

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. Торгалло, 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.; Д. М. Говорун, д-р біол. наук, проф., чл.-кор. НАН України (м. Київ, Україна); В. С. Мартинюк, д-р біол. наук, проф.; М. Ю. Макаrchук, 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 редколегії	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" 11.03.19 (протокол № 9)
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 входить до наукометричних 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.

Наведено 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, Dr. Sci., Prof.
EDITORIAL BOARD	Torgalo Elizabeth, Ph. D.; Sergii Vakal, Ph. D. (Tech. Editor); Sandor Makai, Prof. Dr. habil. Dr. h. c. (Szombathely, Hungary); Ivan Boubriak, Ph. D. (Oxford, United Kingdom); Khoperiay Viktiryay, Dr. Sci.; Dmytro Hovorun, Dr. Sci., Prof., Corresponding Member of the NASU, Deputy Director (Kyiv, Ukraine); Viktor Martynyuk, Dr. Sci., Prof.; Mykola Makarchuk, Dr. Sci., Prof. Head of the Chair; Nataliia Taran, Dr. Sci., Prof., Head of the Chair of Plant Biology; Andrii Sivolob, Dr. Sci., Prof.; Veronika Dzhagan, Ph. D., Assoc. Prof.; Andrei Moisieenok, Dr. Sci., Prof., 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" 11.03.19 (Protokol № 9)
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 № 16053-4525 ПП (November 9th, 2009)
Founded and Published	Kyiv National Taras Shevchenko University, Kyiv, Ukraine, Publishing and Printing Center "Kyiv University". The certificate is entered in the State Register DK № 1103 (October 31th 2002)
Publisher's Address	Publishing and Printing Centre "Kyiv 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

ЗМІСТ

Демченко М., Баданіна В., Футорна О., Палагеча Р., Таран Н. Декоративні якості інтродукованих у Ботанічному саду ім. акад. О. В. Фоміна представників родини <i>MAGNOLIACEAE JUSS.</i>	6
Головань В., Андрійчук О., Будзанівська І. Вивчення різноманіття вірусів бактерій, виділених із біотопів моху та ґрунту антарктичного регіону	10
Дяченко Л., Степченко Л. Оцінка використання кормових добавок гумінової природи за лейкоцитарними індексами у щурів після комбінованого стресу	16
Креницька Д., Юрченко А., Савчук О., Ліпєць Н. Зміни білкового складу тканин при розвитку експериментального ожиріння у щурів	21
Пилипчук Т., Тесьолкіна Т., Лукашов Д. Сезонна динаміка фракційного складу лісової підстилки НПП "Голосіївський"	26
Теплюк А., Теплюк В. Еколого-фауністичний аналіз мошок (<i>DIPTERA, SIMULIIDAE</i>) гідробіоценозів північно-східного макросхилу Українських Карпат	32
Удовиченко І., Олійник Д., Дудкіна Ю., Галєнова Т., Савчук О. Аналіз секрету шкірних залоз часничниці звичайної (<i>PELOBATES FUSCUS</i>) на присутність потенційних ефекторів системи гемостазу	38
Пожилов І., Руднєва Т., Шевченко Т., Шевченко О., Цвігун В. Філогенетичний аналіз гена капсидного білка ізолятів вірусу мозаїки томату, що циркулюють в Україні	44
Корнієнко Н., Духно Е., Харіна А., Будзанівська І. Виділення бактеріофагу з літичною активністю проти нової ідентифікованої <i>PANTOEA AGGLOMERANS</i>	50
Калмикова О., Держинський М. Вплив введення мелатоніну в різний час доби на буру жирову тканину щурів із висококалорійним ожирінням	55
Романчук С. Ультраструктура ЕР-тілець у статочитах і клітинах дистальної зони розтягу кореневих апексів <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> (L.) HEYNH. під дією Х-опромінення	61
Терлецька Д., Шпагін В. Ідентифікація архітектурного стилю Червоного корпусу Київського Національного Університету імені Тараса Шевченка в цілях ландшафтного дизайну	68
Мегалінська Г., Сокульська М. Порівняльний аналіз цитостатичної та антибактеріальної активності екстрактів амброзії полинолистної й інших лікарських рослин та визначення літичної активності екстрактів амброзії полинолистної	71
Гандзюра В., Корево Н. Особливості фосфорного балансу риб за підвищеного вмісту Cu^{2+} у воді	75
Дмитрик В., Савчук О., Зінькова Ю. Вміст білків теплового шоку HSP60 та HSP70 у тканинах пухлин хворих на рак сечового міхура	79
Кондратюк Т., Акуленко Т., Торгалo Є., Берегова Т., Остапченко Л. Залежність накопичення біомаси продуцентом меланіну <i>PSEDONADSONIELLA BRUNNEA</i> (<i>MERIPILACEAE, AGARICOMYCOTINA</i>) від складу культурального середовища	83
Безродна А., Вишницька І., Стеценко С., Ходош Е. Вивчення показників обміну білків в організмі щурів під впливом інгаляційної інтоксикації "Вейпом" електронних сигарет	86
Раєцька Я. Рівень прозапальних цитокінів за умов лужного опіку стравоходу 2-го ступеня та при введенні екстракту стручків <i>PHASEOLUS VULGARIS</i>	90

СОДЕРЖАНИЕ

Демченко Н., Баданина В., Футорна О., Палагеча Р., Таран Н. Декоративные качества интродуцированных в Ботаническом саду им. акад. А.В. Фомина представителей семейства <i>MAGNOLIACEAE JUSS</i>	6
Головань В., Андрийчук Е., Будзанивская И. Изучение разнообразия вирусов бактерий, выделенных из биотопов мха и почвы арктического региона	10
Дяченко Л., Степченко Л. Оценка использования кормовых добавок гуминовой природы за лейкоцитарными индексами у крыс после комбинированного стресса	16
Креницька Д., Юрченко А., Савчук О., Н. Липець Изменение белкового состава тканей при развитии ожирения у крыс	21
Пилипчук Т., Теселкина Т., Лукашов Д. Сезонная динамика фракционного состава лесной подстилки НПП "Голосеевский"	26
Теплюк А., Теплюк В. Эколого-фаунистический анализ мошек (<i>DIPTERA, SIMULIIDAE</i>) гидробиоценозов северо-восточного макросклона Украинских Карпат	32
Удовиченко И., Олейник Д., Дудкина Ю., Галенова Т., Савчук О. Анализ секрета кожных желез чесночницы обыкновенной (<i>PELOBATES FUSCUS</i>) на присутствие потенциальных эффекторов системы гемостаза	38
Пожилов И., Руднева Т., Шевченко Т., Шевченко А., Цвигун В. Филогенетический анализ гена капсидного белка изолятов вируса мозаики томата, циркулирующих в Украине	44
Корниенко Н., Духно Е., Харина А., Будзанивская И. Выделение бактериофага с литической активностью против недавно идентифицированной <i>PANTOEA AGGLOMERANS</i>	50
Калмыкова О., Дзержинский Н. Влияние введения мелатонина в разное время суток на буюро жировую ткань с высококалорийным ожирением	55
Романчук С. Ультраструктура ЭР-телец в статоцитах и клетках дистальной зоны растяжения корневых апексов <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> (L.) HEYNH. под действием X-облучения	61
Терлецкая Д., Шагин В. Идентификация архитектурного стиля Красного корпуса Киевского Национального Университета имени Тараса Шевченко в целях ландшафтного дизайна	68
Мегалинская А., Сокульская М. Сравнительный анализ цитостатической и антибактериальной активности экстрактов амброзии полыннолистной и других лекарственных растений и определение литической активности экстракта амброзии полыннолистной	71
Гандзюра В., Корево Н. Особенности фосфорного баланса рыб в условиях повышенного содержания Cu^{2+} в воде	75
Дмитрик В., Савчук А., Зинькова Ю. Содержание белков теплового шока HSP60 и HSP70 в тканях опухолей больных на рак мочевого пузыря	79
Кондратюк Т., Акуленко Т., Торгалю Е., Береговая Т., Остапченко Л. Зависимость накопления биомассы продуцентом <i>PSEDONADSONIELLA BRUNNEA</i> (<i>MERIPILACEAE, AGARICOMYCOTINA</i>) от состава культуральной среды	83
Безродная А., Вишницкая И., Стеценко С., Ходош Э. Изучение показателей обмена белков в организме крыс под влиянием ингаляционной интоксикации "Вейпом" электронных сигарет	86
Раяцкая Я. Уровень провоспалительных цитокинов в условиях щелочного ожога пищевода 2-ой степени и при введении экстракта стручков <i>PHASEOLUS VULGARIS</i>	90

CONTENTS

Demchenko N., Badanina V., Futorna O., Palagecha R., Taran N. Decorative qualities of representatives of <i>MAGNOLIACEAE JUSS.</i> , introduced in the O.V. Fomin botanical garden	6
Holovan V., Andriichuk O., Budzanivska I. Investigation of diversity of bacterial viruses, isolated from moss and soil biotops of Antarctic region	10
Diachenko L., Stepchenko L. Evaluation of the use of feed additives of humic nature by indices of leukocytes in rats after combined stress	16
Krenytska D., Yurchenko A., Savchuk O., Lipets N. The peptides profile changes in tissues under the condition of experimental obesity in rats	21
Pylypchuk T., Tesolkina T., Lukashov D. Seasonal dynamics of the fractional composition of forest litter of Holosiivskyi National Nature Park	26
Tepluk A., Tepluk V. Ecology-faunistic analysis of blackflies (<i>DIPTERA, SIMULIIDAE</i>) of hydrobiocenosis on the north-eastern macroslope of the Ukrainian Carpathians	32
Udovychenko I., Oliynyk D., Dudkina J., Halenova T., Savchuk O. Analysis of the common spadefoot toad (<i>PELOBATES FUSCUS</i>) skin secretions on the presence of the potential hemostasis system effectors	38
Pozhylov I., Rudnieva T., Shevchenko T., Shevchenko O., Tsvigun V. Phylogenetic analysis of coat protein gene of tomato mosaic virus isolates circulating in Ukraine	44
Korniienko N., Dukhno E., Kharina A., Budzanivska I. Isolation of bacteriophages with lytic activity against a newly identified <i>PANTOEAGAGGLOMERANS</i>	50
Kalmukova O., Dzerzhynsky M. The effects of melatonin administration in different times of day on the brown adipose tissue in rats with high-calorie diet-induced obesity	55
Romanchuk S. Ultrastructure of ER-bodies in statocytes and cells of the distal elongation zone of <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> (L.) HEYNH. root apices under X-radiation	61
Terletska D., Shpagin V. Identification of the architectural style of the Red Building of the Taras Shevchenko National University of Kyiv for Landscape Design aims	68
Megalinska A., Sokulska M. Comparative analysis of cytostatic and antibacterial activity of extracts of ambrosia artemisiifolia and other medicinal plants and determination of lithic activity of extracts of ambrosia artemisiifolia	71
Gandziura V., Korevo N. Peculiarities of fish phosphorus balance at a high Cu ²⁺ content in water	75
Dmytryk V., Savchuk O., Zinkova Y. Contents of HSP60 and HSP70 in tumor tissues of patients with bladder cancer	79
Kondratiuk T., Akulenko T., Torgalo Ie., Beregova T., Ostapchenko L. Dependence of biomass accumulation by melanin producer <i>PSUEDONADSONIELLA BRUNNEA</i> (<i>MERIPILACEAE, AGARICOMYCOTINA</i>) of the cultural medium content	83
Bezrodna A., Vyshnytska I., Stetsenko S., Khodosh E. Studying the indicators of protein metabolism in the organism of rats under the influence of inhalation intoxication by "Vapour" electronic cigarettes	86
Raletska Ya. The content of proinflammatory cytokines in blood serum in rats with alkali burns esophagus under the treatment with <i>PHASEOLUS VULGARIS</i> extract	90

ДЕКОРАТИВНІ ЯКОСТІ ІНТРОДУКОВАНИХ У БОТАНІЧНОМУ САДУ ІМ. АКАД. О.В. ФОМІНА ПРЕДСТАВНИКІВ РОДИНИ *MAGNOLIACEAE* JUSS.

Метою роботи було з'ясувати особливості прояву ознак декоративності видів *Magnoliaceae* Juss. На прикладі рослин із колекції Ботанічного саду ім. акад. О.В. Фоміна ННЦ "Інститут біології та медицини" за кліматичних умов київського мегаполісу. У 12-ти листопадних представників родини вивчали комплексну та сезонну декоративність, оцінювали декоративність окремої рослини, визначали загальний річний показник декоративності, досліджували сезонний ритм розвитку рослин на основі фенологічних спостережень. Основні фізіологічні показники, взяті до уваги: бутонізація, розкривання квіткових і вегетативних бруньок, формування листка, цвітіння, плодоношення. Установлено, що всі досліджені види в умовах відкритого ґрунту Ботанічного саду проходять повний цикл сезонного розвитку: квітнуть, розвиваються, формують нормально розвинені плоди і насіння. За термінами початку вегетації досліджувані види поділено на дві групи: середні (*L. chinense* (Hemsl.) Sarg., *L. tulipifera* L., *M. stellata* (Siebold & Zucc.) Maxim., *M. tripetala* L., *M. officinalis* Rehder & E.H. Wilson, *M. denudata* Desr., *M. liliiflora* Desr., *M. kobus* DC., *M. soulangeana* Soul.-Bod., *M. salicifolia* (Sieb. Et Zuss.) Maxim., *M. obovata* Thunb.) та пізні (*M. biondii* Pamp.), а за датами початку цвітіння щодо сезонів року – на три групи: ранньовесняні (*M. stellata*, *M. denudata*, *M. salicifolia*, *M. kobus*); пізньовесняно-ранньолітні (*L. chinense*, *L. tulipifera*, *M. tripetala*, *M. officinalis*, *M. liliiflora*, *M. soulangeana*, *M. obovata*); середньолітні (*M. biondii*). Зроблено висновок про високу декоративність досліджуваних видів (загальний річний показник декоративності становить 4 бали), їхню високу адаптаційну здатність до зміни умов середовища та необхідність більш широкого використання магнолієвих в озелененні урболандшафтів як перспективних кліматоформуючих рослин.

Ключові слова: *Magnoliaceae*, декоративність, сезонний ритм розвитку, фенологічні спостереження.

Вступ. В умовах глобальних змін клімату озеленення антропогенно трансформованих урболандшафтів потребує нового підходу до підбору стресовитривалих високодекоративних рослин із представників як аборигенних, так й інтродукованих видів. У цьому аспекті велика роль належить ботанічним садам, у яких зосереджені світові колекції рослин різного цільового призначення зі специфічними кліматоформуючими властивостями. Провідними центрами інтродукції роду *Magnolia* в Україні є Ботанічний сад ім. акад. О.В. Фоміна ННЦ "Інститут біології та медицини" КНУ імені Тараса Шевченка та Національний ботанічний сад ім. М. М. Гришка НАН України.

У Ботанічному саду ім. акад. О.В. Фоміна зібрано найбільшу в Україні колекцію магнолій, яка налічує понад 65 видів, різновидів, гібридів та форм [1]. Вони прекрасно квітнуть та плодоносять, добре переносять зими. У розсаднику та теплицях вирощується багато сіянців і саджанців, ведеться інтродукційна та селекційна робота з виведення нових сортів, виділення ефірних олій і виявлення нових збудників хвороб. Передувала цьому кропітка праця О.В. Фоміна, К.І. Богомаз [2], Н.Ф. Мінченко [3], Т.П. Коршук [4], Р.М. Палагечи [5, 6] та ін. започаткована ще в 1905 р. [7]. У НБС ім. М. М. Гришка – 11 видів і 14 гібридів і форм [8].

Показник успішності введення в культуру рослин з природно-історичних умов у нові визначається дією багатьох факторів, серед яких основну роль відіграють природно-кліматичні умови нового місцезростання. Ураховуючи сучасні коливання умов зростання рослин, викликані глобальними змінами клімату [9] та урбанізацією середовища, технології озеленення міст передбачають здійснення відбору видів як за адаптивними, так і за декоративними ознаками. Комплексний екологічний підхід найбільш об'єктивний при інтродукційних дослідженнях, оскільки потребує вивчення впливу сукупності зовнішніх факторів, які діють на рослинний організм і впливають на показники його декоративності.

З огляду на сучасні тенденції з використання видів родини *Magnoliaceae* в озелененні та відсутність спеціальних досліджень їхніх адаптивних та декоративних властивостей метою нашої роботи було з'ясувати особливості прояву ознак декоративності представників родини *Magnoliaceae* на прикладі рослин з колекції Ботанічного саду ім. акад. О.В. Фоміна за кліматичних умов київського мегаполісу.

Матеріали і методи. Об'єктом дослідження були 12 листопадних видів родини *Magnoliaceae* з колекції ботанічного саду ім. О.В. Фоміна: Піріодендрон китайський (*L. chinense* (Hemsl.) Sarg.), Л. тюльпановий (*L. tulipifera* L.), Магнолія зірчаста (*M. stellata* (Siebold & Zucc.) Maxim.), М. трипелюсткова (*M. tripetala* L.), М. лікарська (*M. officinalis* Rehder & E.H. Wilson), М. оглолена (*M. denudata* Desr.), М. лілієцвіта (*M. liliiflora* Desr.), М. Бюнді (*M. biondii* Pamp.), М. Кобус (*M. kobus* DC.), М. суланжа (*M. soulangeana* Soul.-Bod.), М. верболиста (*M. salicifolia* (Sieb. Et Zuss.) Maxim.), М. оберненояце-подібна (*M. obovata* Thunb.).

Комплексну і сезонну декоративність досліджували за методом Н.В. Котелової та О.Н. Виноградової [10] у модифікації І.В. Таран, А.М. Агапової [11], де за п'ятибальною шкалою оцінювали декоративність архітектоники стовбура та крони, листків, суцвіть, квіток і плодів, колір та текстуру кори, стовбура, гілок, пагонів. Декоративність виду ($P_{\text{сеп}}$) розраховували за формулою:

$$P_{\text{сеп}} = \frac{(A^1 P^1 + A^2 P^2 + A^3 P^3 + A^4 P^4)}{(P^1 + P^2 + P^3 + P^4)},$$

де A^1 – щомісячна оцінка архітектоники стовбура і крони; A^2 – щомісячна оцінка декоративності листя; A^3 – щомісячна оцінка суцвіть, квітів, плодів; A^4 – щомісячна оцінка кольору і фактури кори стовбура та крони; P^1 – перевідний коефіцієнт для архітектоники стовбура і крони, який дорівнює 4; P^2 – перевідний коефіцієнт для листя, який дорівнює 3; P^3 – перевідний коефіцієнт для суцвіть, квітів, плодів, який дорівнює 2; P^4 – перевідний коефіцієнт для текстури та кольору кори стовбура, що дорівнює 1.

Після проведення всіх розрахунків визначали загальний річний показник декоративності, який є сумою загальної оцінки в балах за кожний місяць і позначається в умовних одиницях. Кількісні показники декоративності переводилися в п'ятибальну шкалу. Отже, визначено, що за показника до 20 ум. од. – декоративність середня (3 бали), 21–40 – висока (4 бали), 41 та більше балів – дуже висока (5 балів).

Декоративність окремої рослини або групи в насадженнях оцінювалась за п'ятибальною шкалою декоративності рослин О.А. Калініченко [12], де 1 – декоративність негативна – зовнішній вигляд рослин явно зменшує їхню загальну декоративність; 2 – нульова – декоративні якості незначні; 3 – незначна – декоративні якості помітні.

ні, але невиразні й не підвищують декоративність рослини; 4 – достатня – декоративні якості виразні, рослини добре виглядають і загалом виділяються на загальному фоні насаджень; 5 – висока – декоративні якості надають рослинам значну привабливість, викликають у спостерігача велике емоційне збудження і захоплення. Сезонний ритм розвитку рослин вивчали за [13, 14].

Результати та їхнє обговорення. Оцінку декоративності проводили за сезонами року, розраховуючи її для кожного місяця. Дані спостережень наведено в табл. 1 і демонструють динаміку декоративності впродовж року. Як видно із табл. 1, усі досліджувані види демонструють декоративність (від 1,5 до 3,9 бала) у період з березня-квітня до кінця осені.

Таблиця 1. Динаміка декоративності досліджуваних видів впродовж року, бал

Види	Місяць											
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
<i>L. chinense</i>	1,9	1,9	2,5	2,6	3,9	3,9	3,9	3,9	3,9	3,9	2,5	2,5
<i>L. tulipifera</i>	1,9	1,9	1,9	3,6	3,6	2,9	2,9	2,9	2,9	2,9	1,9	1,9
<i>M. stellata</i>	1,9	1,9	1,9	3,0	3,3	2,6	2,3	2,3	2,3	2,3	1,9	1,9
<i>M. tripetala</i>	2,3	2,3	2,3	3,4	3,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,3	2,3
<i>M. officinalis</i>	1,3	1,3	2,3	2,9	3,3	2,8	2,3	2,3	2,3	1,3	1,2	1,3
<i>M. denudata</i>	1,9	1,9	1,9	2,9	2,5	2,5	2,5	2,5	2,6	2,6	1,9	1,9
<i>M. liliiflora</i>	1,9	1,9	1,9	2,0	3,6	3,6	2,6	2,6	2,6	2,6	1,9	1,9
<i>M. biondii</i>	1,9	1,9	1,9	2,0	3,6	3,6	2,6	2,6	2,6	2,6	1,9	1,9
<i>M. obovata</i>	1,9	1,9	1,9	3,6	3,6	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6	1,9	1,9
<i>M. salicifolia</i>	1,5	1,5	1,5	3,8	3,8	2,8	2,6	2,6	2,6	2,4	1,5	1,5
<i>M. kobus</i>	1,5	1,5	1,5	3,7	3,7	2,5	2,5	2,5	2,2	2,2	1,6	1,5
<i>M. soulangeana</i>	1,9	1,9	1,9	3,3	3,3	3,0	3,0	2,8	2,8	2,0	1,9	1,9

У зимовий період на перший план виступають деталі будови та забарвлення гілок і пагонів. За показниками кори стовбура (коричневе, темно-буре або світло-сіре забарвлення, гладенька, тріщинувата або борозенчаста текстура) досліджувані види отримують середній бал ($A=3$) (табл. 2). При цьому гладку, світло-сіру кору мають *M. denudata*, *M. liliiflora*, *M. salicifolia*; у *M. tripetala* кора така ж, проте з численними дрібними сочевичками. Гладку, світло-сіро-зелену кору має *L. tulipifera*. У *M. stellata* кора блискуча, гладка, сірувато-коричневого кольору, а у *M. soulangeana* – гладка, бу-

рувато-сірого кольору. У *M. kobus* кора груба, злегка борозенчаста, темно-сіра; у *M. obovata* – світло-сіра з короткими позовжними тріщинами. Окрім того, в осінній та зимовий періоди найбільш виразно проявляються декоративні якості таких важливих декоративних ознак рослин, як архітектура стовбура і крони: її розміри, форма, щільність, характер розташування гілок тощо. Оскільки досліджувані види в період з листопада до квітня перебувають у безлистому стані, то найвищим балом – 4 оцінили архітектонику стовбура і крони *M. obovata*, в інших видів ця ознака оцінена в 3 бали (табл. 2).

