Stroeve P., Mahmoudi M. Effects of magnetite nanoparticles on soybean chlorophyll // *Environ Sci Technol*. – 2013. – 47(18). – P. 10645–10652.
26. Falco W., Queiroz A., Fernandes J., Botero E., Falcão E., Guimarães F. Interaction between chlorophyll and silver nanoparticles: a close analysis of chlorophyll fluorescence quenching // *Photochem Photobiol A Chem*. – 2015. – 299. – P. 203–209.
27. Barazzouk S., Kamat P., Hotchandani S. Photoinduced electron transfer between chlorophyll a and gold nanoparticles // *J. Phys. Chem. B*. – 2005. – 109 (2). – P. 716–723.
28. Green B., Durnford D. The chlorophyll-carotenoid proteins of oxygenic photosynthesis // *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. – 1996. – 47. – P. 685–714.
29. Havaux M., Niyogi K. The violaxanthin cycle protects plants from photooxidative damage by more than one mechanism // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 1999. – 96. – P. 8762–8767.
30. Taheri M., Qarache H., Qarache A., Yoosefi M. The effects of zinc oxide nanoparticles on growth parameters of corn (SC704) // *STEM Fellowship J*. – 2015. – 1(2). – P. 17–20.
31. Zaimenko N., Didyk N., Dzyuba O., Zakrasov O., Rositska N., Viter A. Enhancement of drought resistance in wheat and corn by nanoparticles of natural mineral analcite // *Ecologia Balkanica*. – 2014. – 6(1). – P. 1–10.

Надійшла до редколегії 21.09.2018

Отримано виправлений варіант 23.10.2018

Підписано до друку 23.10.2018

Received in the editorial 21.09.2018

Received a revised version on 23.10.2018

Signed in the press on 23.10.2018

В. Стороженко, канд. биол. наук, Н. Светлова, канд. биол. наук, Н. Коваленко, асп.,
Л. Бацманова, канд. биол. наук, Н. Таран, д-р биол. наук, проф.
УНЦ "Институт биологии и медицины",
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

ИНДУКЦИЯ УСТОЙЧИВОСТИ ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ К ДЕЙСТВИЮ МОДЕЛИРУЕМОЙ ЗАСУХИ КОЛЛОИДНЫМ РАСТВОРОМ НАНОЧАСТИЦ Cu^{2+} И Zn^{2+}

Исследовано влияние коллоидного раствора наночастиц Cu^{2+} и Zn^{2+} на про/антиоксидантный баланс, содержание фотосинтетических пигментов (хлорофиллов а, b и каротиноидов), соотношение хлорофиллов и морфометрические показатели (относительное содержание воды в листьях, площадь листовой поверхности) проростков озимой пшеницы *Triticum aestivum* L. сортов Акведук (степной экотип, устойчивый к засухе) и Столичная (лесостепной экотип, чувствительный к засухе) в условиях моделируемой засухи. Засуху создавали путем прекращения полива на 8-е сутки после появления всходов и поддержания влажности почвы на уровне 30 % от полной влагоемкости в течение 3 суток. Предпосевную обработку семян наночастицами Cu^{2+} и Zn^{2+} проводили путем замачивания в опытном растворе (1 часть маточного коллоидного раствора: 100 частей воды) в течение 4 часов. Контрольный вариант замачивали в дистиллированной воде. Затем семена отмывали и высаживали в песчаную культуру. Выявлено сортовую специфичность влияния коллоидного раствора наночастиц металлов на проростки сортов Акведук и Столичная. Предпосевная обработка семян наночастицами Cu^{2+} и Zn^{2+} приводила к существенным изменениям про/антиоксидантного баланса в листьях проростков, которые заключались в снижении уровня накопления ТБК-активных продуктов, повышению активности ключевых антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутазы и каталазы), стабилизации содержания фотосинтетических пигментов, увеличении относительного содержания воды в листьях и площади листовой поверхности в условиях моделируемой засухи.

В целом в условиях засухи предпосевная обработка семян коллоидным раствором наночастиц оказывала положительное влияние на про/антиоксидантный баланс растений и морфометрические параметры листьев в большей степени у проростков сорта степного экотипа (Акведук) и в меньшей – у проростков сорта лесостепного экотипа (Столичная).

Ключевые слова: наночастицы Cu^{2+} и Zn^{2+} , пшеница, предпосевная обработка семян, ТБК-активные продукты, супероксиддисмутаза, каталаза.

V. Storozhenko, PhD, N. Svetlova, PhD, M. Kovalenko, Postgraduate stud., , L. Batsmanova, PhD, N. Taran, DSc, Prof.
ESC "Institute of Biology and Medicine",
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

INDUCTION OF WHEAT SEEDLINGS RESISTANCE OF DIFFERENT ECOTYPES TO THE EFFECT OF A DROUGHT SIMULATED BY A COLLOIDAL SOLUTION OF Cu^{2+} AND Zn^{2+} NANOPARTICLES

The aim of the investigation was to study the effect of colloidal solution of Cu^{2+} and Zn^{2+} nanoparticles on the pro/antioxidant balance, the content of photosynthetic pigments (chlorophylls a, b and carotenoids), the chlorophyll a/b ratio and the morphometric parameters (relative leaf water content, leaf area) of winter wheat *Triticum aestivum* L. varieties Acveduc (steppe ecotype, resistant to drought) and Stolichna (forest-steppe ecotype, sensitive to drought) under conditions of simulated drought. The drought was created by stopping of watering on the 8th day after emergence and maintaining the soil moisture at 30 % of the total moisture capacity for 3 days. Pre-sowing treatment of seeds with Cu^{2+} and Zn^{2+} nanoparticles was carried out by soaking of seeds in experimental solution (1 part of the mother colloid solution: 100 parts of water) for 4 hours. The control variant was soaked in distilled water. Then the seeds were washed and planted in a sand culture. The varietal specificity of the influence of a colloidal solution of metal nanoparticles on seedlings of the Acveduc and Stolichna varieties was revealed. Presowing treatment of seeds with Cu^{2+} and Zn^{2+} nanoparticles led to significant changes in the pro/antioxidant balance in leaves of seedlings, reducing the level of accumulation of TBARS, increasing the activity of key antioxidant enzymes (superoxide dismutase and catalase), stabilizing the content of photosynthetic pigments, increasing the relative water content in leaves and leaf area under simulated drought conditions.

In general, under drought conditions, presowing of seed treatment with a colloidal solution of nanoparticles had a positive effect on the pro-antioxidant balance of plants and the morphometric parameters of leaves to a greater extent in seedlings of the steppe ecotype variety (Acveduc) and less in seedlings of the forest-steppe ecotype variety (Stolichna).

Key words: Cu^{2+} and Zn^{2+} nanoparticles, wheat, presowing seed treatment, TBARS, superoxide dismutase, catalase.

Наукове видання



ВІСНИК

КИЇВСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОГО УНІВЕРСИТЕТУ ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

БІОЛОГІЯ

Випуск 2(76)

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.



Формат 60x84^{1/8}. Ум. друк. арк. 9,9. Наклад 300. Зам. № 218-8939.
Гарнітура Arial. Папір офсетний. Друк офсетний. Вид. № Б 2.
Підписано до друку 26.10.18

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_div.chief@univ.net.ua; redaktor@univ.net.ua
http: vpc.univ.kiev.ua

Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 1103 від 31.10.02