Таблиця 2. Комплексна оцінка декоративних ознак деревних рослин, бали

Види	Архітектоніка					Оцінка архітектоніки	Листки				Оцінка листя	Квітки			Оцінка квітів	Плоди		Оцінка плодів	Загальна оцінка декоративності
	крони		стовбура				форма та розмір	зміна забарвлення	час покриття листя	колір		форма, величина, колір	запах	час і тривалість цвітіння		форма і величина	колір, яскравість, тривалість перебування на рослині		
	форма	щільність	фактура	колір кори	колір гілок														
<i>L. chinense</i>	3	3	3	3	3	15	3	3	3	3	12	3	1	1	5	3	1	4	36
<i>L. tulipifera</i>	3	3	3	3	3	15	5	5	5	5	20	3	1	1	5	3	1	4	44
<i>M. stellata</i>	3	3	3	3	3	15	2	3	3	3	11	3	3	3	9	3	3	6	41
<i>M. tripetala</i>	3	3	3	3	3	15	5	5	5	5	20	3	3	3	9	3	3	6	50
<i>M. officinalis</i>	3	3	3	3	3	15	5	5	5	5	20	3	3	3	9	3	3	6	50
<i>M. denudata</i>	3	3	3	3	3	15	5	5	5	5	20	3	3	3	9	3	3	6	50
<i>M. liliiflora</i>	2	3	3	3	3	14	3	3	3	3	12	3	3	3	9	3	3	6	41
<i>M. biondii</i>	3	3	3	3	3	15	3	3	3	3	12	3	3	3	9	3	3	6	42
<i>M. obovata</i>	4	4	4	4	4	20	5	5	5	5	20	3	3	3	9	3	3	6	55
<i>M. salicifolia</i>	3	3	3	3	3	15	3	3	3	3	12	3	3	3	9	3	3	6	42
<i>M. kobus</i>	3	3	3	3	3	15	3	3	3	3	12	3	3	3	9	3	3	6	42
<i>M. soulangeana</i>	3	3	3	3	3	15	3	3	3	3	12	3	3	3	9	3	3	6	42

Під час формування загального декоративного вигляду важливу роль відіграють листки, їхнє забарвлення, форма, розміри, спосіб кріплення, тривалість періоду олистнення і текстура поверхні. При цьому, окрім основного забарвлення листків, варто враховувати зміну його забарвлення в період вегетації. Зокрема, під час розпускання і впродовж весняно-літнього періоду рослини *L. tulipifera*, *M. obovata*, *M. tripetala*,

M. denudata, *M. officinalis* отримують найвищий бал ($A=5$) завдяки декоративності їхніх листків, решта видів – 3 бали (табл. 2). Восени декоративність листків усіх видів зменшується, оскільки вони набувають природного жовтого кольору. Виходячи з того, що досліджувані види – це листопадні дерева, перші три та останні два місяці року результат їхньої оцінки за листками дорівнює нулю.

Квітки є візитною карткою магнолій, тому за декоративними якостями в період цвітіння рослини оцінюються найвищим балом ($A=5$). Для таких видів, як *M. tripetala*, *L. chinense* та *M. soulangeana* дана оцінка 5 балів (декоративність висока) – декоративні якості надають рослинам

значної привабливості, викликають у спостерігача велике емоційне збудження і захоплення. Загальний річний показник декоративності досліджуваних видів високий і становить 4 бали (24,6–37,3 ум. од.) (табл. 3).

Таблиця 3. Загальна декоративність досліджуваних видів родини *Magnoliaceae*

Види	Площа, ум. од.	Декоративність, бал
<i>L. chinense</i>	37,3	4
<i>L. tulipifera</i>	31,2	4
<i>M. stellata</i>	27,6	4
<i>M. tripetala</i>	32,1	4
<i>M. officinalis</i>	24,6	4
<i>M. denudata</i>	27,6	4
<i>M. liliiflora</i>	29,1	4
<i>M. biondii</i>	29,1	4
<i>M. obovata</i>	27,1	4
<i>M. salicifolia</i>	28,1	4
<i>M. kobus</i>	28,9	4
<i>M. soulangeana</i>	29,7	4

Сезонний ритм розвитку рослин вивчали шляхом фенологічних спостережень упродовж вегетаційних періодів 2016–2018 рр. Основні фізіологічні показники, що брались до уваги, такі: розкриття квіткових бруньок, бутонізація, розкриття вегетативних бруньок, формування листка та цвітіння (табл. 4). Як видно з табл. 4, в умовах *ex situ* Ботанічного саду ім. акад. О.В. Фоміна 12 видів родини Магнолієві проходять повний цикл сезонного розвитку. Усі рослини гарно квітнуть і розвиваються. За даними фенологічних спостережень (табл. 4) відновлення вегетації в *M. stellata*, *M. denudata*, *M. kobus* та *M. salicifolia* розпочинається в другій декаді квітня. Квітування починається в другій-третьій декаді

квітня до появи листків, а закінчується до повного розпускання листя. У *M. officinalis*, *M. liliiflora*, *M. soulangeana* та *M. obovata* відновлення вегетації розпочинається в третій декаді квітня. Квітування починається в третій декаді квітня – першій декаді травня. При цьому, у *M. soulangeana* та *M. liliiflora* цвітіння спостерігається до розпускання листків або одночасно з ним, а у *M. officinalis* та *M. obovata* – після розпускання листків. Найпізніше серед досліджуваних видів відновлення вегетації розпочинається у *M. tripetala*, *L. chinense* та *L. tulipifera* (кінець квітня – початок травня). Цвітіння у цих видів та *M. biondii* спостерігається після розпускання листків.

Таблиця 4. Усереднені дані фенологічних спостережень досліджуваних видів

Види	Розкриття генеративних бруньок		Бутонізація	Розкриття вегетативних бруньок	Формування листка	Цвітіння	
	початок	кінець				початок	кінець
<i>L. chinense</i>	23.05±7 днів	1.06±7 днів	30.05±7 днів	29.04±5 днів	30.04±5 днів	1.06±7 днів	8.06±7 днів
<i>L. tulipifera</i>	25.05±5 днів	3.06±5 днів	30.05±5 днів	25.04±5 днів	29.04±5 днів	28.05±5 днів	5.06±5 днів
<i>M. stellata</i>	15.04±5 днів	17.04±5 днів	16.04±5 днів	23.04±5 днів	27.04±5 днів	17.04±5 днів	28.04±5 днів
<i>M. tripetala</i>	10.05±3 дні	13.05±3 дні	12.05±3 дні	24.04±4 дні	29.04±7 днів	12.05±4 дні	24.05±4 дні
<i>M. officinalis</i>	29.04±5 днів	03.05±5 днів	28.04±5 днів	24.04±5 днів	28.04±5 днів	29.04±5 днів	12.05±5 днів
<i>M. denudata</i>	17.04±4 дні	21.04±4 дні	20.04±4 дні	23.04±5 днів	29.04±5 днів	21.04±4 дні	01.05±4 дні
<i>M. liliiflora</i>	30.04±4 дні	04.05±4 дні	29.04±4 дні	28.04±4 дні	30.04±4 дні	30.04±4 дні	14.05±4 дні
<i>M. biondii</i>	20.06±6 днів	22.06±6 днів	23.06±6 днів	10.05±6 днів	17.05±6 днів	22.06±6 днів	11.07±8 днів
<i>M. kobus</i>	12.04±3 дні	25.04±3 дні	23.04±3 дні	24.04±4 дні	1.05±4 дні	25.04±4 дні	05.05±4 дні
<i>M. soulangeana</i>	30.04±5 днів	03.05±5 днів	27.04±5 днів	25.04±5 днів	1.05±5 днів	03.05±5 днів	03.06±5 днів
<i>M. salicifolia</i>	17.04±7 днів	19.04±7 днів	18.04±7 днів	26.04±7 днів	28.04±7 днів	20.04±5 днів	29.04±5 днів
<i>M. obovata</i>	30.04±5 днів	05.05±5 днів	29.04±5 днів	25.04±5 днів	30.04±5 днів	30.04±5 днів	16.05±5 днів

За середніми датами початку вегетації більшість досліджуваних видів середні (*L. chinense*, *L. tulipifera*, *M. stellata*, *M. tripetala*, *M. officinalis*, *M. denudata*, *M. liliiflora*, *M. kobus*, *M. soulangeana*, *M. salicifolia*, *M. obovata*) і лише *M. biondii* можна віднести до пізніх рослин. За датами початку цвітіння щодо сезонів року види *M. stellata*, *M. denudata*, *M. salicifolia* та *M. kobus* є ранньовесняними рослинами, *L. chinense*, *L. tulipifera*, *M. tripetala*, *M. officinalis*, *M. liliiflora*, *M. soulangeana*, *M. obovata* – пізньовесняно-ранньолітніми, *M. biondii* – середньолітніми. Середня тривалість цвітіння Магнолієвих у Києві становить: у *L. chinense* та *L. tulipifera* – 7-8 днів; *M. officinalis* – 13 днів; *M. stellata* та *M. tripetala* – 11-12 днів; *M. kobus* та *M. denudata* – 10 днів; *M. liliiflora* – 14 днів; *M. biondii* – 19 днів; *M. soulangeana* – 30 днів; *M. salicifolia* – 9 днів; *M. obovata* – 16 днів. Проте цей показник може дещо варіювати, залежно від температурних умов весни. За термінами плодоношення,

M. stellata та *M. tripetala* плодоносять у вересні, *M. denudata* – наприкінці вересня-на початку жовтня, *M. kobus*, *M. officinalis*, *M. salicifolia*, *L. chinense* та *L. tulipifera* – у жовтні, *M. liliiflora* та *M. obovata* – у листопаді.

Отже, досліджувані види родини *Magnoliaceae* перспективні для озеленення урболандшафтів нашої кліматичної зони з огляду на їхню декоративність, високу адаптаційну здатність до зміни умов середовища, що є однією з біологічних особливостей цих рослин, та з огляду на надійну тінь, що створюють ці рослини влітку, тим самим зменшуючи негативний вплив високих температур. Як високодекоративні красивоквітучі рослини можна рекомендувати для використання в солітерних посадках, особливо на фоні газону, в групах та алеях. Види, що походять з Японії (*M. kobus*, *M. stellata*, *M. salicifolia*, *M. obovata*), можна рекомендувати для створення садів у японському стилі. Ранньоквітучі види магнолій (*M. kobus*, *M. salicifolia*, *M. stellata*, *M. denudata*)

особливо ефектні в період бутонізації та цвітіння, коли ще відсутнє листя і ніщо не заважає милуватись їх квітами та вдихати їхній аромат. Рослини такого виду, як *M. denudata*, доцільно висаджувати на фоні хвойних порід. Особливої декоративності *M. tripetala* додають листки, що вирізняються поміж інших видів роду надзвичайними розмірами (20–40 см завдовжки, 15–25 см завширшки). У парках доцільно орієнтуватися на створення монокультурних насаджень роду *Magnolia*, в яких повною мірою проявляються декоративні якості цих екзотичних рослин. З огляду на швидкорослість *L. chinense* та *L. tulipifera* в комплексі з високими декоративними якостями цих видів рекомендуємо їх для алейних посадок у паркових зонах.

Висновки

1. Досліджені види родини *Magnoliaceae* в умовах *ex situ* Ботанічного саду ім. акад. О.В. Фоміна проходять повний цикл сезонного розвитку: гарно квітуть, розвиваються і формуються нормально розвинені плоди і насіння; загальний річний показник декоративності високий і становить 4 бали, що свідчить про сприятливі умови Ботанічного саду для розвитку екзотичних видів магнолієвих та їхню високу адаптаційну здатність до зміни умов середовища.

2. Оцінка сезонної декоративності досліджуваних видів показала, що в зимовий період за показниками кори стовбура (забарвленням, текстурою) досліджувані види отримують середній бал ($A=3$); у період з березня-квітня до кінця осені – декоративність становить 1,5–3,9 бали; під час розпускання листків і впродовж весняно-літнього періоду найвищий бал ($A=5$) отримують рослини *L. tulipifera*, *M. obovata*, *M. tripetala*, *M. denudata*, *M. officinalis* завдяки декоративності їхніх листків.

3. За термінами початку вегетації досліджувані види поділяють на дві групи: середні (*L. chinense*, *L. tulipifera*, *M. stellata*, *M. tripetala*, *M. officinalis*, *M. denudata*, *M. liliiflora*, *M. kobus*, *M. soulangeana*, *M. salicifolia*, *M. obovata*) та пізні (*M. biondii*), а за датами початку цвітіння щодо сезонів року – на три групи: ранньовесняні (*M. stellata*, *M. denudata*, *M. salicifolia*, *M. kobus*), пізньовесняно-ранньолітні (*L. chinense*, *L. tulipifera*, *M. tripetala*, *M. officinalis*, *M. liliiflora*, *M. soulangeana*, *M. obovata*), середньолітні (*M. biondii*).

4. За тривалістю цвітіння поміж усіх досліджуваних видів вирізняються *Magnolia soulangeana* (30 днів) та *M. biondii* (19 днів).

5. У контексті сучасних глобальних змін клімату Магнолієві заслугують подальшого вивчення як потенційні кліматоформуєчі деревні рослини і заслугують більш широкого використання: не лише в колекціях ботанічних садів, але й для озеленення вулиць, парків, у приватному садівництві.

Список використаних джерел:

1. Палагеча Р.М. Інтродукція північно-американських видів листопадних магнолій у Ботанічному саду Київського університету та використання їх у ландшафтному мистецтві // Вісн. КНУ імені Тараса Шевченка, 2012. – 30. – С. 34–37.
2. Богомаз Е. І. Предпосевное воздействие на семена листопадных магнолий / Е.И. Богомаз, Т.П. Коршук // Биологические основы семеноведения и семеноводства интродуцентов. – Новосибирск : Наука, 1974. – С. 154–156.
3. Минченко Н. Ф. Магнолии на Украине / Н.Ф. Минченко, Т.П. Коршук. – Киев : Наук. думка, 1987. – 184 с.
4. Коршук Т. П. Створення колекції листопадних магнолій / Т.П. Коршук // Вісн. "Інтродукція та збереження рослинного різноманіття". – Київ : ВПЦ "Київський університет", 1999. – Вип. I. – С. 68–69.

5. Коршук Т. П. Магнолії (*Magnolia*) : монографія / Т.П. Коршук, Р.М. Палагеча. – Київ : ВПЦ "Київський університет", 2007. – 207 с.
6. Палагеча Р.М. Інтродукція, розмноження, акліматизація та впровадження магнолій в озеленення / Р.М. Палагеча // Бюл. Никитського ботанічного саду, 2011. – Вип. 102. – С. 80–86.
7. Фомін О.В. Наслідки акліматизаційних спроб у Київському Ботанічному саду / О.В. Фомін // Вісн. Київського Ботанічного саду. – К., 1925. – Вип. II.
8. Каталог растений Центрального ботанического сада им. Н.Н. Гришко : спр. пособие / под ред. Н.А. Кохно – К. : Наук. думка, 1997. – 436 с.
9. Перспективи подолання негативного впливу проявів кліматичних змін на урбаноландшафти Київського мегаполісу на основі підбору стресотолерантних видів рослин світової флори / Н.Ю. Таран, О.А. Футорна, І.Г. Ольшанський та ін. // Екологічні науки, 2018. – № 2. – 21. – С. 114–118.
10. Котелова Н.В. Оценка декоративности деревьев и кустарников по сезонам года / Н.В. Котелова, О.Н. Виноградова // Физиология и селекция растений и озеленение городов. – М. : РЛМТИ, 1974. – Вип. 51. – С. 32–44.
11. Таран І.В. Пейзажні групи для рекреаційного будівництва / І.В. Таран, А.М. Агапова. – Новосибірськ : Наука, 1981. – 240 с.
12. Калиниченко А.А. Оценка адаптации и целесообразности интродукции древесных растений / А.А. Калиниченко // Бюл. ГБС, 1978. – № 108. – С. 3–8.
13. Методика фенологических наблюдений в ботанических садах СССР / Совет ботан. садов СССР. – М. : ГБС АН СССР, 1975. – 27 с.
14. Булыгин Н.Е. Фенологические наблюдения над древесными растениями / Н.Е. Булыгин. – Ленинград : ЛТА, 1979. – 96 с.

References (Scopus):

1. Palahecha R.M. Introduksiya pivnichno-amerykans'kykh vydiv lystopadnykh mahnoliy u Botanichnomu sadu Kyivsk'oho universytetu ta vykorystannya yikh u landshaftnomu mystetstvi. Visnyk KNU imeni Tarasa Shevchenka. 2012; 30: 34-37. Ukrainian
2. Bogomaz Ye. I., Korshuk T. P. Predpossevnoye vozdeystviye na semena listopadnykh magnoliy. Biologicheskiye osnovy semenovodstva i semenovodstva introdutsentov. Novosibirsk: Nauka; 1974: 154–156. Russian
3. Minchenko N. F., Korshuk T. P. Magnolii na Ukraine. Kiyev: Nauk. Dumka; 1987. 184 s. Russian
4. Korshuk T. P. Stvorenniya kolektsiyi lystopadnykh mahnoliy. Visnyk "Introduktsiya ta zberezheniya roslinnoho riznomanitya". 1999; 1: 68–69. Ukrainian
5. Korshuk T. P., Palahecha R. M. Mahnoliy (Magnolia): monohrafiya. Kyiv: Vyd.-polihraf. tsentr "Kyivsk'yy universytet"; 2007. 207 s. Ukrainian
6. Palahecha R.M. Introduksiya, rozmnozheniya, aklimatyzatsiya ta vprovadzhennya mahnoliy v ozelenennya. Byulleten' Nykyt-skoho botanicheskoho sada. 2011; 102: 80–86. Ukrainian
7. Fomin O.V. Naslidky aklimatyzatsiynykh sprob u Kyivsk'omu Botanichnomu sadu. Visnyk Kyivsk'oho Botanichnoho sadu. 1925; II. Ukrainian
8. Katalog rasteniy Tsentral'nogo botanicheskogo sada im. N. N. Grishko: [spravochnoye posobiye / pod red. N. A. Kokhno. K.: Nauk. Dumka; 1997. 436 s. Russian
9. Taran N.YU., Futorna O.A., Olshans'kyi I.H., Tyshchenko O.V., Boychenko S.H., Badanina V.A., Syetlova N.B. Perspektivy podolannya nehatyvnoho vplyvu proyaviv klimatichnykh zmin na urbanolandshty Kyivsk'oho mehapolisu na osnovi pidboru stres-tolerantnykh vydiv roslin svitovoyi flory. Ekologichni nauky. 2018; 2 (21): 114 – 118. Ukrainian
10. Kotelova N.V. Vinogradova O.N. Otsenka dekorativnosti derev'yev i kustarnikov po sezonam goda. Fiziologiya i selektsiya rasteniy i ozeleneniye gorodov. 1974; 51: 32-44. Russian
11. Taran I.V., Agaapova A.M. Peyzazhnyye gruppy dlya rekreatsionnogo stroitel'stva. Novosibirsk: Nauka; 1981. 240 s. Russian
12. Kalinichenko A. A. Otsenka adaptatsii i tselesoobraznosti introduktsii drevesnykh rasteniy. Byul. GBS. 1978; 108: 3–8. Russian
13. Metodika fenologicheskikh nablyudeniye v botanicheskikh sadakh SSSR / Sovet botan. sadov SSSR. M.: GBS AN SSSR; 1975. 27 s. Russian
14. Bulugin N.Ye. Fenologicheskiye nablyudeniya nad drevesnymi rasteniyami. Leningrad: LTA; 1979. 96 s. Russian.

Надійшла до редколегії 25.01.2019
Отримано виправлений варіант 26.02.2019
Підписано до друку 26.02.2019

Received in the editorial 25.01.2019
Received a revised version on 26.02.2019
Signed in the press on 26.02.2019

Н. Демченко, асп., В. Баданина, канд. биол. наук,
О. Фугорна, канд. биол. наук, Палагеча Р., канд. биол. наук, Н. Таран, д-р биол. наук
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

ДЕКОРАТИВНЫЕ КАЧЕСТВА ИНТРОДУЦИРОВАННЫХ В БОТАНИЧЕСКОМ САДУ ИМ. АКАД. О.В. ФОМИНА ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ СЕМЕЙСТВА MAGNOLIACEAE JUSS

Целью работы было выявить особенности проявления признаков декоративности видов *Magnoliaceae* Juss. на примере растений из коллекции Ботанического сада им. акад. А.В. Фомина УНЦ "Институт биологии и медицины" в условиях киевского мегаполиса. У 12-ти листопадных представителей семейства изучали комплексную и сезонную декоративность, оценивали декоративность отдельного растения, определяли общий годовой показатель декоративности, исследовали сезонный ритм развития растений на основании фенологических наблюдений. Основные физиологические показатели, которые принимались во внимание: бутонизация, раскрытие цветочных и вегетативных почек, формирование листа, цветение, плодоношение. Все исследованные виды в условиях Ботанического сада проходят полный цикл сезонного развития: цветут, развиваются, формируют нормально развитые плоды и семена. По срокам начала вегетации виды разделены на две группы: средние (*L. chinense* (Hemsl.) Sarg., *L. tulipifera* L., *M. stellata* (Siebold & Zucc.) Maxim., *M. tripetala* L., *M. officinalis* Rehder & E.H. Wilson, *M. denudata* Desr., *M. liliiflora* Desr., *M. kobus* DC., *M. soulangeana* Soul.-Bod., *M. salicifolia* (Sieb. Et Zuss.) Maxim., *M. obovata* Thunb.) и поздние (*M. biondii* Pamp.), а по датам начала цветения относительно сезонов года – на три группы: ранневесенние (*M. stellata*, *M. denudata*, *M. salicifolia*, *M. kobus*); поздневесенне-раннелетние (*L. chinense*, *L. tulipifera*, *M. tripetala*, *M. officinalis*, *M. liliiflora*, *M. soulangeana*, *M. obovata*); среднелетние (*M. biondii*). Сделан вывод о высокой декоративности исследованных видов (общий годовой показатель декоративности составляет 4 балла), их высокой адаптационной способностью к изменению условий среды и необходимости более широкого использования магнолиевых в озеленении урбандиафтов как перспективных климатоформирующих растений.

Ключевые слова: *Magnoliaceae*, декоративность, сезонный ритм развития, фенологические наблюдения.

N. Demchenko, Ph. D. stud., V. Badanina, Ph. D.,
O. Futorna, Ph. D., Palagecha R., Ph.D.,
N. Taran, Dr. Sci.
National Taras Shevchenko University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

DECORATIVE QUALITIES OF REPRESENTATIVES OF MAGNOLIACEAE JUSS. INTRODUCED IN THE O.V. FOMIN BOTANICAL GARDEN

The purpose of the work was to find out the features of manifestation of the features of the decorative nature of the species of the *Magnoliaceae* Juss. on the example of plants from the collection of the O.V. Fomin Botanical Garden of the ESC "Institute of Biology and Medicine" on the climatic conditions of the Kiev metropolis. This article provides detailed study the 12 leaf-declining species of the *Magnoliaceae*. We studied the complex and seasonal decorativeness, estimated decorativeness, determined the total annual indicator of decorativeness, investigated the seasonal rhythm of plant development on the basis of phenological observations. Basic physiological indicators that were taken into account: budding, opening of flower and vegetative buds, leaf formation, flowering and fruiting. All species that were investigated undergo a full cycle of seasonal development: beautifully bloom, develop and form normally developed fruits and seeds in conditions of ex situ of the Botanical Garden. The species are divided into two groups according to the beginning of the growing season: medium (*L. chinense* (Hemsl.) Sarg., *L. tulipifera* L., *M. stellata* (Siebold & Zucc.) Maxim., *M. tripetala* L., *M. officinalis* Rehder & E.H. Wilson, *M. denudata* Desr., *M. liliiflora* Desr., *M. kobus* DC., *M. soulangeana* Soul.-Bod., *M. salicifolia* (Sieb. Et Zuss.) Maxim., *M. obovata* Thunb.) and late (*M. biondii* Pamp.); into three groups according to the dates of flowering relative to the seasons of the year: early spring (*M. stellata*, *M. denudata*, *M. salicifolia*, *M. kobus*), late spring and early summer (*L. chinense*, *L. tulipifera*, *M. tripetala*, *M. officinalis*, *M. liliiflora*, *M. soulangeana*, *M. obovata*), middle summer (*M. biondii*). The high decorative of studied species (their total annual decorative rate is 4 points) and their high adoptative ability to changes of environmental conditions are concluded. Thus, there is a necessary to extend the using of magnolias in landscaping of urban landscapes as climate forming plants.

Key words: *Magnoliaceae*, decorativeness, seasonal rhythm of development, phenological observations

УДК 578.81

В. Головань, асп., О. Андрійчук, канд. біол. наук, І. Будзанівська, д-р біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

ВИВЧЕННЯ РІЗНОМАНІТТЯ ВІРУСІВ БАКТЕРІЙ, ВИДІЛЕНИХ ІЗ БІОТОПІВ МОХУ ТА ҐРУНТУ АНТАРКТИЧНОГО РЕГІОНУ

До нинішнього часу частка досліджених наукою найчисленніших біологічних об'єктів – бактеріофагів є мізерною порівняно з іншими біологічними представниками мікро- та макросвіту. Їхні властивості добре досліджені лише для невеликої кількості так званих модельних бактеріофагів. Водночас виділення фагів із екосистем, що функціонують в умовах низьких температур, представляє значний науковий інтерес і має певні методичні складнощі. Метою дослідження було вивчення різноманіття вірусів бактерій (фагів), виділених із біотопів моху та ґрунту антарктичних рослин. Методи: виділення бактеріофагів зі зразків моху та ґрунту, титрування за методом Грація, накопичення фагів у рідкому поживному середовищі з примусовою аерацією, електронна-мікроскопія, статистичні методи. Результати: проведено виділення вірусів бактерій (бактеріофагів) із біотопів моху та ґрунту. Описано морфологію негативних колоній і вірусних часток отриманих ізолятів фагів. Початок утворення негативних колоній спостерігався через 5–7 діб, в інших через 7–10 діб. Закінчувалось їхнє формування ще через 10–12 діб. Найдовше формування негативних колоній відбувалося саме на антарктичних штамах бактеріальних культур. Встановлено їхню таксономічну різноманітність. Виявлені вірусні частки представлено різними морфотипами, притаманні вірусам родин: *Muoviridae*, *Rodoviridae* та *Siphoviridae* порядку *Caudovirales*. Висновки: виділено ізоляти фагів до чутливих бактерій. Описано різноманіття бактеріофагів, що свідчать про таксономічне різноманіття бактеріофагів у наземних біотопах островів Аргентинського архіпелагу та створено колекцію за їхньою характеристикою.

Ключові слова: Антарктида, віруси бактерій (бактеріофаги), вірусні частки.

Вступ. В останні роки значну увагу науковців привертає дослідження Антарктичного континенту. Чисельна кількість організмів, яка є особливим об'єктом дослідження, перебуває в умовах вічної мерзлоти. Мікроорганізми, що циркулюють на Антарктичному континенті та на островах, мають унікальні стратегії адаптації для виживання в середовищі низьких температур [9, 11].

А дослідження особливостей виживання фагових популяцій у природі – їхніх еволюційних зв'язків, адаптації до бактерій, зовнішнього середовища на сьогодні не вивчені. Однією із задач, яка вирішує це питання, є визначення географічного ареалу поширення фагів, вивчення їхніх властивостей та еволюційних особливостей у різних кліматичних умовах.

Віруси чисельно домінують у навколишньому середовищі і становлять велику частку генетичного різноманіття на Землі [15, 20]. Вони впливають на структуру бактеріальних спільнот, генетичне різноманіття та еволюцію мікроорганізмів [16]. Віруси бактерій, здатні змінювати внутрішньо- та міжвидові взаємодії бактерій, таким чином впливають на динаміку бактеріальних популяцій [4, 13].

Інформації про різноманітність і мінливість вірусів бактерій, на сьогодні поширених на Антарктичному континенті, небагато, хоча такі нові незалежні від культивування методи, як метагеноміка, розширили розуміння про багатогранність і мінливість вірусів [5, 10, 14]. Обмеженість інформації про біологічні властивості вірусів в основному пов'язана з відсутністю універсальних генних маркерів для проведення молекулярних досліджень, а також складністю пошуку чутливих бактерій для дослідження біологічних властивостей вірусних спільнот [1, 6, 7]. Зазвичай дослідження в Антарктиці спрямовані на комплексну характеристику чисельності наземних і морських екосистем на всіх рівнях організації, вивчення стратегій виживання антарктичних організмів під впливом екстремальних факторів. На даний час не опубліковано жодного комплексного аналізу вірусного різноманіття в наземних біотопах Антарктиди [8, 12, 17]. З точки зору комплексного підходу до досліджень екосистем увагу слід приділити вірусам, що поширені не лише в прісноводних і морських середовищах, але й в наземних біотопах. Отже, існує потреба у вивченні і дослідженні вірусів мікроорганізмів, поширених на Аргентинських островах. Проведення таких досліджень є актуальною задачею як для встановлення механізмів збереження популяцій фагів у суворих умовах, так і аналізу шляхів їхньої еволюції.

Мета дослідження – вивчення різноманіття вірусів бактерій, виділених з біотопів моху ґрунту антарктичних рослин.

Матеріали і методи. Бактеріофаги виділяли зі зразків ґрунту і моху, відібраних під час сезонних робіт у 2018 р. на архіпелазі Аргентинських островів у місцезнаходженні Української Антарктичної станції "Академік Вернадський", о. Галіндез.

Для виділення бактеріофагів із ґрунту і моху ми випробували декілька методик для пошуку оптимальної:

- 5 г ґрунту поміщали в 50 мл 0,1 М Tris HCl, pH 7,4, з інкубацією протягом 30 хв. Отриману суспензію центрифугували за низької швидкості (протягом 15 хв при 5000 g), отриманий супернатант центрифугували при 37 тис. об./хв протягом 1,5 год. Осад ресуспендували в 0,5 мл 0,1 М Tris HCl, pH 7,4;

- 5 г моху гомогенізували в 50 мл фізіологічного розчину, ресуспендували на орбітальному шейкері протягом 20 хв. Отриману суспензію центрифугували за низької швидкості (протягом 20 хв при 4000 g, а далі фільтрували через мембранний фільтр з порами діаметром 0,45 мкм, отримуючи на виході 30 мл кінцевого фільтрату.

Бактеріофаги виявляли шляхом прямого висіву на поживний агар. Титри визначали в бляшкоутворюючих

одиницях у мл (БУО/мл) методом двошарових агарів за методом Грація. Біологічну активність ізолятів фагів перевіряли на індикаторних штаммах бактерій. У роботі використовували культури фітопатогенних бактерій, люб'язно надані відділом фітопатогенних бактерій (колекція музею Інституту мікробіології та вірусології НАН України ім. Д.К. Заболотного), Національним антарктичним науковим центром.

Використовували 14 індикаторних культур фітопатогенних бактерій: *Erwinia carotovora*; *Erwinia herbicola*; *Xanthomonas campestris*; *Enterobacter cloacae*; *Escherichia coli*; *Pseudomonas veronii*; *Pseudomonas fluorescens* 8573; *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* 7591; *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* 4013; *Clavibacter michignensis* sp.; *Serratia marcescens* sp.; *Bacillus* sp.; *Sphingobacterium thalophilum* sp.; *Paenibacillus* sp.

Електронно-мікроскопічні дослідження проводились з використанням просвічувального електронного мікроскопа JEOL (JEM-1400) Центру колективного користування при Інституті мікробіології і вірусології імені Д. К. Заболотного НАН України [21]. Вимірювання параметрів часток здійснювали за допомогою програм ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>) та Adobe Photoshop CS5, статистичну обробку даних здійснювали в Microsoft Excel.

Результати та їх обговорення. Аналізували зразки ґрунту і моху, відібраних під час сезонних робіт у 2018 р. на архіпелазі Аргентинських островів у місцезнаходженні Української Антарктичної станції "Академік Вернадський". Проби ґрунту і моху були відібрані з 14-ти різних ділянок, не охоплених льодом: Галіндез Д-4; Галіндез Д-3; Галіндез Д-2; Галіндез ВЛФ; Галіндез, Крапля; Галіндез, Дізель; Галіндез, точка колобанта; Галіндез Метео; Галіндез, поїнт 24; Галіндез, мис Магніт 24; Галіндез Д-5; Галіндез Д-12; Галіндез Щучник дернистий Пунта Аренса. Усі подальші дослідження проводились після доставки в Україну.

Зразки для дослідження відбирались у стерильних поліетиленових пакетах при температурі, нижче 0° С і були доставлені в лабораторію, де зберігалися у морозильних камерах за температури –16–18° С. Усі подальші дослідження проводились в ламінарному боксі для уникнення контамінації з лабораторними штамми бактеріофагів і бактерій. На першому етапі було отримано суспензії зразків, які були сконцентровані та досліджені за допомогою методу електронної мікроскопії. Це дало змогу встановити морфологічні особливості бактеріофагів та таксономічну приналежність.

За результатами електронно-мікроскопічних досліджень виявлено наявність ікосаедричних і сферичних вірусоподібних часток та структурних елементів віріонів (уламки хвостових відростків, скорочені чохла хвостових відростків, відламані головки). Виявлені вірусні частки були представлені різними морфотипами притаманні вірусам таких родин: *Myoviridae*, *Podoviridae* та *Siphoviridae* порядку *Caudovirales* (рис. 1).

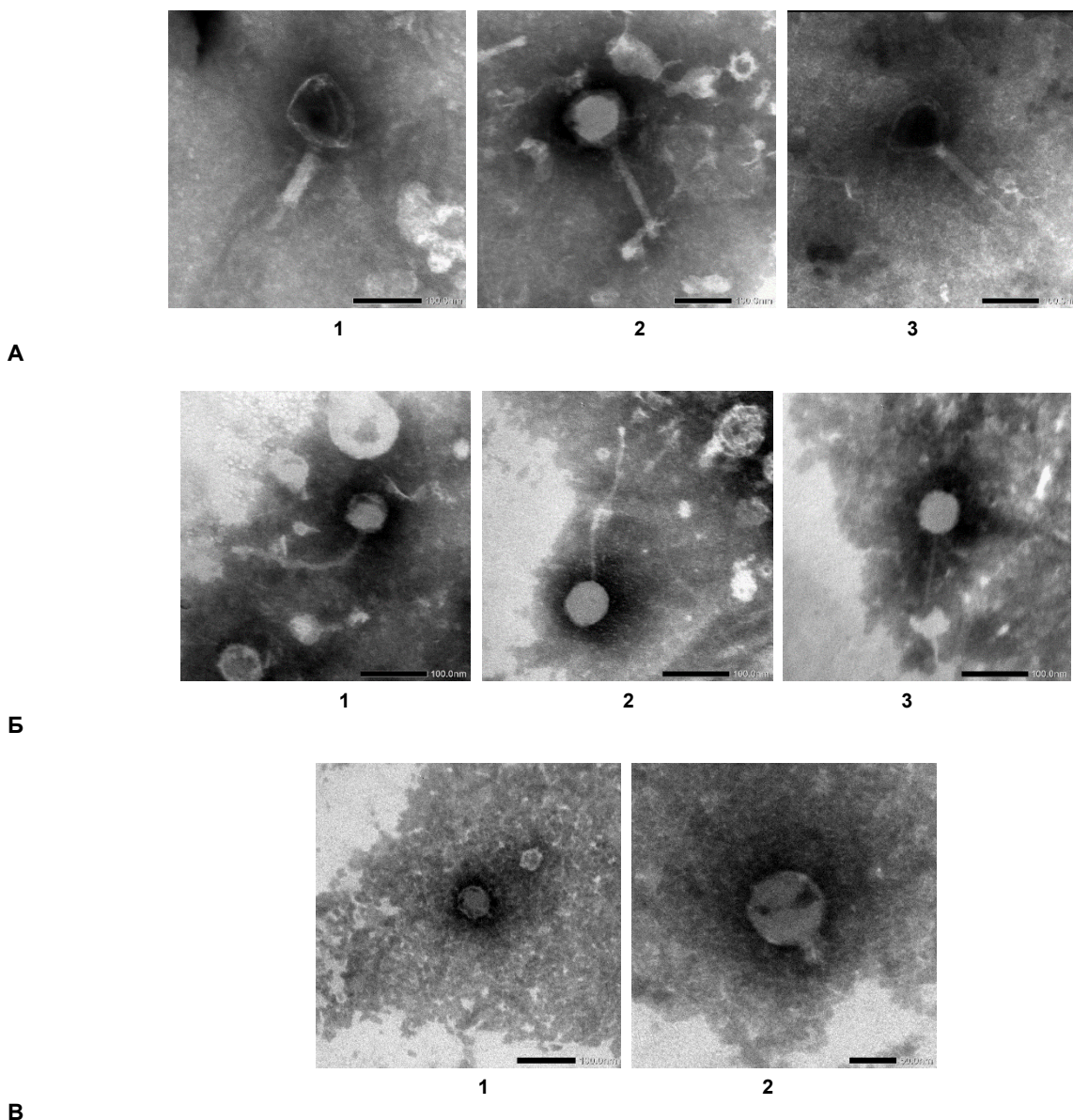


Рис. 1. Електронно-мікроскопічне зображення вірусоподібних часток, виділених із моху та ґрунту

При розгляді критеріїв, які використовують для диференціації фагів, визначення морфологічної будови дозволить вважати вірусами відомих морфологічних типів. Визначення розмірів даних віріонів дозволяє казати про їхню неоднорідність. Між ними спостерігалась різниця як у розмірі часток, так і розмірі хвостових відростків.

Серед виявлених вірусних і вірусоподібних часток були ідентифіковані:

А) фаги морфотипу А1 з ікосаедричною головкою і хвостовим відростком, що скорочується, які можна віднести до родин *Myoviridae* порядку *Caudovirales*. Багато таких вірусних часток мали скоротливі хвостові відростки та/або порожні головки. Розміри таких вірусних часток становили: довжина хвостового відростка $105,5 \pm 4$ нм, розмір головки 108 ± 3 нм (А1); довжина хвостового відростка 180 ± 4 нм, розмір головки 95 ± 2 нм (А2); довжина хвостового відростка $111,3 \pm 4$ нм, розмір головки 106 ± 3 нм (А3);

Б) фаги морфотипу В1, В2 з ікосаедричною головкою і хвостовим відростком, що не скорочується, які можна віднести до родин *Siphoviridae* порядку *Caudovirales*. Розміри таких вірусних часток становили: – довжина хвостового відростка 245 ± 4 нм, розмір головки 72 ± 3 нм

(Б1); – довжина хвостового відростка 253 ± 3 нм, розмір головки 67 ± 1 нм (Б2); – довжина хвостового відростка 102 ± 3 нм, розмір головки 65 ± 4 нм (Б3);

В) фаги морфотипу С1 з ікосаедричною головкою і коротким хвостовим відростком, які можна віднести до родин *Podoviridae* порядку *Caudovirales*. Розміри таких вірусних часток становили: – розмір головки 60 ± 4 нм (В1); – розмір головки 85 ± 2 нм (В2);

На сьогодні за літературними даними існує повідомлення про істотне поширення бактеріофагів у різноманітних екологічних нішах Землі. Водночас досі майже нічого невідомо про бактеріофаги мерзлотних ґрунтів, у тому числі у ґрунтових шарах Антарктиди. Виникає запитання стосовно бактерій-хазяїв даних бактеріофагів. Як відомо, ефективність виділення вірусів із природного середовища коливається в широких межах і часто супроводжується певними труднощами, що зумовлюються малою кількістю вірусів у пробах. Тому, зважаючи на невисоку ймовірність поширення в Антарктиді фітопатогенної мікрофлори, пряме виділення фагів до неї з числих проб представляє значний інтерес.

Для визначення кола чутливих хазяїв ізолятів було проведено дослідження спектра біологічної активності

фагів на 14-ти штаммах фітопатогенних бактерій. За літературними даними і раніше проведеними дослідженнями до фагів, виділених з антарктичного регіону, важко підібрати чутливі бактеріальні культури. Тому використовували бактеріальні ізоляти, які мають різні біологічні властивості, морфологію і належать до різних родів. У роботі були використанні бактеріальні культури, виділені з помірної частини регіону (Україна): *Erwinia carotovora*; *Erwinia herbicola*; *Xanthomonas campestris*; *Enterobacter cloacae*; *Escherichia coli*; *Pseudomonas fluorescens* 8573; *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* 7591; *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* 4013; *Clavibacter michignensis* sp.; *Serratia marcescens* sp.; *Sphingobacterium thalophilum* sp.; *Paenibacillus* sp. та полярного (Антарктида) регіону: *Bacillus* sp, *Pseudomonas veronii*.

На даному етапі виникла проблема при виділенні фагів методом подвійних агарових шарів. Газон бактеріальної культури формувався щільно, негативні колонії

виявлено не було. Було зроблено припущення, що дане явище пов'язане з двома факторами: негативні колонії проявляються пізно, починаючи з 5 доби, і закінчуються формування на 12 добу інкубації. За цей час бактеріальна культура встигає набутти високої щільності, а це може бути пов'язане з температурними оптимумами інкубації. Для цього було поділено експеримент на 3 дослідні підгрупи, одні чашки інкубували при температурі +26–28° С, інші при +15–17° С і треті при +4–6° С. Встановлено, що формування негативних колоній бактеріофагів найкраще відбувається за температури +15–17° С. Це можна пояснити тим, що при досить високій температурі фаги повністю або частково інактивуються і втрачають свою літичну активність. При досить низькій температурі не відбувається ріст бактеріальної культури, тому утворення негативних колоній зафіксувати неможливо (табл. 1).

Таблиця 1. Спектр біологічної активності бактеріофагів чутливих до бактеріальних ізолятів

Бактеріальні ізоляти	Зразки	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
<i>Bacillus</i> sp.	плями лізису	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Clavibacter michignensis</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i>											дрібні негативні колонії, різної морфології, мутні >100	-	-	-	-
<i>Er. herbicola</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Erwinia carotovora</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 8573	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. syringae</i> pv. <i>lachrymans</i> 7591	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	дрібні негативні колонії, різної морфології, прозорі >100	-
<i>P. veronii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	дрібні негативні колонії, прозорі >100	-
<i>P. savastanoi</i> pv. <i>phaseolicola</i> 4013	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Paenibacillus</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Serratia marcescens</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Sphingobacterium thalophilum</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Xanthomonas campestris</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Проведення таких досліджень представляє актуальну задачу як для встановлення механізмів збереження популяцій фагів в екстремальних умовах, так і для аналізу шляхів їхньої еволюції. Зокрема, виявлення літичної активності фагів до фітопатогенних бактерій дозволяє припустити ймовірність наявності специфічних механізмів, що дозволяють набувати здатності адаптації до нових хазяїв, і поширення в бактеріальних популяціях. Для фагів, які виявляли літичну активність, було характерно утворення типових дрібних негативних колоній діаметром 0,1–0,3 см, кількість яких коливалась від 20 до 100 бляшкоутворюючих одиниць у мл (БУО/мл).

Негативні колонії, що були отримані й досліджені в лабораторії, розрізнялись за розмірами, особливостями морфології та швидкості формування їхніх бляшок. Негативні колонії утворені фагами зразка № 13 на штаммах бактеріального ізоляту *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* 7591 були не однорідними, різної морфології, прозорі. Зразок № 13 містив фаги, які утворювали негативні колонії на штаммах бактеріального ізоляту

Pseudomonas veronii. Різниця між колоніями, утвореними на українському штамі *Pseudomonas* та антарктичному штамі *Pseudomonas* полягала в тому, що колонії утворені на штамі бактеріальної культури, виділеної з біотопів Антарктиди були однорідними та прозорими. Це може свідчити про те, що штами українського бактеріального ізоляту мають більшу кількість рецепторів і можуть бути уражені фагами декількох видів, що підтверджується утворенням негативних колоній різної морфології. Натомість бактеріальний ізолят, виділений безпосередньо в регіоні відбору проб (Антарктида), уражується фагом лише одного виду. Фаги зразка № 1 утворювали плями лізису на штаммах бактеріального ізоляту *Bacillus* sp, плями були прозорі й мали різний розмір та не чіткі краї, тому було вирішено не класифікувати їх, як негативні колонії. Морфологія негативних колоній зразка № 10 на штаммах бактеріального ізоляту *Enterobacter cloacae* була різною, спостерігали утворення більше 5-ти видів колоній різної морфології, зокрема,

мутні діаметром 0,3 см, 0,5 см та 0,7 см та прозорі негативні колонії діаметром 0,1 см та 0,2 см.

При посіві фагів методом двошарових агарових шарів на чутливі культури, початок утворення негативних колоній був різний. В одних він спостерігався через 5–7 діб, в інших через 7–10 діб. Закінчувалось їхнє формування вже через 10–12 діб. Найдовше формування негативних колоній відбувалося саме на антарктичних штаммах бактеріальних культур. Порівняння морфології негативних колоній досліджуваних фагів показує їхню відмінність. При виділенні фагів встановлено, що нега-

тивні колонії утворюються, як на антарктичних штаммах бактерій (*Pseudomonas veronii*, *Bacillus* sp.), так і на українських ізолятах (*Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* 7591, *Enterobacter cloacae*) (рис. 2).

Результат виділення бактеріофагів з ґрунту та отримання інтактних збережених часток залежить від характеристик самих вірусів, їх стійкості до змін різних фізичних чинників зовнішнього середовища та від підбору оптимальних лабораторних методик. Це особливо актуально при дослідженні регіонів із характеристиками, відмінними від помірних кліматичних зон.

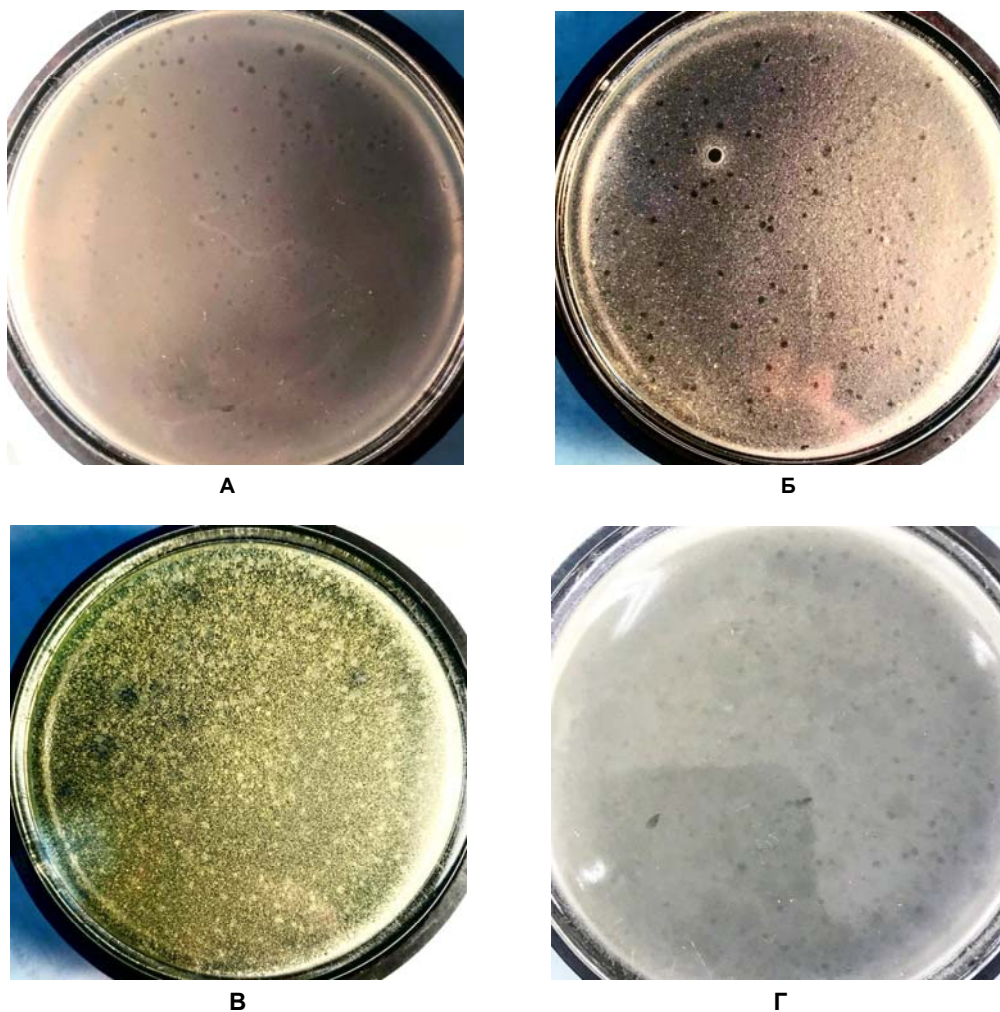


Рис. 2. Морфологія негативних колоній фагів на індикаторних бактеріях:
а) *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* 7591; б) *Pseudomonas veronii*;
в) *Bacillus* sp.; г) *Enterobacter cloacae*

Таким чином, виявлення літичної активності фагів до фітопатогенних бактерій дозволяє припустити ймовірність виділення нових вірусів мікроорганізмів із характерними властивостями, однією із яких є висока здатність адаптації до чутливих бактерій. Виявлені бактеріофаги відіграють свою роль у регулюванні щільності популяцій бактерій-хазяїв, беруть участь у харчових ланцюжках та горизонтальній передачі генетичної інформації.

Отримані результати свідчать про таксономічну різноманітність бактеріофагів, виділених з наземних біотопів островів Аргентинського архіпелагу. За попередньою оцінкою, незважаючи на географічну ізоляваність островів Антарктики і специфічні кліматичні умови на них, більшість ізольованих бактеріофагів належать до традиційних класичних таксонів, поширених у різних регіонах Землі. Ці дослідження дадуть можливість про-

довжити глибинний аналіз визначення складу вірусних популяцій в умовах Антарктиди, встановлення джерел вірусних інфекцій, оцінки розповсюдження та визначення їх ролі в екологічному аспекті та мікробіологічних спільнот в унікальних умовах.

Створення колекції фагів фітопатогенних бактерій Антарктиди, що виявляють свою активність в умовах знижених температур, може представляти собою збирання унікального генофонду вірусів. Дослідження може закласти основи створення біотехнологічних прикладних розробок із їх використанням. Таке використання може бути пов'язане як з можливими дослідженнями в галузі обмеження чисельності бактеріальних патогенів при сільськогосподарському виробництві, так і виявленням високоактивних ферментів, які можуть бути використані в молекулярно-біологічних дослідженнях.

Автори висловлюють подяку Національному антарктичному науковому центру Державного комітету України з питань науки, інновацій та інформатизації за надання зразків для досліджень та підтримку.

Висновки. Зі зразків моху і ґрунту о. Галіндез було виділено ізоляти фагів. Зразки містили значну кількість бактеріофагів різної морфології та розмірів поширених на Аргентинських островах, Антарктида, що свідчить про біорізноманіття вірусного світу. За результатами ЕМ фаги віднесені до таксономічних груп за особливостями їх будови: до родини *Podoviridae* (С1морфотипу), до родини *Siphoviridae* (В1-В2 морфотипів), родини *Myoviridae* (А1, А3 – морфотипів), порядку *Caudovirales*.

Встановлено, що температурний оптимум появи плям лізису та негативних колоній на газоні бактеріальних культур відбувається за температури +15–17°С, на 3–12 добу. Негативні колонії, що були отримані і досліджені в лабораторії, розрізнялись за розмірами, особливостями морфології та швидкості формування їх бляшок. Установлення біологічної активності фагів до бактерій дозволяє припустити ймовірність виділення нових вірусів мікроорганізмів із високою здатністю адаптації до чутливих бактерій.

Раніше проводились дослідження, які заклали основу для розуміння біорізноманіття Антарктики [18, 19], але роль вірусів у ґрунтових екосистемах залишається не вивченою. Бактеріофаги, виділені в крайніх широтах для забезпечення процесів репродукції, можуть виявляти невідомі механізми або ферментні системи. Дані дослідження функціонування систем "фітопатогенні бактерії – бактеріофаги" при низьких температурах практично повністю відсутні, що зумовлює актуальність задачі – вивчення властивостей фагів та важливість створення їх колекції.

Список використаних джерел:

1. Diel cycling and long-term persistence of viruses in the ocean's euphotic zone. / F.O. Aylward, D. Boeuf, D.R. Mende, E. M. Wood-Charlson et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2017. – Vol. 114. – P. 11446–11451.
2. Genomic analysis of uncultured marine viral communities. / M. Breitbart, P. Salamon, B. Andresen et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2002. – Vol. 99. – P. 14250–14255.
3. Ocean plankton. Patterns and ecological drivers of ocean viral communities. / J.R. Brum, J.C. Ignacio-Espinoza, S. Roux et al. // Sci., 2015. – Vol. 348. – P. 1261498.
4. Antarctic terrestrial life – challenging the history of the frozen continent? / P. Convey, Gibson, JAE, C. Hillenbrand et al. // Bio. Rev., 2008. – Vol. 83. – P. 103–107.
5. Evelien M. Environmental drivers of viral community composition in Antarctic soils identified by viromics / M. Evelien Adriaenssens, et al. // Microbiome, 2017. – Vol. 5. – P. 83–89.
6. Jensen E.C. Prevalence of broad-host-range lytic bacteriophages of *Sphaerotilus natans*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa* / E.C. Jensen, H.S. Schrader, B. Rieland et al. // Appl. Environ. Microbiol., 1998. – Vol. 64, № 2. – P. 575–580.
7. Antarctic bacteria inhibit growth of food-borne microorganisms at low temperatures / A. O'Brien, R. Sharp et al. // FEMS Microbiol. Ecology, 2004. – Vol. 48. – P. 157–167.
8. Vegan: Community Ecology Package / J. Oksanen, F.G. Blanchet et al. // R package version 2.5.2, 2018.
9. Evaluation of bias induced by viral enrichment and random amplification protocols in metagenomic surveys of saliva DNA viruses. / M. Parras-Moltó, A. Rodriguez-Galet, P. Suarez-Rodriguez et al. // Microbiome, 2018. – Vol. 5. – P. 119–127.
10. Paterson H. Antarctic sea ice viral dynamics over an annual cycle / H. Paterson and J. Laybourn-Parry // Polar Biol., 2012. – Vol. 35. – P. 491–497.
11. Seasonal changes in the concentration and metabolic activity of bacteria and viruses at an Antarctic coastal site / I. Pearce, A.T. Davidson, E. M. Bell, et al. // Aquat. Microb. Ecol., 2007. – Vol. 47. – P. 11–23.
12. Filamentous bacteriophage: biology, phage display and nanotechnology applications / J. Rakonjac N. Bennett, et al. // Curr. Issues Mol. Biol., 2012. – Vol. 13. – P. 51–76.
13. Bacteriophage in polar inland waters / Ch. Sävström, J. Lisle et al. // Extremophiles, 2008. – Vol. 12. – P. 167–175.
14. Metagenomic characterisation of the viral community of Lough Neagh, the Largest Freshwater Lake in Ireland / T. Skvortsov, C. de Leeuwe et al. // PLoS ONE, 2016. – Vol. 11. – P. e0150361.
15. Suttle C.A. Marine viruses – major players in the global ecosystem / C.A. Suttle // Nature Rev. Microbiology, 2007. – Vol. 5, N 10. – P. 801–812.
16. Weinbauer M. G. Ecology of prokaryotic viruses / M.G. Weinbauer // FEMS Microbiol., 2004. – Vol. 28. – P. 127–181.
17. Wommack K.E. Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems / K.E. Wommack and R.R. Colwell // Microbiol. Mol. Biol., 2000. – Vol. 64. – P. 69–114.
18. Мась Е.В. Экологическая роль вирусов фитопатогенных бактерий в Антарктиде / Е.В. Мась, Е.Н. Андрийчук, В.П. Полищук // Тр. Ин-та Микробиологии НАН Азербайджана. – Баку, 2009. – Т. 7. – С. 59–63.
19. Мась О.В. Характеристика фагів ізольованих із зразків аргентинських островів / О.В. Мась, Е.Н. Андрийчук, В.П. Полищук // Агро-екологічний ж-л, 2010. – С. 149–152.
20. Комплексне вивчення антарктичної біоти / В.П. Полищук, І.Ю. Костіков, Н.Ю. Таран та ін. // Український Антарктичний ж-л, 2009. – № 8. – С. 292.
21. Тихоненко А.С. Ультраструктура вірусів бактерій / А.С. Тихоненко. – К.: Наука, 1968.

References (Scopus):

1. Aylward, F. Diel cycling and long-term persistence of viruses in the ocean's euphotic zone. / Aylward, F. O., Boeuf, D., Mende, D. R., Wood-Charlson, E. M., et al // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2017. – Vol. 114. – P. 11446–11451.
2. Breitbart, M. Genomic analysis of uncultured marine viral communities. / Breitbart, M., Salamon, P., Andresen, B., et al // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2002. – Vol. 99. – P. 14250–14255.
3. Brum, J. Ocean plankton. Patterns and ecological drivers of ocean viral communities / Brum, J. R., Ignacio-Espinoza, J. C., Roux, S., et al // Science. – 2015. – Vol. 348. – P. 1261498.
4. Convey P. Antarctic terrestrial life – challenging the history of the frozen continent? / Convey P. Gibson, JAE, Hillenbrand, C., et al // Bio. Rev. – 2008. – Vol. 83. – P. 103–107.
5. Evelien M. Environmental drivers of viral community composition in Antarctic soils identified by viromics / Evelien M. Adriaenssens, et al // Microbiome – 2017. – Vol. 5. – P. 83–89.
6. Jensen E.C. Prevalence of broad-host-range lytic bacteriophages of *Sphaerotilus natans*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa* / E.C. Jensen, H.S. Schrader, B. Rieland et al. // Appl. Environ. Microbiol. – 1998. – Vol. 64, № 2. – P. 575–580.
7. O'Brien, A. Antarctic bacteria inhibit growth of food-borne microorganisms at low temperatures / O'Brien, A., Sharp, R., et al // FEMS Microbiol. Ecology – 2004. – Vol. 48. – P. 157–167.
8. Oksanen, J. Vegan: Community Ecology Package / Oksanen, J., Blanchet, F. G., et al // R package version 2.5.2 – 2018.
9. Parras-Moltó, M. Evaluation of bias induced by viral enrichment and random amplification protocols in metagenomic surveys of saliva DNA viruses. / Parras-Moltó, M., Rodriguez-Galet, A., Suarez-Rodriguez, P. et al // Microbiome – 2018. – Vol. 5. – P. 119–127.
10. Paterson, H. Antarctic sea ice viral dynamics over an annual cycle. / Paterson, H., and Laybourn-Parry, J. // Polar Biol – 2012. – Vol. 35. – P. 491–497.
11. Pearce, I. Seasonal changes in the concentration and metabolic activity of bacteria and viruses at an Antarctic coastal site / Pearce, I., Davidson, A. T., Bell, E. M., et al // Aquat. Microb. Ecol. – 2007. – Vol. 47. – P. 11–23.
12. Rakonjac J. Filamentous bacteriophage: biology, phage display and nanotechnology applications / Rakonjac J., Bennett N., et al // Curr. Issues Mol. Biol. – 2012. – Vol. 13. – P. 51–76.
13. Sävström, Ch. Bacteriophage in polar inland waters / Sävström, Ch., Lisle, J., et al // Extremophiles – 2008. – Vol. 12. – P. 167–175.
14. Skvortsov, T. Metagenomic characterisation of the viral community of Lough Neagh, the Largest Freshwater Lake in Ireland. / Skvortsov, T., de Leeuwe, C., et al // PLoS ONE – 2016. – Vol. 11. – P. e0150361.
15. Suttle C.A. Marine viruses – major players in the global ecosystem / C.A. Suttle // Nature Rev. Microbiology. – 2007. – Vol. 5, N 10. – P. 801–812.
16. Weinbauer, M. G. Ecology of prokaryotic viruses. / Weinbauer, M. // FEMS Microbiol. – 2004. – Vol. 28. – P. 127–181.
17. Wommack, K. E. Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems. / Wommack, K. E., and Colwell, R. // Microbiol. Mol. Biol. – 2000. – Vol. 64. – P. 69–114.
18. Mas' E.V. EHkologicheskaya rol' virusov fitopatogennykh bakterij v Antarktide / Mas' E.V., Andrijchuk E.N., Polishchuk V.P. // Trudy Instituta Mikrobiologii NAN Azerbajdzhanu Baku. – 2009. – T. 7. – S. 59–63.
19. Mas' O.V. Harakteristika fagiv izolvanih iz zrazkiv argentsinskih ostroviv. / Mas' O.V., Andrijchuk E.N., Polishchuk V.P. // Agroekologichnij zh. – 2010. – S. 149–152.
20. Polishchuk V.P. Kompleksne vivchennya antarktichnoi bioti / Polishchuk V.P., Kostikov I.YU., Taran N.YU. ta in. // Ukrain's'kij Antarktich-nij Zhurnal. – 2009. – №8. – С. 292.
21. Tihonenko A.S. Ul'trastruktura virusov bakterij: "Nauka". – K., 1968.

Надійшла до редакції 25.01.2019

Отримано виправлений варіант 26.02.2019

Підписано до друку 26.02.2019

Received in the editorial 25.01.2019

Received a revised version on 26.02.2019

Signed in the press on 26.02.2019

В. Головань, асп., Е. Андрійчук, канд. біол. наук, І. Будзанівська, д-р біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

ИЗУЧЕНИЕ РАЗНООБРАЗИЯ ВИРУСОВ БАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ БИОТОПОВ МХА И ПОЧВЫ АНТАРКТИЧЕСКОГО РЕГИОНА

К настоящему времени исследования многочисленных биологических объектов – фагов, является мизерной по сравнению с другими биологическими представителями микро- и макромира. Их свойства хорошо изучены лишь для небольшого числа так называемых "модельных бактериофагов". В то же время, выделение фагов с экосистем, функционирующих в условиях низких температур, представляет значительный научный интерес и имеет определенные методические сложности. Целью исследования было изучение разнообразия вирусов бактерий, выделенных из биотопов мха и почвы антарктических растений. Методы: выделение бактериофагов из образцов мха и почвы, титрования методом по Грациа, накопления фагов в жидкой питательной среде с принудительной аэрацией, электронная микроскопия, статистические методы. Результаты проведения выделения вирусов бактерий (бактериофагов) с биотопов мха и почвы. Описана морфология негативных колоний и вирусных частиц, полученных из изолятов фагов. Начало образования негативных колоний наблюдался через 5–7 суток, в других через 7–10 суток. Заканчивалось их формирования еще через 10–12 суток. Дольше всего формирование негативных колоний происходило именно на антарктических штаммах бактериальных культур. Установлено их таксономическую принадлежность. Выявленные вирусные частицы были представлены различными морфотипами, присущие вирусам, которые относятся к семействам: *Myoviridae*, *Podoviridae* и *Siphoviridae* порядка *Caudovirales*. Выводы: выделены изоляты фагов к чувствительным бактериям. Описано разнообразие бактериофагов, которое свидетельствует о таксономическом различии бактериофагов в наземных биотопах островов Аргентинского архипелага. Создана коллекция изолятов бактериофагов с их характеристикой.

Ключевые слова: Антарктида, вирусы бактерий (бактериофаги), вирусные частицы.

V. Holovan, Ph. D. stud., O. Andriichuk, Ph. D., I. Budzanivska, Dr. Sci.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

INVESTIGATION OF DIVERSITY OF BACTERIAL VIRUSES, ISOLATED FROM MOSS AND SOIL BIOTOPS OF ANTARCTIC REGION

Until now, there is a little number of scientifically investigated phages, in comparison to other biological representatives of the micro and macro world. Their properties are well studied only for a small number of so-called model bacteriophages. At the same time, the extraction of phages from ecosystems that function in low temperatures represents considerable scientific interest and has some methodological difficulties. The aim of the research was to study the diversity of viruses of bacteria isolated from the moss and soil of Antarctic plants. Methods: isolation of bacteriophages from moss and soil specimens, titration by the Gratia method, accumulation of phages in a liquid nutrient medium with forced aeration, electron microscopy, statistical methods. Results: The isolation of bacterial viruses (bacteriophages) from moss and soil biotops has been carried out. The morphology of negative colonies and viral particles of obtained phage isolates is described. Start of the negative colonies formation was observed in 5–7 days, in others after 7–10 days. Their formation was completed after 10–12 days. The longest formation of negative colonies occurred precisely on strains of Antarctic bacterial cultures. Their taxonomic diversity is established. The detected viral particles were represented by different morphotypes, which are typical for the viruses of the families *Myoviridae*, *Podoviridae* and *Siphoviridae* of the *Caudovirales* order. Conclusions: isolates of phages to sensitive bacteria were extracted. A description of the diversity of bacteriophages has been made, which shows the taxonomic diversity of bacteriophages in the terrestrial biotopes of the islands of the Argentine archipelago and collection according to their characteristics was created.

Key words: Antarctica, bacterial viruses (bacteriophages), viral particles.

УДК:612.111.33: 577.19(16)

Л. Дяченко, асп., Л. Степченко, канд. біол. наук
Дніпровський державний аграрно-економічний університет, Дніпро, Україна

ОЦІНКА ВИКОРИСТАННЯ КОРМОВИХ ДОБАВОК ГУМІНОВОЇ ПРИРОДИ ЗА ЛЕЙКОЦИТАРНИМИ ІНДЕКСАМИ У ЩУРІВ ПІСЛЯ КОМБІНОВАНОГО СТРЕСУ

У відповідь на дію стрес-факторів різного ґенезу в живому організмі запускається каскад адаптивних реакцій, які можуть нівелювати функціональні порушення гомеостазу. Комбінування впливу різних стрес-факторів може викликати надмірне утворення та накопичення активних форм кисню, що тягне за собою цілу низку патологічних станів, які створюють передумови для розвитку великої кількості захворювань. Одним з показників розвитку адаптації та інтегральним показником стану організму вважається система крові, особливо, лейкоцитарна формула, перерозподіл якої дає змогу проаналізувати характер впливу та оцінити інтенсивність адаптивних процесів в організмі за рахунок функцій, які виконують різні форми лейкоцитів. Лейкоцитарні індекси, в яких використовували параметри лейкоцитарної формули, дають змогу оцінити ступінь ендогенної інтоксикації, розвитку резистентності та характер клітинного імунітету за впливу стрес-факторів на організм тварин та людини. Тому, у статті розглянуто можливість оцінки превентивного впливу природних антиоксидантів гумінової природи за лейкоцитарними індексами на організм щурів на тлі водно-імобілізаційного комбінованого стресу (ВІКС). Для цього тварин розділили на п'ять груп по 6 тварин: 1- група інтактні тварини (контроль); 2-5 – дослідні групи. Тварини всіх дослідних груп додатково отримували перорально, індивідуально за допомогою зонду впродовж 18 діб воду, кормові добавки "Гумілід" (в розрахунок 5 мг/кг маси тіла за діючою речовиною), "Еко – Імпульс Animal" (з розрахунок 2,5 мг/кг маси тіла) та вітамін Е (в розрахунок 50мг/кг маси тіла). У тварин 2, 3, 4 та 5 груп моделювали стрес. Встановлено, що за дії водно-імобілізаційного комбінованого стресу к крові щурів відбувається зростання клітин лейкоцитарного ряду, головним чином за рахунок збільшення еозинофілії та паличкоядерних нейтрофілів. Використання у достресовий період природного антиоксиданту, кормової добавки "Гумілід" викликає зменшення кількості лейкоцитів на 41% у порівнянні зі значеннями у тварин, які в цей період отримували очищену воду та не відрізнялась від значень у інтактних тварин. Зміна лейкоцитарних індексів вказує на функціональні зміни в організмі та наявність нейтрофільного зсуву на тлі ВІКС у щурів. Також, дія ВІКС призводить до виходу в кров'яне русло більш молодих форм нейтрофілів, збільшенню як процентної частки еозинофілії, так і кількісної. За превентивного використання кормових добавок гумінової природи "Гумілід" та "Еко-Імпульс Animal" та вітаміну Е досліджувані показники наближаються до значень контрольної групи.

Ключові слова: лейкоцити, "Гумілід", "Еко-імпульс animal", стрес.

Вступ. Вплив будь-якого типу стресу (психологічного, імобілізаційного, хімічного, фізичного та ін.) на тварин, супроводжується короткочасною чи довготрива-

лою активацією окисних процесів, які в свою чергу запускають каскадні реакції адаптації, що необхідні для пристосування та нормального функціонування живого

організму (Garkavy L.H. 2007). Одним з показників розвитку адаптації та інтегральним показником стану організму вважається система крові, особливо, лейкоцитарна формула, перерозподіл якої дає змогу проаналізувати характер впливу та оцінити інтенсивність адаптивних процесів в організмі за рахунок функцій, які виконують різні форми лейкоцитів (Akimova V.M. 2015). Лейкоцитарні індекси в яких використовували параметри лейкоцитарної формули, вважаються показниками, які характеризують ступінь ендокринної інтоксикації, розвитку резистентності та характер клітинного імунітету за впливу стрес-факторів на організм тварин та людини. Ці індекси мають діагностичне та прогностичне значення, дають змогу оцінити роботу ефektorних механізмів імунної системи, а також рівень імунологічної реактивності, яка визначає процес формування неспецифічних адаптаційних реакцій в організмі.

З метою стимуляції клітинного імунітету організму застосовуються різноманітні засоби, наприклад вітаміни (Efimov V.G. 2015, Belay I.M. 2001) та мікроелементи (Griban V.G. 2008). Серед численної кількості біологічно-активних речовин (БАР), які можуть підвищувати рівень неспецифічної резистентності організму за дії стрес-факторів, особливої уваги заслуговують гумінові речовини з біобезпечного торфу. Вони є продукти багатостадійної трансформації живого у природі, та збереження органічної речовини та енергії від дисипації та можуть впливати на фізіолого-біохімічний статус тварин (Stepchenko L.M. 2006-2018, Buchko O.M. 2013, Mikhailenko E.O. 2017, Efimov B.G. 2015) та на лейкоцитарний ряд клітин (Efimov V.G. 2009). В попередніх дослідженнях виявили біологічний ефект та встановили оптимальні кількості кормових добавок "Гумілід" та "Еко-Імпульс Animal" задієючою речовиною, які мали позитивну біологічну дію на організм щурів (Diachenko L.M., Stepchenko L.M. 2017, 2018). Однак, що стосується оцінки впливу цих речовин у складі різних кормових добавок гумінової природи на лейкоцитарні індекси на тлі водно-імобілізаційного комбінованого стресу (ВІКС), дослідження не проводились.

Тому, метою даного експерименту було дослідження впливу природних антиоксидантів кормових добавок гумінової природи "Гумілід" та "Еко-Імпульс Animal" на лейкоцитарні індекси крові щурів на тлі впливу водно-імобілізаційного комбінованого стресу.

Матеріали та методи дослідження. Дослідження проводили на білих статевозрілих молодих щурах-самцях масою тіла 180-200 г на базі віварію. Впродовж усього експерименту щурів утримували за стандартними умовами, з вільним доступом до води та корму.

Тварин було поділено на п'ять груп по 6 тварин у кожній: 1- група інтактні тварини (контроль); 2-5 – дослідні групи. Щурів 2 групи утримували за стандартних умов та для чистоти експерименту давали додатково очищену воду; 3 – щури, які отримували додатково до раціону, водний розчин природного антиоксиданту кормової добавки гумінової природи (ПАО КДГП) "Гумілід" (ТУ У 15.7-00493675004 2009) в кількості 5 мг/кг маси тіла, 4 – тварини, які отримували додатково до раціону, водний розчин кормової добавки "Еко-Імпульс Animal" (ТУ У 10.9-00493675-008 2016) з розрахунку 2,5 мг/кг маси тіла, тварини 5 групи отримували масляний розчин вітаміну Е в кількості 50 мг/кг маси тіла (Diachenko and Stepchenko., 2017, 2018) Тваринам всіх експериментальних груп воду, кормові добавки та вітамін Е відповідно, вводили перорально, індивідуально впродовж 18 діб. Після чого у тварин 2, 3, 4 та 5 груп моделювали стрес. За основу було взято модель водно-імобілізаційного стресу (Takagi K. And Okabe, 1968; Weiner, 1996) в ком-

бінації з моделлю емоційного стресу, за рахунок чого був досягнутий ефект комбінованого стресу.

Кров для досліджень забирали з хвостової вени (на початку експерименту) та під тіопенталовим наркозом (60 мг/кг) та з серця (правого шлуночка) на наступний день після моделювання стресу. У стабілізованій крові щурів визначали лейкоцитарну формулу на автоматичному гематологічному аналізаторі Automated Veterinary Hematology Analyzer PCE 90Vet (HighTechnologyInc., США) на базі Науково-дослідного центру біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК.

Розрахунковим методом отримані наступні індекси (ЛІ):

$$ЛІ = ((4 * \text{мол} + 3 * \text{юн} + 2 * \text{палічокяд} + 1) + \text{сегм} * (0 - 1)) / ((\text{лімф} + \text{мон}) * (\text{еоз} + 1))$$

– індекс співвідношення нейтрофілів до лімфоцитів (ІСНЛ): $ІСНЛ = \frac{\text{нейтр}}{\text{лімф}}$;

– індекс резистентності (ІР): $ІР = \frac{\text{лімф}}{\text{сегм.нейтр}}$;

– індекс нейтрофільного зсуву (ІНЗ): $ІНЗ = \frac{(\text{мол} + \text{юн} + \text{палочкояд})}{\text{сегмент}}$;

– індекс співвідношення нейтрофілів до моноцитів (ІСНМ): $ІСНМ = \frac{\text{нейтр}}{\text{моноц}}$

– індекс співвідношення лімфоцитів до моноцитів (ІСЛМ): $ІСЛМ = \frac{\text{лімф}}{\text{моноц}}$

Усі маніпуляції з тваринами проводили відповідно до Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних і наукових цілей.

Вірогідність різниць оцінювали за t-критерієм Стьюдента. Результати вважали вірогідними при $P \leq 0,05$.

Результати та обговорення. Клітини лейкоцитарного ряду по різному реагують на вплив стрес-факторів, а їх перерозподіл може характеризувати стадію стресу, яку проходить організм тварини. На наступний день після моделювання ВІКС у тварин 2 групи на 21 добу експерименту (Табл. 1), було зареєстровано підвищення загальної кількості лейкоцитів на 75% ($p < 0,001$) у порівнянні з інтактними щурами. При цьому, підвищення загальної кількості лейкоцитів у цих щурів після дії ВІКС відбувалось, головним чином, за рахунок зростання відсотку еозинофілів та паличкоядерних нейтрофілів у 1,5 рази ($p < 0,001$) та у 2 рази ($p < 0,05$) відповідно. Одночасно, у тварин 2 групи відмічається зниження процентної кількості лімфоцитів на 12% ($p < 0,05$) у порівнянні з інтактними тваринами. Абсолютне значення кількості еозинофілів та паличкоядерних нейтрофілів теж зросло у 4,6 рази ($p < 0,001$) та у 3,4 рази ($p < 0,001$) відповідно. Хоча, відсоток сегментноядерних нейтрофілів достовірно не відрізнявся від значень у інтактних тварин, абсолютне їх значення було достовірно вищим на 98% ($p < 0,05$). Кількість лімфоцитів, навпаки, зменшувалась на 53% ($p < 0,05$) у порівнянні з цим значенням у тварин 1 групи. Отже, отримані зміни кількості лейкоцитів та процентного співвідношення клітин лейкоцитарного ряду у крові щурів підтверджують їх здатність реагувати на дію ВІКС. За дії ВІКС стимулюється вихід молодих форм клітин нейтрофілів та активується робота червоного кісткового мозку, що може призводити до виходу в кровоток більшої кількості різних за віком нейтрофілів для більш швидкого підвищення захисних властивостей крові тварин. За впливу стрес-факторів відбувається активація фагоцитарних клітин – моноцитів. Кількість моноцитів у

тварин всіх досліджуваних груп знаходиться в межах референтних значень, але у тварин 2 групи було зареєстровано недостовірне зростання на 45%.

В той же час, загальна кількість лейкоцитів у тварин 3 групи, які отримували природній антиоксидант кормову добавку "Гумілід" була меншою на 41% ($p<0,001$) у порівнянні зі значеннями у тварин 2 групи на наступний день після дії ВІКС, та достовірно не відрізнялась від значень у інтактних тварин. Процент еозинофілів та сегментноядерних нейтрофілів у крові щурів 3 групи зростав на 80 % ($p<0,05$) та на 67 % ($p<0,05$) та на у порівнянні з тваринами 1 групи. Абсолютні значення еозинофілів, паличкоядерних та сегментноядерних нейтрофілів у крові щурів 3 групи після використання ПАО КДГП "Гумілід" на тлі ВІКС були достовірно нижчими у 58% ($p<0,01$), на 52% ($p<0,001$) та на 37% ($p<0,01$) відповідно у порівнянні з тваринами 2 групи. В свою чергу, порівнюючи абсолютне значення лімфоцитів у крові щурів 3 групи з тваринами 2 групи, було зафіксовано зменшення на 43 % ($p<0,001$). Ефект лімфоцитопенії може бути викликаний міграцією або руйнацією цих клітин на тлі дії стрес-факторів. Саме лімфоцити є головними клітинними компонентами імунної системи організму, які відповідають за розпізнання чужорідних агентів та приймають участь у адекватній імунній відповіді організму тварин.

У щурів 4 групи, які отримували кормову добавку "Еко-Імпульс Апімал" загальна кількість лейкоцитів зменшилась на 60% ($p<0,001$) у порівнянні зі значеннями у тварин 2 групи, та на 30 % ($p<0,05$) відрізнялась від значень у тварин 1 групи. Кількість сегментноядерних нейтрофілів у тварин 4 дослідної групи, яким у до стресовий період додатково до раціону додавали кормову добавку "Еко-Імпульс Апімал" підвищилась на 22% ($p<0,05$) у порівнянні з тваринами 1 групи. Процент еозинофілів, сегментноядерних та паличкоядерних ней-

трофілів у крові щурів 4 групи зростав на 80 % ($p<0,05$), на 20 % ($p<0,05$) та на 67 % ($p<0,05$) у порівнянні з тваринами 1 групи. Абсолютні значення еозинофілів, паличкоядерних та сегментноядерних нейтрофілів у крові щурів 4 групи після використання КДГП "Еко-Імпульс Апімал" на тлі ВІКС були достовірно нижчими на 74% ($p<0,001$), на 67% ($p<0,001$) та на 57% ($p<0,001$) відповідно у порівнянні з тваринами 2 групи. В той же час, абсолютне значення лімфоцитів у крові щурів 4 групи було меншими на 40 % ($p<0,001$) у порівнянні з інтактними тваринами та на 61% у порівнянні з результатами у тварин 2 групи. За впливу стрес-факторів відбувається активація фагоцитарних клітин – моноцитів. Кількість моноцитів у тварин всіх досліджуваних груп знаходиться в межах референтних значень. Але у тварин 4 групи, спостерігалось зниження кількісного вмісту моноцитів на 53% ($p<0,05$) у порівнянні з тваринами 1 групи та на 67% ($p<0,01$) у порівнянні з тваринами 2 групи. Моноцитоз може вказувати на формування гострого запалення на тлі впливу комбінованого стресу. Активовані моноцити відіграють важливу роль в регуляції запальних процесів та формуванні синдрому критичного стану

У тварин 5 групи, які додатково до раціону отримували Вітамін Е кількість лейкоцитів достовірно зменшувалась на 43% ($p<0,001$) відповідно у порівнянні з тваринами 2 групи, але отримані значення знаходились в межах контрольних значень. В той же самий час, кількісні значення різних форм лейкоцитів достовірно зменшувались, а саме еозинофіли на 65% ($p<0,01$), паличкоядерні та сегментноядерні нейтрофіли на 64% ($p<0,001$) та на 45% ($p<0,001$) відповідно, лімфоцити на 37% ($p<0,001$), а моноцити на 53% ($p<0,05$) у порівнянні зі щурами 2 групи.

Таблиця 1. Лейкоцитарна формула крові щурів за умов використання кормових добавок гумінової природи та вітаміну Е на тлі комбінованого стресу ($M \pm m$, $n=6$)

Група, №		1	2	3	4	5
Лейкоцити, 10 ⁹ /л		5,84±0,535	10,24±0,376***	6,00±0,608###	4,1±0,554*###°	5,88±0,481###
Базофіли	%	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
	10 ⁹ /л	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
Еозинофіли	%	1,00±0,000	2,60±0,327***	1,80±0,306*	1,80±0,306*	1,60±0,327
	10 ⁹ /л	0,06±0,005	0,268±0,037***°	0,113±0,029##	0,071±0,012###	0,93±0,018##
Паличкоядерні нейтрофіли	%	1,80±0,306	3,60±0,327*°	3,00±0,365*	3,00±0,365*	2,20±0,476
	10 ⁹ /л	0,127±0,016	0,359±0,020***	0,174±0,017*####	0,121±0,017####	0,133±0,032####
Сегментоядерні	%	36,11±2,416	40,20±1,275	43,00±4,683	43,40±0,757*	38,80±2,120
	10 ⁹ /л	2,08±0,210	4,123±0,217*°°°	2,602±0,386##	1,773±0,186###	2,26±0,132###
Лимфоцити	%	58,32±2,422	51,30±1,136*	50,40±4,386	50,20±0,783*°°	55,80±1,669
	10 ⁹ /л	3,43±0,376	5,25±0,211*°°°	3,00±0,293###	2,066±0,241*####°	3,30±0,286###
Моноцити	%	2,40±0,200	2,00±0,258	1,80±0,306	1,60±0,327	1,60±0,327
	10 ⁹ /л	0,145±0,023	0,209±0,026	0,111±0,021#	0,68±0,021*##	0,097±0,025#

Примітка: * – різниця вірогідна, порівняно з контролем, $p<0,05$; ** – різниця вірогідна, порівняно з контролем, $p<0,01$; *** – різниця вірогідна, порівняно з контролем, $p<0,001$; # – різниця вірогідна, порівняно з 2 групою, $p<0,05$; ## – різниця вірогідна, порівняно з 2 групою, $p<0,01$; ### – різниця вірогідна, порівняно з 2 групою, $p<0,001$; ° – різниця вірогідна, порівняно з 5 групою, $p<0,05$; °° – різниця вірогідна, порівняно з 5 групою, $p<0,01$; °°° – різниця вірогідна, порівняно з 5 групою, $p<0,001$

Аналіз лейкоцитарної формули крові досліджуваних щурів виявив особливу чутливість у клітин гранулоцитарного ряду до впливу стрес-факторів. Для детальної ін-

терпретації отриманої лейкоцитарної формули розраховували лейкоцитарний індекс (ЛІ). За впливу стресу у тварин 2 групи спостерігалось зниження ЛІ на 24 %, хоч і не

достовірно, тоді як, значення ІСНЛ зростав на 30% ($p<0,05$) відносно інтактних щурів. На підставі такого зменшення ІСНЛ, можливий розвиток стадії тривоги, за якої відбувається активація організму у щурів за впливу ВІКС.

Лейкоцитарний індекс (ЛІ), котрий враховує співвідношення різних форм лейкоцитів та характеризує їх відповідь на подразник, при використанні у до стресовий період ПАО КДГП "Гумілід" у щурів 3 групи зростав на 37% ($p<0,05$) у порівнянні з тваринами 2 групи та достовірно не відрізнявся від значень у інтактних тварин. На наступний день після дії ВІКС, у щурів 3 групи співвідношення процентної кількості нейтрофілів до моноцитів достовірно було вищим на 80% ($p<0,05$) у порівнянні з цим значенням у тварин 1 групи.

На наступний день після дії ВІКС, у тварин 3 групи, які отримували додатково до раціону КДГП "Еко-Імпульс Animal" співвідношення процентного числа нейтрофілів до лімфоцитів достовірно було вищим на

40 % ($p<0,01$), при цьому індекс резистентності (ІР) у цих тварин, навпаки, був достовірно нижчим на 32% ($p<0,05$) відповідно у порівнянні з інтактними тваринами. Ступінь співвідношення компонентів фагоцитарної системи (ІСНМ) у тварин 3 групи був достовірно вищим у 2,2 рази ($p<0,05$) від значень у тварин контрольної групи, що вказує на можливу активацію макрофагальної системи за дії ВІКС.

У тварин які у до стресовий період отримували вітамін Е (група 5) ІСНМ зростав на 88% ($p<0,05$) у порівнянні з інтактними тваринами, тоді як інші співвідношення клітин лейкоцитарного ряду не відрізнялись достовірно. Можливо, такі особливості співвідношення окремих форм лейкоцитів слід пов'язувати із достатньою тривалістю дії помірних за своєю силою та різних за генезом стресорів на організм щурів та початком формування стадії резистентності.

Таблиця 2. Лейкоцитарні індекси крові щурів та використання кормових добавок гумінової природи та вітаміну Е за впливу стресу ($M \pm m$, $n=6$)

Лейкоцитарні індекси, у.о.	Група № Лейкоцитарні індекси, у.о.				
	1 (інтактні)	2 (ВІКС)	3 (Гумілід+ВІКС)	4 (Еко Імпульс+ ВІКС)	5 (Вітамін Е+ВІКС)
ЛІ	0,397±0,034	0,303±0,028	0,456±0,092 #	0,418±0,037	0,373±0,048
ІСНЛ	0,66±0,066	0,855±0,043 *	0,996±0,163	0,922±0,025 ***	0,743±0,059
ІР	1,70±0,179	1,29±0,067	1,367±0,308	1,165±0,032 *	1,49±0,149
ІНЗ	0,051±0,009	0,091±0,010 **	0,082±0,020	0,70±0,009	0,056±0,011
ІСНМ	16,53±1,718	25,43±5,009	29,90±5,354 *	35,67±5,735 *	31,13±5,169 *
ІСЛМ	27,43±1,571	40,03±7,046	34,40±5,277	22,82±1,866	23,18±1,867

Примітка.: * – різниця вірогідна, порівняно з контролем, $p<0,05$; ** – різниця вірогідна, порівняно з контролем, $p<0,01$; *** – різниця вірогідна, порівняно з контролем, $p<0,001$; # – різниця вірогідна, порівняно з 2 групою, $p<0,05$; ## – різниця вірогідна, порівняно з 2 групою, $p<0,01$; ### – різниця вірогідна, порівняно з 2 групою, $p<0,001$; ° – різниця вірогідна, порівняно з 5 групою, $p<0,05$; °° – різниця вірогідна, порівняно з 5 групою, $p<0,01$; °°° – різниця вірогідна, порівняно з 5 групою, $p<0,001$

Отже, за впливу ВІКС було зареєстровано достовірне зростання загальної кількості лейкоцитів у крові щурів та перерозподіл різних їх форм у лейкоцитарній формулі. Зміна лейкоцитарних індексів вказує на функціональні зміни в організмі та наявність нейтрофільного зсуву на тлі ВІКС у щурів. Також, на підставі розвитку лімфоцитопенії та зростання ІСНЛ у тварин, яких утримували за стандартних умов, після чого моделювали комбінований стрес, можна говорити про розвиток стадії тривоги організму за впливу стресу (за Сельє), це призводить до виходу в кров'яне русло більш молодих форм нейтрофілів, збільшенню як процентної частки еозинофілів, так і кількісної. За превентивного використання кормових добавок гумінової природи "Гумілід" та "Еко-Імпульс Animal" та вітаміну Е досліджувані показники наближаються до значень контрольної групи. Зміни співвідношення різних форм лейкоцитів за дії кормових добавок гумінової природи характеризують розвиток резистентності до дії стрес-факторів. Характер впливу на клітини лейкоцитарного ряду при використанні ПАО КДГП "Гумілід" мав схожий напрям змін, що і вітамін Е.

Висновки

1. Встановили, що за впливу водно-імобілізаційного комбінованого стресу достовірно зростає кількість лейкоцитів на 75%. Таке зростання викликає перерозподіл клітин лейкоцитарного ряду, а саме зростання відсотку еозинофілів та паличкоядерних нейтрофілів у 1,5 рази та у 2 рази відповідно. Аналіз за лейкоци-

тарними індексами у щурів після дії ВІКС виявив зростання ІСНЛ та ІНЗ.

2. Використання у достресовий період ПАО КДГП "Гумілід" викликає зменшення кількості лейкоцитів на 41% у порівнянні зі значеннями у тварин, які в цей період отримували очищену воду та не відрізнялась від значень у інтактних тварин. Процент еозинофілів та сегментноядерних нейтрофілів у цих щурів зростав на 80 % та на 67 % відносно інтактних тварин. Абсолютні значення еозинофілів, паличкоядерних та сегментноядерних нейтрофілів були достовірно нижчими у 58%, на 52% та на 37% відповідно у порівнянні з тваринами 2 групи.

3. У щурів, які отримували кормову добавку "Еко-Імпульс Animal" загальна кількість лейкоцитів зменшилась на 60% у порівнянні зі значеннями у тварин 2 групи, та на 30 % ($p<0,05$) відрізнялась від значень у інтактних тварин. Кількість сегментноядерних нейтрофілів у цих тварин підвищилась на 22%, процент еозинофілів, сегментноядерних та паличкоядерних нейтрофілів був вищим на 80 %, на 20 % та на 67 % відповідно відносно інтактних тварин. Також, було зареєстровано зменшення абсолютного значення лімфоцитів на 40 % у порівнянні з інтактними тваринами та на 61% у порівнянні з результатами у тварин 2 групи.

4. Додаткове включення до раціону у достресовий період вітаміну Е викликало зменшення кількості лейкоцитів на 43%, кількісні значення різних форм лейкоцитів достовірно зменшувались, а саме еозинофіли на 65%,

палічкоядерні та сегментноядерні нейтрофіли на 64% та на 45% відповідно, лімфоцити на 37%, а моноцити на 53% відповідно у порівнянні з тваринами які в цей період отримували воду.

Список використаних джерел:

1. Акімова В. М. Адаптаційні реакції та інтегральні гематологічні індекси неспецифічної резистентності при гострих та хронічних запальних процесах в черевній порожнині / В.М. Акімова, Л.Є. Лаповець // Вісн. проблем біології і медицини, 2015. – №1(3). – С. 79–82.
2. Бучко О. М. Імунологічні та гематологічні показники крові свиней за дії гумінової домішки та аскорбінової кислоти / О. М. Бучко // Young Scientist., 2005. – № 2(17). – С. 25–28.
3. Белаї І. М. Исследование гипопиридеических и антиоксидантных свойств пикамилон и карнитина хлорида / И.М. Белаї, В.В. Дунаев, В.С. Тишкин // Укр. ревматологический ж., 2001. – №1(3) – С. 21–25.
4. Адаптационные реакции и уровни реактивности как эффективные диагностические показатели дозозологических состояний / Л.Х. Гаркави, Г.Н. Толмачев, Н.Ю. Михайлов и др. // Вест. Южного научного центра, 2007. – Т. 3. – №1. – С. 61–66.
5. Грибан В. Г. Щодо ефективності використання гумінових препаратів у скотарстві та механізмі їх дії на організм / В.Г. Грибан, В.Г. Єфімов, В.М. Ракитянський та ін. // Наук. вісн. ЛНУВМБТ імені С.З. Гжицького, 2015. – Т. 17, № 3 (63).
6. Дяченко Л.М. Зміни морфофункціональних показників крові шурів на тлі застосування кормових домішок гумінової природи та за дії стрес-факторів / Л.М. Дяченко, Л.М. Степченко // Проблеми регуляції фізіологічних функцій, 2018. №1(25). – С. 50–54.
7. Дяченко Л. М. Стан еритроцитарної системи у крові шурів на тлі застосування кормових домішок гумінової природи та впливу комбінованого стресу / Л.М. Дяченко, Л.М. Степченко // Theoretical and Applied Veterinary Medicine, 2018. – Т. 6. – № 3. – Р. 34–38. doi: 10.32819/2018.63007.
8. Єфімов В. Г. Вплив гумінових речовин на мінеральний обмін у корів / В.Г. Єфімов, В.М. Ракитянський // Наук.-техн. бюл. НДЦ біобезпеки та екол. контролю ресурсів АПК, 2012. – Т. 1, № 1. – С. 66.
9. Єфімов В.Г. Вплив подавання обробленого торфу як домішки на показники клітинного імунітету, антиоксидантного статусу та продуктивності поросят у ранньому після відлучення періоді / В.Г. Єфімов, К.М. Костішкєвич, В.М. Ракитянський // Humanand Veterinary Medicine, 2016. – № 8(3). – С. 133–136.
10. Михайленко Є.О. Протеїновий та амінокислотний обмін у м'язях курчат-бройлерів кросу КОББ 500 на тлі застосування кормової домішки "Гумілід" / Є.О. Михайленко, О.О. Дьомшина, Л.М. Степченко // Наук. вісн. Львів. нац. ун-ту ветеринарної медицини та біотехнології імені С.З. Гжицького, 2017. – Т. 19. – №77–С. 110.
11. Stepchenko L.M. Condition of erythrocyte antioxidant laying hens for the actions of humic substances // L.M. Stepchenko, M.V. Skorik / Technical bulletin Scientific Institute of Animal Biology and State research control institute of veterinary preparations and feed additives, 2006. –Vol. 7, № 3, 4. –P. 137–43.
12. Stepchenko L.M. Biologically active substances humic nature as regulators of homeostasis of poultry // L.M. Stepchenko // Collection of conference materials. "Radostim 2011". –Minsk, 2011. –С. 164–66.
13. Weiner H. Use of animal models in peptic ulcer disease / H. Weiner // Psychosom Med., 1996. –Vol. 58, № 6. –P. 524–45.

Л. Дяченко асп., Л. Степченко канд. биол. наук

Днепропетровский государственный аграрно-экономический университет, Днепр, Украина

References (Scopus):

1. Akimova VM., Lapovets LE. Adaptive reactions and integral hematological indices of nonspecific resistance in acute and chronic inflammatory processes in the abdominal cavity. Bulletin of Biology and Medicine Issues – 2015. – 3 (1). – P. 79-82.
2. Buchko OM. Immunological and hematological parameters of blood of pigs for action of humic additive and ascorbic acid. Young Scientist.2005; 2 (17):25-28.
3. Belay IM, Tishkin VS. Investigation of hypolipidemic and antioxidant properties of picamilon and carnitine chloride. Ukrainian Rheumatological Journal. 2001;1 (3):21-25.
4. Garkavy L.H., Tolmachev GN, Mikhailov N.Yu., et al. . Adaptation reactions and levels of reactivity as effective diagnostic indices of prenosological states. Bulletin of the Southern Scientific Center. – 2007. – 3(1). – С. 61-66.
5. Griban VG, Efimov VG, Rakyatinsky VM et al. On the Effectiveness of the Use of Humene Preparations in Animal Husbandry and the mechanism of their effect on the organism. Scientific Bulletin of LNUVMBT named after SZ Gzhitsky. 2015; 17(3):63
6. Diachenko LM., Stepchenko LM.Changes of morpho-functional indicators in blood of rats after the influence of feed additives of humic natural and for actions of stress factors. Problems of physiologic functions regulation. – 2018. – 1(25) – С. 50-54.
7. DiachenkoLM., StepchenkoLM. Erythrocyte system of rat blood during the application of fodder additives of humic nature for combined stress. Theoretical and Applied Veterinary Medicine. – 2018. – Т.6. – №3. – С. 34-38. doi: 10.32819/2018.63007
8. Efimov VG, Rakyatinsky VM. Influence of humic substances on mineral exchange in cows. Scientific and technical bulletin of NDC of biosafety and ecology. control of the resources of the agroindustrial complex. 2012; 1 (1):66
9. Efimov VG, Kostyshkevich KM, Rakyatinsky VM. Influence of supply of treated peat as additive on cellular immunity, antioxidant status and piglet productivity in early postpartum period. Human and Veterinary Medicine. 2016; 8 (3):133-136.
10. Mikhailenko EO, Domshina OO, Stepchenko LM. Protein and amino acid exchange in the muscles of broiler chickens COBB 500 cross with the use of the feed supplement "Gumilid". Scientific Bulletin of the Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnology named after SZ Gzhitsky. 2017; 19(77):110. doi.org/10.15421/nlvvet7725
11. Stepchenko LM, Skorik. MV. Condition of erythrocyte antioxidant laying hens for the actions of humic substances. Technical bulletin Scientific Institute of Animal Biology and the State Research Control Institute of Veterinary Preparations and Feed Additives. 2006; 7(3.4.):137-143.
12. Stepchenko L.M. [Biologically active substances humic nature as regulators of homeostasis of poultry] // L.M. Stepchenko/ Collection of conference materials. "Radostim 2011". Minsk, – 2011. – С. 164-166.
13. Weiner H. [Use of animal models in peptic ulcer disease] / H. Weiner // PsychosomMed. – 1996. – Vol. 58, № 6. – P. 524 – 545.

Надійшла до редколегії 28.01.2019

Отримано виправлений варіант 01.03.2019

Підписано до друку 01.03.2019

Received in the editorial 28.01.2019

Received a revised version on 01.03.2019

Signed in the press on 01.03.2019

ОЦЕНКА ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КОРМОВЫХ ДОБАВОК ГУМИНОВОЙ ПРИРОДЫ ЗА ЛЕЙКОЦИТАРНЫМИ ИНДЕКСАМИ У КРЫС ПОСЛЕ КОМБИНИРОВАННОГО СТРЕССА

В ответ на действие стресс-факторов различного происхождения в живом организме запускается каскад адаптационных реакций, которые могут нивелировать функциональные нарушения гомеостаза. Комбинирование воздействия различных стресс-факторов может вызвать избыточное образование и накопление активных форм кислорода, что влечет за собой целый ряд патологических состояний, которые создают предпосылки для развития большого количества заболеваний. Одним из показателей развития адаптации и интегральным показателем состояния организма считается система крови, особенно, лейкоцитарная формула, перераспределение которой позволяет проанализировать характер влияния и оценить интенсивность адаптивных процессов в организме за счет функций, которые выполняют различные формы лейкоцитов. Лейкоцитарные индексы в которых использовали параметры лейкоцитарной формулы, позволяют оценить степень эндогенной интоксикации, развития резистентности и характер клеточного иммунитета при воздействии стресс-факторов на организм животных и человека. В статье рассмотрена возможность оценки превентивного использования натуральных антиоксидантов гуминовой природы за лейкоцитарными индексами на организм крыс на фоне водно-иммобилизационного комбинированного стресса (ВИКС). Для этого животных разделили на пять групп по 6 животных: 1- группа интактные животные (контроль); 2-5 – исследовательские группы. Животные всех исследовательских групп дополнительно получали перорально, индивидуально с помощью зонда в течение 18 суток воду, кормовые добавки "Гумилид" (в расчете 5 мг / кг массы тела по действующему веществу), "Эко-Импульс Animal" (из расчета 2,5 мг / кг массы тела) и витамин Е (в расчете 50 мг / кг массы тела). После чего, у животных 2, 3, 4 и 5 групп моделировали стресс. Установлено, что за действия водно-иммобилизационного комбинированного стресса к крови крыс происходит рост клеток лейкоцитарного ряда, главным образом за счет увеличения эозинофилов и палочкоядерных нейтрофилов. Использование в дострессовый период естественного антиоксиданта, кормовой добавки "Гумилид" вызывает уменьшение количества лейкоцитов на 41% по сравнению со значениями у животных, в этот период получали очищенную воды и не отличалась от значения у интактных животных. Изменение лейкоцитарных индексов указывает на функциональные изменения в организме и наличие нейтрофильного сдвига на фоне ВИКС у крыс. Также, действие ВИКС приводит к выходу в кровяное русло более молодых форм нейтрофилов, увеличению как процентной доли эозинофилов, так и количественной. По превентивного использования кормовых добавок гуминовой природы "Гумилид" и "Эко-Импульс Animal" и витамина Е исследуемые показатели приближаются к значениям контрольной группы.

Ключевые слова: лейкоциты, "Гумилид", "Эко-импульс animal", стресс.

L. Diachenko Ph.D stud., L. Stepchenko Ph.D.
Dnipro State Agrarian and Economic University, Dnipro, Ukraine

EVALUATION OF THE USE OF FEED ADDITIVES OF HUMIC NATURE BY INDICES OF LEUKOCYTES IN RATS AFTER COMBINED STRESS

In response to the action of stress factors of different genesis in a living organism, a cascade of adaptive responses, which can neutralize functional disorders of homeostasis, is triggered. Combining the effects of various stress factors can cause excessive formation and accumulation of active forms of oxygen, which entails a number of pathological conditions that create the preconditions for the development of a large number of diseases. One of the indicators of the development of adaptation and the integral indicator of the body's state is the blood system, especially the leukocytic formula, whose redistribution makes it possible to analyze the nature of the effect and estimate the intensity of adaptive processes in the body due to functions that perform different forms of leukocytes. Leukocyte indices in which the parameters of the leukocyte formula were used, allow assessment of the degree of endogenous intoxication, the development of resistance and the character of cellular immunity for the influence of stress factors on the organism of animals and humans. The article considers the possibility of evaluating the preventive effect of natural antioxidants of humic nature on indices of leukocytes on the organism of rats after the influence of combined water-immobilization stress (WICS). For this, the animals were divided into five groups of 6 animals: 1- group of intact animals (control); 2-5 – experimental groups. Animals of all experimental groups were additionally received orally, individually with the help of a probe for 18 days, water, feed additives "Humilid" (at 5 mg / kg of body weight per active ingredient), "Eco-Impulse Animal" (at a rate of 2.5 mg / kg body weight) and vitamin E (at a rate of 50 mg / kg body weight). In animals, 2, 3, 4 and 5 groups simulated stress. It has been established that the effects of water-immobilization combined stress on blood of rats lead to the growth of cells of the leukocyte series, mainly due to the increase of eosinophils and rod-neutrophils. The use of natural antioxidant, a feed additive "Humilid" in the pre-season period causes a decrease in the number of leukocytes by 41% compared to values in animals that received purified water during this period and did not differ from those in intact animals. The change in leukocyte indexes indicates functional changes in the body and the presence of a neutrophilic shear on the background of WICS in rats. Also, the effect of WICS leads to the release of the younger forms of neutrophils in the bloodstream, an increase in both the percentage of eosinophils and the quantitative. For preventive use of feed additives of humic nature, "Humilid" and "Eco-Impulse Animal" and vitamin E, the studied parameters are close to the values of the control group.

Key words: leukocytes, "Humilid", "Eco-Impulse Animal", stress.

УДК 577.122.8

Д. Креницька, студ., А. Юрченко, асп., О. Савчук, д-р біол.наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна,
Н. Ліпець, студ.
ТОВ "Фармацевтичний завод "Біофарма", Київ, Україна

ЗМІНИ БІЛКОВОГО СКЛАДУ ТКАНИН ПРИ РОЗВИТКУ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОЖИРІННЯ У ЩУРІВ

Проблема ожиріння в сучасному світі займає провідне місце поруч з іншими патологіями. Усупереч сталим уявленням про те, що причиною ожиріння є гіподинамія та надмірне надходження їжі, провідні медичні видання стверджують, що досліджувана патологія має поліморфне походження і пов'язана каскадом різних порушень в органах та їхніх системах. Останнім часом накопився масив даних, на основі яких постулюється участь тканинно-специфічних пептидних пулів у підтриманні гомеостазу, зокрема, встановлена їхня здатність регулювати процеси проліферації, диференціювання та загибелі клітин. Охарактеризовано фракції низько-, середньо- і високомолекулярних білків гомогенатів печінки, нирок, м'язів та жирової тканини при розвитку експериментального ожиріння у щурів. Білкові фракції були розділені за допомогою електрофорезу за методом Laemmli в 10 % ПААГ з використанням додецилсульфату натрію (ДДС-Na). Розподіл між білками у контрольній групі щурів з ожирінням показав різницю в кількості фракцій. Досліджено кількісний і якісний склад білкових фракцій у гомогенатах тканин щурів. В умовах експериментального ожиріння білковий склад тканин зазнав змін, а саме, збільшувався вміст середньомолекулярної фракції (67–35 кДа) і низькомолекулярної фракції (35–10 кДа). Експериментальні дані можуть свідчити про порушення білок-білкових взаємодій у цих органах і передбачити появу в кровотоці неспецифічних білків та їхніх фрагментів як результат посилення дії протеолітичних ферментів і руйнування клітин органів. Подальші дослідження особливостей змін білкового складу і пептидного пулу тканин щурів сприятимуть кращому розумінню біохімічних процесів за даної патології, що важливо при розробці нових підходів для діагностики та лікування ожиріння.

Ключові слова: ожиріння, білковий склад, висококалорійна дієта, диск-електрофорез, метаболічний синдром.

Вступ. Проблема ожиріння в сучасному світі займає провідне місце поруч з іншими патологіями. Усупереч сталим уявленням про те, що причиною ожиріння є гіподинамія та надмірне надходження їжі, провідні медичні видання стверджують, що досліджувана патологія має поліморфне походження та пов'язана каскадом різних порушень в органах та їхніх системах. Останнім часом накопився масив даних, на основі яких постулюється участь тканинно-специфічних пептидних пулів в підтриманні гомеостазу, зокрема, встановлена їх здатність регулювати процеси проліферації, диференціювання та загибелі клітин. Знання, отримані в результаті патофізіологічних аналізів захворювань людини, недостатні для того, щоб пояснити складні механізми їх патогенезу. Полігенні та багатофакторні розлади, такі як рак, захворювання серцево-судинної системи, ожиріння і діабет II типу, є прикладом захворювань, де моделі гризунів широко використовуються для дослідження фундаментальних механізмів шляхом відтворення деяких змін, які відбуваються в організмі людини [9]. Ожиріння змінює метаболічну і ендокринну функції жирової

тканини і призводить до підвищеного вивільнення жирних кислот, гормонів і прозапальних молекул, які сприяють ускладненню, пов'язаним з ожирінням [14]. Ці розлади включають гіпертензію, дисліпідемію і резистентність до глюкози. Це фактор ризику для серцево-судинних захворювань, інсульту, цукрового діабету 2 типу та деяких видів раку [12]. Збільшення рівня чутливих до запалення білків плазми (ISP) фібриногену, альфа-1-кислий глікопротеїн (AGP), альфа1-антитрипсину, гаптоглобін і церулоплазміну пов'язані зі збільшенням ваги [7]. У різних дослідженнях сироватковий альбумін і концентрація загального білка під час ожиріння не відрізнялися від контрольних [1]. Навіть під час дослідження зразків пацієнтів з ожирінням показали помітно знижену концентрацію альбуміну в сироватці порівняно з контрольною групою пацієнтів [2]. Крім того, концентрації сироваткового альфа 1-кислого глікопротеїну, зв'язуючого білка гормону росту (GHBP), феритину і ретинол-зв'язуючого білка 4 (RBP4), збільшуються зі збільшенням ваги.

У мишей, що знаходились на висококалорійній дієті (ВКД) спостерігається порушення толерантності до глюкози та резистентність до інсуліну, що призводить до гіперглікемії, гіперінсулінемії та порушення секреції глюкагону [4]. Глюкагон, що продукується панкреатичними α -клітинами, демонструє порушення секреції як при цукровому діабеті 1-го типу, так і при діабеті 2-го типу і сприяє гіперглікемії [5, 6, 8, 11, 13].

Частота нових випадків ожиріння продовжує зростати в усьому світі, що робить дослідження механізмів розвитку та пошук нових методів лікування даного захворювання вкрай актуальним. Таким чином, висока поширеність, рання смертність, прогресування і невисока ефективність сучасних методів корекції надмірної ваги і лікування ожиріння змушують шукати все нові терапевтичні підходи. При цьому більшість способів нормалізації ваги усувають наслідок, а не причину. Тому без сумніву, є актуальним дослідження різних експериментальних моделей ожиріння, які б на патогенетичному рівні відповідали розвитку цього захворювання у людини і могли б бути основою для пошуку нових перспективних засобів, шляхів корекції різноманітних ускладнень, які виникають за умов ожиріння.

Тому дослідження даної проблеми та її складових дають змогу отримати повну картину про розвиток та протікання цієї патології, її терапевтичне лікування та попередження.

Метою роботи було дослідити зміни вмісту білкового складу гомогенатів тканин щурів за умов розвитку експериментального ожиріння під впливом висококалорійної дієти.

Матеріали і методи. Досліди проводилися на білих нелінійних щурах-самцях з початковою масою 115–150 г. Впродовж 1 тижня експерименту всі тварини одержували стандартну їжу "Purina rodent chow" та воду *ad libitum*. На 8-й день експерименту тварини були рандомізовано поділені на 2 групи. Щури 1-ї групи ("Контроль") продовжували отримувати стандартний корм упродовж наступних 10 тижнів. Тварини 2-ї групи ("ВКД") перебували на висококалорійній дієті, яка складалась із стандартної їжі (60 %), свинячого жиру (10 %), курячих яєць (10 %), сахарози (9 %), арахісу (5 %), сухого молока (5 %) та рослинної олії (1 %) та отримували воду [16].

Кількість білку визначали за методом Bradford [3]. Цей метод ґрунтується на здатності барвника Кумасі діамантово-синього G-250 змінювати забарвлення при зв'язуванні з білком, при цьому максимум поглинання зміщується відповідно з 465 до 595 нм. За таких умов концентрація барвника, що зв'язалась з білком, прямопропорційна кількості білку в пробі.

Розділення білкових фракцій тканин щурів проводили методом диск-електрофорезу у 10 % поліакриламідному гелі (ПААГ) за наявності 0,1 % додецилсульфату натрію (ДДС-Na). Електрофорез проводили за методом Лемлі [10], в якому замість фосфатного буфера використовували трис-гліцинову систему [15]. Електрофорез проводили у апараті для вертикального препаративного диск-електрофорезу ("BioRad") у скляних пластинах завтовшки 1 мм за сили струму 19 мА для концентруючого та 35 мА для розділяючого гелів. Як маркери використовували "LMW Calibration Kit" ("Amersham Biosciences", США), до якого входять такі білки: 97 кДа – фосфорилаза Б, 66 кДа – альбумін, 45 кДа – овальбумін, 31 кДа – карбоангідраза, 21 кДа – соєвий інгібітор трипсину, 14 кДа – α -лактальбумін. Статистично достовірні розрахунки молекулярних мас та кількості білкових смуг на електрофореграмах проводили використовуючи програму "TotalLab TL120".

Статистичну обробку результатів дослідження проводили загальноприйнятими методами варіаційної статистики. Для статистичної обробки параметричних даних був використаний *t*-критерій Стюдента для незалежних вибірок [17].

Експериментальні роботи з щурами проводили в умовах віварію Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Проведення експерименту здійснювалось із дотриманням принципів біоетики, що викладені у Хельсинській декларації Всесвітньої медичної асоціації про гуманне ставлення до тварин, а також згідно із Законом України "Про захист тварин від жорстокого поводження" від 15.12.2009 р. № 1759-VI та "Загальних етичних принципів експериментів на тваринах" (Київ, 2001).

Результати досліджень та їх обговорення. Білки посідають центральне місце у процесах життєдіяльності організму, входячи до складу всіх клітинних та міжклітинних структур, виконують каталітичну, структурну, регуляторну, рецепторну, транспортну, механічну, захисну та інші функції. Склад білків тканин організму змінюється залежно від функціонального стану і зумовлює їх роль в оцінці здоров'я, як у нормі, так і за умов різних патологій.

Розподіл між білками у контрольній і групі щурів з ожирінням показав різницю у кількості фракцій (табл. 1). У контрольній групі щурів білки гомогенату печінки розділилися на 17 фракцій (рис.1). У групі щурів, які мали ожиріння, білки гомогенату печінки розділилися на 13 фракцій (рис.2). Білкові фракції гомогенату нирок інтактних тварин розподілилися на 10 фракцій (рис.3), у той час, як білкові фракції гомогенату нирок експериментальних тварин розподілилися на 18 фракцій (рис.4). Кількість білкових фракцій гомогенатів м'язової та жирової тканин інтактних тварин та тварин експериментальним ожирінням також відрізнялися.

Аналіз літературних даних дозволив нам поділити фракції, відповідно до молекулярної маси (м.м.), на високомолекулярні (100-150 кДа), середньомолекулярні (67-100 і 35-67 кДа) та низькомолекулярні (10-35 кДа) для всіх досліджувальних груп.

Встановлено, що за умов розвитку експериментального ожиріння розподіл білків гомогенатів тканин змінювався. Так в гомогенаті печінки експериментальних тварин спостерігалась відсутність високомолекулярної білкової фракції (100-150 кДа), в той час, як середньомолекулярна (100-67 кДа) білкова фракція знизилась на 27 % ($p < 0,05$), у свою чергу низькомолекулярна фракція (35-10 кДа) знизилась на 10 % ($p < 0,05$) порівняно з групою інтактних тварин.

У гомогенаті нирок експериментальних тварин спостерігалась поява високомолекулярної білкової фракції (150-100 кДа) та середньомолекулярної фракції (100-67 кДа) та збільшення фракції середньомолекулярної білкової фракції 67-35 (кДа) на 36 % ($p < 0,05$) та збільшення низькомолекулярної фракції (35-10 кДа) на 20 %. В гомогенаті м'язової тканини експериментальних тварин з'являється середньомолекулярна білкова фракція (100–67 кДа), білкова фракція (67-35 кДа) збільшилась на 40 % ($p < 0,05$) відносно групи інтактних тварин. В гомогенаті жирової тканини експериментальних тварин спостерігалось поява високомолекулярної білкової фракції (150-100 кДа) та збільшення низькомолекулярної білкової фракції (35-10 кДа) на 10 % ($p < 0,05$). Кореляції між вмістом низькомолекулярної фракцій (35-10 кДа) є гомогенатах жирової та м'язової тканин у контрольній та експериментальній групі не спостерігалось.

Таблиця 1. Вміст білків у гомогенатах тканин щурів у нормі та при розвитку експериментального ожиріння

	Гомогенат печінки		Гомогенат нирок		Гомогенат м'язової тканини		Гомогенат жирової тканини	
	Інтактні тварини	Тварини з ожирінням	Інтактні тварини	Тварини з ожирінням	Інтактні тварини	Тварини з ожирінням	Інтактні тварини	Тварини з ожирінням
≥ 150 кДа								155 кДа
150-100 кДа	121 кДа 119 кДа			118 кДа 107 кДа				140 кДа
100-67 кДа	97 кДа 90 кДа 78 кДа 71 кДа	94 кДа 79 кДа 74 кДа		89 кДа 79 кДа 69 кДа		76 кДа 71 кДа	90 кДа	90 кДа
67-35 кДа	65 кДа 57 кДа 44 кДа 40 кДа 37 кДа	62 кДа 57 кДа 50 кДа 42 кДа 37 кДа	55 кДа 50 кДа 44 кДа 35 кДа	57 кДа 54 кДа 51 кДа 45 кДа 42 кДа 35 кДа	42 кДа 40 кДа	52 кДа 49 кДа 40 кДа	59 кДа 48 кДа 38 кДа	59 кДа 48 кДа 38 кДа
35-10 кДа	33 кДа 30 кДа 28 кДа 24 кДа 18 кДа 13 кДа	33 кДа 30 кДа 29 кДа 28 кДа 13 кДа	31 кДа 29 кДа 27 кДа 19 кДа 17 кДа 14 кДа	33 кДа 31 кДа 29 кДа 26 кДа 21 кДа 18 кДа 13 кДа	30 кДа 25 кДа 17 кДа	30 кДа 18 кДа 16 кДа	31 кДа 29 кДа 16 кДа	32 кДа 23 кДа 16 кДа 13 кДа
≤ 10 кДа					7 кДа			

Аналіз літературних даних показав, що білкові фракції 115 кДа (CRP), 26 кДа (TNF-α) і 20 кДа (RBP4) позитивно корелюють з ожирінням і збільшенням ваги, тоді як білкові фракції 66 кДа (альбумін), 49 кДа і 43 кДа (α-1 кислота-глокопротеїну) мають негативний вплив на ожиріння.

Печінка, як основний орган детоксикації, та нирки, одними з перших зазнають змін біохімічних процесів, а враховуючи, що саме тут активно протікають процеси синтезу та розпаду білків, які мають важливе значення для забезпечення потреб організму, метою нашої роботи було дослідження білкових фракцій за умов розвитку ожиріння.

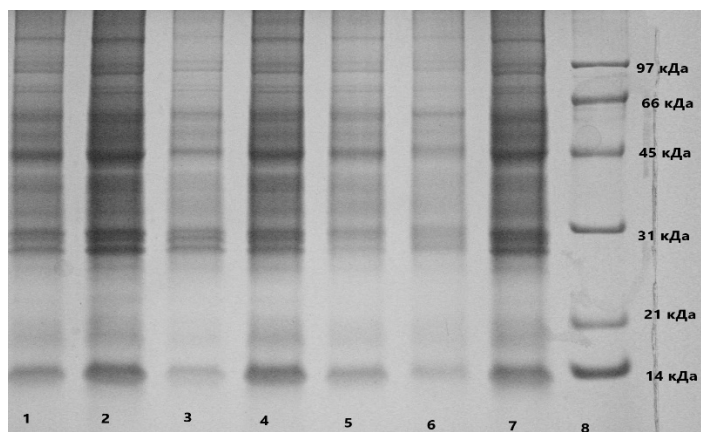


Рис 1. Типова електрофореграма розділення білків гомогенату печінки інтактних щурів:

8 – маркери молекулярної маси (97, 66, 45, 31, 21, 14 кДа);

1-7 – зразки гомогенату печінки інтактних тварин

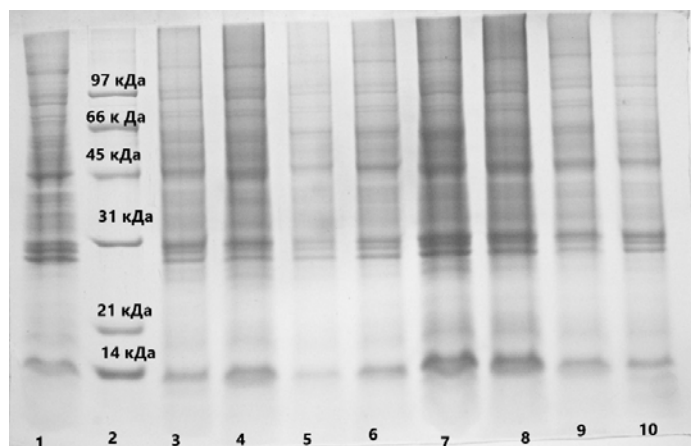


Рис 2. Типова електрофореграма розділення білків гомогенату печінки щурів з ожирінням:

2 – маркери молекулярної маси (97, 66, 45, 31, 21, 14 кДа);

1, 3-10 – зразки гомогенату печінки тварин з ожирінням

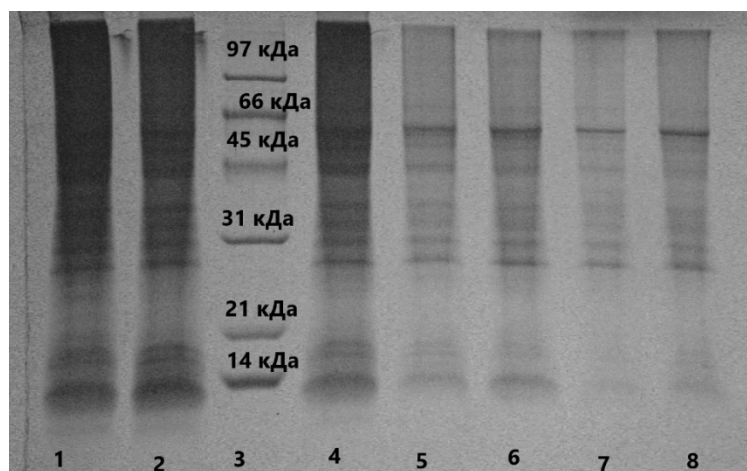


Рис 3. Типова електрофореграма розділення білків гомогенату нирок інтактних щурів:

3 – маркери молекулярної маси (97, 66, 45, 31, 21, 14 кДа);

1-2, 4-8 – зразки гомогенату нирок інтактних тварин

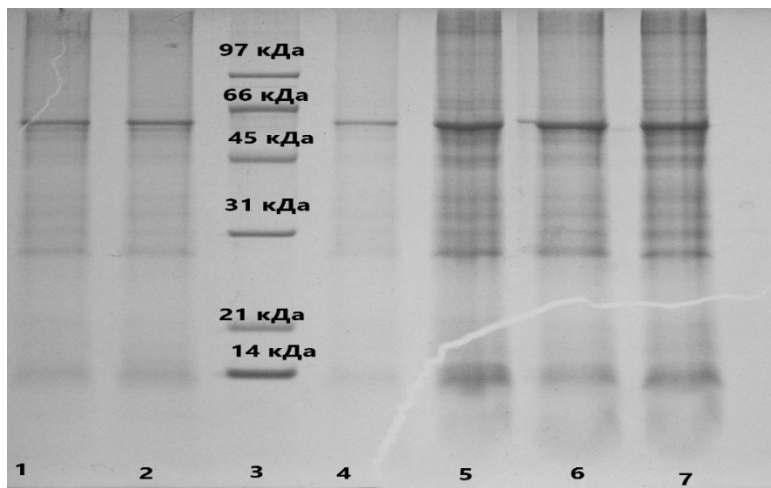


Рис. 4. Типова електрофореграма розділення білків гомогенату нирок щурів з ожирінням:

3 – маркери молекулярної маси (97, 66, 45, 31, 21, 14 кДа);

1-2, 4-7 – зразки гомогенату нирок тварин з ожирінням

Проведений кількісний аналіз виявив значне зростання вмісту всіх білкових фракцій відповідної молекулярної маси у гомогенаті нирок тварин, що перебували на висококалорійній дієті порівняно з групою інтактних тварин. Одержані нами дані в цілому узгоджуються з даними, представленими в літературі, відповідно до яких потенційним патогенетичним механізмом, що обумовлений метаболічним синдромом, є накопичення в цитоплазмі гепатоцитів білків. По-перше, це практично усі глікопротеїни, що синтезуються в печінці та потім транспортуються до кровотоку. Накопичення пов'язане з порушеннями функціонування апарату Гольджі та процесами посттрансляційного фолдингу білків, в результаті чого утворюється певна кількість білків з аномальними властивостями. Вплив метаболічного синдрому може реалізовуватися на різних етапах білкового обміну, зокрема, на рівні їх синтезу, секреції та протеолітичного розщеплення. В печінці синтезується значна кількість білків плазми крові, зокрема, альбумін, трансферрин, коагуляційні фактори, які є необхідними для підтримання належного гомеостазу, тому порушення їх секреції призводить до зміни буферності та об'єму крові, доставки іонів до периферійних тканин та обумовлює дефекти системи згортання крові. У нирках синтезується активатор плазміногену – урокіназа. В мозковій

речовині нирки утворюються простагландини. Вони беруть участь, зокрема, в регуляції ниркового і загального кровотоку, збільшують виділення натрію з сечею, зменшують чутливість клітин каналців до АДГ.

Висновки. Було досліджено кількісний та якісний склад білкових фракцій у гомогенатах тканин щурів. Виявлено, що за умов розвитку експериментального ожиріння білкові фракції гомогенатів тканин щурів змінюються, а саме збільшувався вміст середньомолекулярної фракції (67-35 кДа) та низькомолекулярної фракції (35-10 кДа). У жировій тканині було виявлено зростання високомолекулярної фракції (150-100 кДа). Експериментальні дані можуть свідчити про порушення білок-білкових взаємодій у цих органах та передбачити появу в кровотоці неспецифічних білків та їх фрагментів, як результат посилення дії протеолітичних ферментів та руйнування клітин органів. Подальші дослідження особливостей змін білкового складу та пептидного пулу тканин щурів сприятимуть кращому розумінню біохімічних процесів за умов даної патології, що є важливим для розроблення підходів діагностики та лікування ожиріння.

Список використаних джерел:

1. Alterations in drug distribution and clearance due to obesity / D.R. Abernethy, D.J. Greenblatt, M. Divoll et al. // J. Pharmacol. exp. Ther. 217. – P. 681–685.

2. Andersen T. The liver in consecutive patients with morbid obesity: a clinical, morphological, and biochemical study / T. Andersen, P. Christoffersen, C. Gluud // *Int. J. Obesity*, 8. – P. 107-115.
3. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M.M. Bradford // *Analytical Biochemistry*, 1976. – Vol. 72, № 1-2. – P. 248-254.
4. Glucagon receptor knockout mice are resistant to diet-induced obesity and streptozotocin-mediated beta cell loss and hyperglycaemia / Conarello S.L., Jiang G., Mu J. et al. // *Diabetologia*. 2007. – 50(1). – P. 142-150.
5. Failure of glucagon suppression contributes to postprandial hyperglycaemia in IDDM / S. Dinneen, A. Alzaid, D. Turk, R. Rizza // *Diabetologia*, 1995. – 38(3). – P. 337-343.
6. Dunning B.E. The role of alpha-cell dysregulation in fasting and postprandial hyperglycemia in type 2 diabetes and therapeutic implications / B.E. Dunning, J.E. Gerich // *Endocr Rev.*, 2007. – 28(3). – P. 253-283.
7. Inflammation-sensitive plasma proteins are associated with future weight gain / G. Engström, B. Hedblad, L. Stavenow et al. // *Diabetes*, 52. – P. 2097-2101.
8. Gromada J. Alpha-cells of the endocrine pancreas: 35 years of research but the enigma remains. / J. Gromada, I. Franklin, C.B. Wollheim // *Endocr. Rev.*, 2007. – 28(1). – P. 84-116.
9. Jean-Charles Sanchez. The mouse SWISS2D PAGE database: a tool for proteomics study of diabetes and obesity / Sanchez Jean-Charles // *Proteomics*, 2001. – Vol. 1, Iss. 1. – P. 136-163.
10. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage / U.K. Laemmli // *Nature*, 1970. – P. 680-685.
11. Larsson H. Islet dysfunction in insulin resistance involves impaired insulin secretion and increased glucagon secretion in postmenopausal women with impaired glucose tolerance / H. Larsson, B. Ahren // *Diabetes care*, 2000. – 23(5). – P. 650-657.
12. Obesity-associated hypertension. New insights into mechanisms / K. Rahmouni, M. Correia, W.G. Haynes, A.L. Mark // *Hypertension*, 2005. – 45. – P. 9.
13. Lack of suppression of glucagon contributes to postprandial hyperglycemia in subjects with type 2 diabetes mellitus / P. Shah, A. Vella, A. Basu et al. // *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2000. – 85(11). – P. 4053-4059.
14. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue / P. Stuart, D. Weisberg, M. Desai et al. // *J. clin. Invest.*, 2003. – 112. – P. 1796-1808.
15. Weber K. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis / K. Weber., M. Osborn // *J. Biol. Chem.*, 1969. – Vol. 244, № 16. – P. 4406-4412.
16. Vitamin E regulates adipocytokine expression in a rat model of dietary-induced obesity. / Xiu-Hua Shen, Qing-Ya Tang, Juan Huang, Wei Cai // *Experimental Biology and Medicine*, 2010. – № 235. – P. 47-51.
17. Плохинский Н.А. Методические консультации по биометрии / Н.А. Плохинский // *Проблемы современной биометрии*. – М.: МГУ, 1981. – С. 30-50.
3. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M.M. Bradford // *Analytical Biochemistry*. – 1976. – Vol. 72, № 1-2. – P. 248-254.
4. Conarello S.L., Jiang G., Mu J., Li Z., Woods J., Zycband E., et al. Glucagon receptor knockout mice are resistant to diet-induced obesity and streptozotocin-mediated beta cell loss and hyperglycaemia. *Diabetologia*. 2007; 50(1):142-50.
5. Dinneen S., Alzaid A., Turk D., Rizza R. Failure of glucagon suppression contributes to postprandial hyperglycaemia in IDDM. *Diabetologia*. 1995; 38(3):337-43.
6. Dunning B.E., Gerich J.E. The role of alpha-cell dysregulation in fasting and postprandial hyperglycemia in type 2 diabetes and therapeutic implications. *Endocr Rev.* 2007; 28(3):253-83.
7. Engström G., Hedblad B., Stavenow L., Lind P., Janzon L., Lindgärde F., 2003. Inflammation-sensitive plasma proteins are associated with future weight gain. *Diabetes*, 52: 2097-2101.
8. Gromada J., Franklin I., Wollheim C.B.: Alpha-cells of the endocrine pancreas: 35 years of research but the enigma remains. *Endocr Rev.* 2007; 28(1):84-116.
9. Jean-Charles Sanchez The mouse SWISS2D PAGE database: a tool for proteomics study of diabetes and obesity // *Proteomics*. – 2001 – Volume-1, Issue-1, P.136-163.
10. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage // *Nature*. – 1970. – P. 680-685.
11. Larsson H., Ahren B. Islet dysfunction in insulin resistance involves impaired insulin secretion and increased glucagon secretion in postmenopausal women with impaired glucose tolerance. *Diabetes care*. 2000; 23(5):650-7.
12. Rahmouni K., Correia M., Haynes W. G., Mark A. L., 2005. Obesity-associated hypertension. New insights into mechanisms. *Hypertension*, 45: 9.
13. Shah P., Vella A., Basu A., Basu R., Schwenk W.F., Rizza R.A.: Lack of suppression of glucagon contributes to postprandial hyperglycemia in subjects with type 2 diabetes mellitus. *J. Clin Endocrinol Metab.* 2000; 85(11):4053-9.
14. Stuart P., Weisberg D., Desai M., Rosenbaum M., Leibel R. L., Ferrante A. W., 2003. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. clin. Invest.*, 112: 1796-1808.
15. Weber K. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis / K. Weber., M. Osborn // *J. Biol.Chem.* – 1969. – Vol. 244, № 16. – P. 4406-4412.
16. Xiu-Hua Shen., Qing-Ya Tang., Juan Huang., Wei Cai. Vitamin E regulates adipocytokine expression in a rat model of dietary-induced obesity. // *Experimental Biology and Medicine*. – 2010. – №235. – P. 47-51.
17. Плохинский Н.А. Методические консультации по биометрии // *Проблемы современной биометрии*. – М.: МГУ, 1981. – С. 30-50.

Reference (Scopus):

1. Abernethy D. R., Greenblatt D. J., Divoll M., Harmatz J.S., Shader R.I., 1981. Alterations in drug distribution and clearance due to obesity. *J. Pharmacol. exp. Ther.*, 217: 681-685.
2. Andersen T., Christoffersen P., Gluud C., 1984. The liver in consecutive patients with morbid obesity: a clinical, morphological, and biochemical study. *Int. J. Obesity*, 8: 107-115.

Д. Креницька, студ., А. Юрченко, асп., О. Савчук, д-р биол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна,
Н. Липець, студ.
ООО "Фармацевтический завод "Биофарма" Киев, Украина

ИЗМЕНЕНИЕ БЕЛКОВОГО СОСТАВА ТКАНЕЙ ПРИ РАЗВИТИИ ОЖИРЕНИЯ У КРЫС

Проблема ожирения в современном мире занимает ведущее место на ряду с другими патологиями. Вопреки устоявшимся представлениям о том, что причиной ожирения является гиподинамия и чрезмерное поступление пищи ведущие медицинские издания утверждают, что данная патология имеет полиморфное происхождение и связана каскадом различных нарушений в органах и их системах. В последнее время накопился массив данных, на основе которых постулируется участие тканеспецифических пептидных пулов в поддержании гомеостаза, в частности, обусловленных их способностью регулировать процессы пролиферации, дифференцировки и гибели клеток. Охарактеризованы фракции низко-, средне- и высокомолекулярных белков гомогенатов печени, почек, мышц и жировой ткани при развитии экспериментального ожирения у крыс. Белковые фракции были разделены с помощью электрофореза по методу Лаemmli в 10 % ПААГ с использованием додецилсульфата натрия. Распределение между белками в контрольной и группе крыс с ожирением показало разницу в количестве фракций. Исследовано количественный и качественный состав белковых фракций в гомогенатах тканей крыс. В условиях экспериментального ожирения белковый состав тканей изменяется, а именно увеличивается содержание среднемолекулярной фракции (67–35 кДа) и низкомолекулярной фракции (35–10 кДа). Экспериментальные данные могут свидетельствовать о нарушении белок-белковых взаимодействий в этих органах и предусматривать появление в кровотоке неспецифических белков и их фрагментов как результат усиления действия протеолитических ферментов и разрушения клеток органов. Дальнейшие исследования особенностей изменений белкового состава и пептидного пула тканей крыс будет способствовать лучшему пониманию биохимических процессов в условиях данной патологии, что важно для разработки новых подходов диагностики и лечения ожирения.

Ключевые слова: ожирение, белковый состав, высококалорийная диета, диск-электрофорез, метаболический синдром.

Надійшла до редколегії 07.02.2019
Отримано виправлений варіант 06.03.2019
Підписано до друку 06.03.2019

Received in the editorial 07.02.2019
Received a revised version on 06.03.2019
Signed in the press on 06.03.2019

D. Krenytska, stud., A. Yurchenko, Ph. D. stud., O. Savchuk Dr. Sci.
Taras Shevchenko National university of Kyiv, Kyiv, Ukraine,
N. Lipets, stud.
LLC "Pharmaceutical Plant" Biofarma, Kyiv, Ukraine

THE PEPTIDES PROFILE CHANGES IN TISSUES UNDER THE CONDITION OF EXPERIMENTAL OBESITY IN RATS

The problem of obesity in modern world has a leading place along with other pathologies. Contrary to the settled ideas that the reason of obesity is hypodynamia and overeating, leading medical editions claim that investigating pathology has polymorphic origin and are linked to the cascade of various violations in organs and their systems. Recently collected data array on the basis of which participation of tissue-specific peptide pools in maintenance to a homeostasis is being postulated, in particular, their ability to regulate proliferation processes, differentiation and death of cells is established. We have characterized fractions of low-, medium- and high-molecular-weight protein homogenates from liver, kidney, muscle and adipose tissue samples of rats with experimental obesity. Protein fractions were separated by electrophoresis using the Laemmli method in 10 % PAAG with sodium dodecyl sulfate (SDS). Spreading between proteins in control and group of rats with obesity has showed a difference in quantity of fractions. We have investigated quantitative and qualitative composition of protein fractions in rat's tissues. Under experimental obesity conditions protein composition of tissues changes, the content of median-molecular fraction (67-35 kDa) and low molecular weight fraction (35-10 kDa) increases. Experimental data may indicate connection breach in protein-protein interactions in these viscuses and predict the formation of non-specific proteins and their fragments in the bloodstream, as a result of increased activity of proteolytic enzymes and destruction of viscuses cells. Future studies in specifics of protein composition changes and peptide pool of rat's tissues will improve understanding the biochemical processes under the conditions of this pathology, which is important in development of new approaches to diagnosis and treatment of obesity principles.

Keywords: obesity, protein composition, high-calorie diet, electrophoresis, metabolic syndrome.

УДК 631.472.51

Т. Пилипчук, студ., Т. Тесьолкіна, студ., Д. Лукашов, д-р біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

СЕЗОННА ДИНАМІКА ФРАКЦІЙНОГО СКЛАДУ ЛІСОВОЇ ПІДСТИЛКИ НПП "ГОЛОСІЇВСЬКИЙ"

Лісова підстилка – важливий структурно-функціональний елемент лісових екосистем, динамічні процеси в якому утворюють зв'язок між фітоценозом та едафотопом. Накопичення підстилкового матеріалу та швидкість його розкладу характеризує інтенсивність кругообігу речовин у лісових екосистемах. Розглянуто особливості формування і розкладу підстилкового шару ґрунту в грабовій діброві в умовах Національного природного парку "Голосіївський" (м. Київ). Встановлено значні її обсяги на північному схилі яружної берегової системи (16,4 т/га восени, 4,3 т/га влітку). Аналіз запасів підстилки на момент закінчення листопаду показав відсутність суттєвих відмінностей на різних ділянках рельєфу (12,3–16,4 т/га). Протягом зимового періоду обсяги підстилки суттєво зменшуються за рахунок інтенсивних процесів мінералізації під сніговим покривом. Найбільш інтенсивно ці процеси відбуваються на ділянках схилу. Фракційний склад підстилки в цілому також не залежав від розташування дослідної ділянки за елементами рельєфу. Домінуючою фракцією восени та навесні був листовий опад (65-69 % загальної маси). Влітку зростала частка трухи (38-46 %). На всіх дослідних ділянках найменша кількість гілок спостерігалась восени і взимку, їхня частка була в межах 11-22 %. Максимальний обсяг гілок спостерігався на всіх ділянках влітку. Їхній обсяг становив 27-49 %. Частка насіння і його залишків протягом року була незначною і становила 1-3 %. Визначено швидкість мінералізації целюлози аплікаційним методом із застосуванням фільтрувального паперу. Динаміка швидкості розкладання целюлози в умовах південного та північного схилів яру виявилася подібною з максимумом у березні та липні-серпні. На ділянці плакору швидкість розкладу целюлози характеризувалася значною динамікою без чітко визначених сезонних періодів.

Ключові слова: підстилка, опад, мінералізація.

Вступ. Лісова підстилка є одним головних компонентів лісової екосистеми, що регулює процеси кругообігу речовини та виступає основним депо у ньому хімічних елементів. Таким чином, вона є важливою структурно-функціональною ланкою, що поєднує фітоценоз, зооценоз та мікробіоценоз лісової екосистеми в єдину злагоджену систему. Завдяки цьому, підстилка визначає не тільки генезис лісових ґрунтів, але й продуктивність лісових насаджень, і тому її обсяги та особливості фракційного складу можна використовувати як критерій оцінки стану лісової екосистеми.

Негативні зміни основних властивостей лісової підстилки і ґрунтів відбуваються на процесах біологічного кругообігу речовини у лісових екосистемах, особливо в умовах аеротехногенного забруднення. При надходженні забруднювачів у підстилку разом з листовим опадом відбувається їх трансформація. Таким чином, вона відіграє своєрідну тригерну роль – забезпечення регуляції напрямків потоків речовини у системі "листя–підстилка–ґрунт", втримуючи від вимивання хімічні елементи та рівномірно розподіляючи їх надходження (Жицька, 2010).

Кількість лісового опаду залежить від видового стану деревостану, їх бонітету, щільності й зімкненості крон, фізико-хімічних властивостей ґрунту. Специфічне

розшарування підстилки на горизонти мінералізації є наслідком різноякісності функції в підсистемах детритного блоку лісової екосистеми.

Національний природний парк "Голосіївський" було створено у 2007 р. Загальна площа становить 4525,52 га, в постійному користуванні – 1879,43 га. Він розташований в північній частині лісостепової зони на правому березі р. Дніпро. Це єдиний в Україні національний природний парк, розташований у межах великого міста (Онищенко та ін., 2016). Модельна ділянка розташована на території Голосіївського лісу, що характеризується численними балками і ярами. Тут переважають свіжі грабово-дубові ліси (*Carpinus betulus*, *Quercus robur*). Нашими дослідженнями раніше було охарактеризовано річну динаміку накопичення та мінералізації підстилки в умовах заповідної екосистеми грабового лісу Канівського природного заповідника (Lukashov, Levchenko, 2015).

Локалізація парку в межах мегаполісу та значне антропогенне навантаження на його екосистему становлять значний науковий інтерес у дослідженнях процесів, що відбуваються у лісовій екосистемі. Представлена робота спрямована на вивчення сезонних змін обсягів та структури підстилки як маркера стабільності лісової екосистеми.

Матеріали та методи. Динаміку запасів та складу досліджували на базі НПП "Голосіївський" щомісяця з жовтня 2015 року по квітень 2017 року. Було обрано район грабово-дубового лісу на території природного парку з найтипівішими умовами.

Ділянка 1 – південний схил яружної системи ННП "Голосіївський". N 50°22'24.5", E 30°29'16.3".

Кут нахилу східного краю – 26°, західного краю – 32°, середній нахил – 29°. Зімкненість крон: 70-80 %. Деревостан: граб звичайний і клен гостролистий (70/30 %). Трав'янистий ярус: щитник чоловічий, копитняк європейський.

Ділянка 2 – північний схил яру, що розташований на відстані 20 м. від ділянки 1. N 50°22'24.0" E 30°29'15.7" Кут нахилу східного краю – 21°, західного краю – 33°, середній нахил – 27°. Зімкненість крон: 75-85 %. Деревостан та трав'янистий ярус подібний ділянці 1.

Ділянка 3 – плакор N 50°22'18.00"; E 30°29'11.00". Зімкненість крон: ≈ 90 %. Деревостан: граб звичайний, дуб звичайний.

Проби відбирали щомісяця в 3-х кратній повторності на визначених ділянках з квадратів площею 1 м² у два шари окремо: листовий та ферментований. Після відбору підстилку (або її окремі шари) запаковували у поліетиленові пакети і доставляли до лабораторії. Зразки підстилки зважували з точністю до 0,1 г та висушували в умовах приміщення. Підстилку розбирали за фракціями: листя, гілки, насіння та труха. Масу кожної фракції визначали окремо.

Дослідження динаміки мінералізації целюлози грабово-дубового лісу було проведено на плакорній ділянці та ділянках схилу південної та північної експозиції. Актуальну швидкість розкладання целюлози визначали аплікаційним методом за допомогою паперових фільтрів "біла стрічка" діаметром 15 см (Теппер та інш., 1979). Вміст целюлози у фільтрах становить 99,89 %. Фільтри запаковували в сітчасті поліпропіленові мішки з розміром отворів 1 см, які закладали між верхнім листовим (L) шаром підстилки та нижнім ферментативним

(F). Паперові фільтри попередньо просушували у сушильній шафі протягом 1 доби при температурі 95°С та зважували на аналітичних вагах ВЛА-200 з точністю до 1 мг. Після експозиції протягом 28–47 днів мішки з фільтрувальним папером (або його залишками) відшукували у підстилці, висушували протягом 1 доби при температурі 95°С та зважували. За різницею маси паперу визначали втрати целюлози в процесі мінералізації. Швидкість мінералізації розраховували у г/добу експозиції.

Визначення запасів лісової підстилки проводили за методикою Л.Е. Родина (Родин, Базилевич, 1965). Фракційний склад визначали за методикою Л.О. Карпачевського (1981). Математичну обробку результатів досліджень проводили з використанням Microsoft EXCEL-2010. Ступінь мінливості середнього арифметичного виражали як стандартне відхилення (SD). Статистичну значимість відмінностей вибірових величин визначали за критеріями Фішера та Стюдента з рівнем статистичної значимості $p < 0,05$. Подібність сезонних змін розкладання підстилки на експериментальних ділянках оцінювали за допомогою лінійного коефіцієнту кореляції Пірсона.

Результати та їх обговорення. Аналіз запасів підстилки на момент закінчення листопаду на різних ділянках рельєфу показав відсутність суттєвих відмінностей (табл. 1). Загальні обсяги підстилкового матеріалу коливалися у межах 12,3–16,4 т/га. Протягом зимового періоду обсяги підстилки суттєво зменшуються за рахунок інтенсивних процесів мінералізації під сніговим покривом. Найбільш інтенсивно ці процеси відбуваються на південному схилі, де її запаси зменшуються у 2,1 раза (з 16,9 до 7,9 т/га). Також підстилка інтенсивно руйнується на північному схилі, де її запаси скорочуються у 1,5 раза (з 12,3 до 7,9 т/га). Лише на плакорі у зимовий період не було відмічено статистично значимих змін запасів підстилки, що може бути пов'язано з відсутністю постійного снігового покриву у зимовий період 2015-2016 та 2016-2017 років та значним промерзанням ґрунту.

Таблиця 1. Запаси підстилки на експериментальних ділянках грабової діброви

Шар підстилки	Осінь		Зима		Весна		Літо	
	$\bar{X}$	SD	$\bar{X}$	SD	$\bar{X}$	SD	$\bar{X}$	SD
Південний схил								
Запас підстилки, т/га	16,4	6,6	7,9	4,1	8,1	3,5	4,3	2,5
Відносна вологість, %	26,6	2,7	29,8	3,5	22,8	3,0	16,3	2,2
Обсяг листового шару, кг/м ²	0,66	0,04	0,37	0,02	0,26	0,01	0,28	0,02
Обсяг ферментованого шару, кг/м ²	0,98	0,17	0,42	0,04	0,55	0,03	0,15	0,07
Північний схил								
Запас підстилки, т/га	12,3	6,1	7,9	4,3	4,1	2,0	2,7	1,5
Відносна вологість, %	24,5	2,2	32,9	3,5	22,3	2,8	17,3	2,1
Обсяг листового шару, кг/м ²	0,60	0,04	0,44	0,01	0,22	0,01	0,16	0,008
Обсяг ферментованого шару, кг/м ²	0,63	0,01	0,35	0,02	0,19	0,01	0,11	0,012
Плакор								
Запас підстилки, т/га	14,3	4,3	11,1	7,3	7,7	2,5	6,6	4,5
Відносна вологість, %	23,6	2,9	33,7	3,55	20,3	2,8	14,6	2,0
Обсяг листового шару, кг/м ²	0,45	0,03	0,33	0,01	0,34	0,03	0,29	0,01
Обсяг ферментованого шару, кг/м ²	0,98	0,13	0,78	0,08	0,43	0,01	0,37	0,01

У весняний період підстилка інтенсивно руйнується лише в умовах північного схилу, де її запаси скорочуються майже у 2 рази (з 7,9 до 4,1 т/га). У той час на південному схилі та плакорі її обсяги не зазнають суттєвих змін, що відображає процеси швидкого висихання підстилки на цих ділянках рельєфу. У літній період процеси мінералізації підстилки пришвидшуються на всіх досліджених ділянках. При цьому найбільше скорочення запасів було характерно для ділянок схилів, де обсяги підстилки зменшилися з моменту її формування восени у 4,0-4,5 рази, а з весняного періоду – у 1,5–2,0 рази,

сягнувши величини 2,7-4,3 т/га. В умовах плакору, де більш відчутні процеси висушування, запаси підстилки практично не змінилися (6,6±4,5 т/га у літній період порівняно з 7,7±2,5 т/га у весняний період). Мінімальний запас підстилки припадає на літній період і становить 4,3 т/га, що у 4 рази менше від початкової кількості.

Отримані нами величини запасу підстилки відповідають встановленим іншими дослідниками величинам для подібних фітоценозів України. Зокрема запаси підстилки в грабово-липовій посадці Смілянського лісництва (Черкаська область) восени становили 13,7 т/га,

зменшуючись навесні до 11,0 т/га та влітку – до 9,4 т/га (Жицька, 2010). За даними Жицька, Хоменко, (2011) експозиція схилу практично не впливає на запаси підстилки у грабово-липовій посадці. Так, для південного схилу запаси підстилки становили 10,8 т/га, для північного схилу – 9,4 т/га.

Аналіз запасів листяного шару на кінець осені показує, що його обсяги на північному та південному схилах є близькими (0,66 – 0,60 кг/м²). Лише на плакорі кількість листя була меншою, що можна пояснити їх видурванням та накопиченням у пониженнях рельєфу.

Протягом зими найшвидше процеси розкладу листяного шару відбувались на ділянці південного схилу, де його запаси скоротилися у 1,8 раза (з 0,66 до 0,37 кг/м²). Унаслідок відсутності снігового покриву на плакорній ділянці та поганим прогріванням північної сторони схилу, процеси мінералізації на цих ділянках відбуваються повільніше. За зиму на плакорній ділянці листяний шар скоротився до 0,33 кг/м², а на північному схилі до 0,44 кг/м².

За весняний період найінтенсивніше мінералізувався листяний шар на ділянці північного схилу, де його запас скоротився у 2 рази (з 0,44 до 0,22 кг/м²). На ділянці південного схилу процеси деструкції відбувались повільніше. Обсяги листяного шару скоротилися у 1,4 раза (з 0,37 до 0,26 кг/м²). На плакорній ділянці не було відмічено статистично значимих змін запасів листя, а його обсяги на кінець весни становили 0,34 кг/м².

З початку літа і до завершення літнього сезону на всіх дослідних ділянках, крім південного схилу відбувалось інтенсивне скорочення листяного шару підстилки. Так в умовах північного схилу обсяги скоротилися у 1,4 раза (з 0,22 до 0,16 кг/м²). На плакорі його запаси

скоротилися у 1,2 раза (з 0,34 до 0,29 кг/м²). На південному схилі спостерігалось незначне збільшення обсягів листяного шару (з 0,26 до 0,28 кг/м²). Це можна пояснити механічним переміщенням частини листя з плакорної ділянки, а також початком нового листопаду, перші ознаки якого з'являються з кінця липня – початку серпня місяця.

Аналіз запасів ферментованого шару підстилки на кінець осені показав, що його обсяги на південному схилі та плакорі є близькими і становлять 0,98 кг/м². Кількість підстилки у ферментованому шарі на північній ділянці була меншою у 1,5 раза і становила 0,6 кг/м². У ферментованому шарі процеси мінералізації відбувались на всіх ділянках що сезону. Оскільки, навіть у зимовий період, при наявності снігового покриву, зберігається оптимальна температура для процесів деструкції підстилки.

Аналіз змін фракційного складу лісової підстилки протягом сезонів дозволяє виявити особливості протікання процесів її мінералізації. Так, домінуючою фракцією восени та навесні було опале листя. Восени його кількість у на всіх ділянках була майже однаковою, їх частка становила 65–69 %. Взимку процеси розкладу сповільнюються, оскільки не на всіх ділянках зберігалась прийнятна температура для деструкції (Жицька, Ханенко, 2011). З початком потепління розклад листяної фракції пришвидшився на всіх ділянках, а частка листя зменшилася до 27–49 %. Влітку найменша частка листя була характерною для північного схилу (5 %), де зберігалася вища вологість підстилки. Плакорна ділянка навпаки характеризувалася значним обсягом нерозкладеного листя (26 %).

Таблиця 2. Фракційний склад підстилки (% від загальної маси) на експериментальних ділянках грабової діброви

Фракція	Сезон			
	Осінь	Зима	Весна	Літо
Південний схил				
Труха	18	24	36	38
Листя	65	60	31	10
Насіння	3	2	2	3
Гілки	14	14	32	49
Північний схил				
Труха	7	19	38	46
Листя	69	63	29	5
Насіння	2	3	1	2
Гілки	22	11	32	47
Плакор				
Труха	13	12	32	45
Листя	68	67	47	26
Насіння	3	1	1	2
Гілки	16	20	20	27

Іншою важливою складовою підстилки є гілки, обсяг яких значно змінювався за ділянками та сезонами спостереження. На всіх дослідних ділянках найменша кількість гілок спостерігалась восени та взимку, їх частка була в межах 11-22 %. Максимальний обсяг гілок спостерігався на всіх ділянках влітку. Їх обсяг становив 27-49 %, що можна пояснити опаданням цього річних вегетативних приростів та скороченням частки фракції листя. Частка трухи в листяному шарі поступово збільшується по мірі мінералізації листя. На момент формування листяного шару, частка трухи становить 7-18 %. Протягом зими її частка зростає до 12-24 %. Весною і літом спостерігається максимальні запаси трухи (38-45 %). В умовах грабово-дубової діброви НПП "Голосіївський" частка насіння та його залишків протягом року була незначною і

становила 1-3 %. Сталість запасів насіння та його оболонок свідчить про їх повільну мінералізацію.

Результати інших дослідників свідчать, що листя та труха є домінуючими складовими підстилки грабово-липових та дубово-ясеневих-грабових насаджень (Жицька, 2010; Остапчук, 2012). Їх сумарна частка становить 85–95 % незалежно від сезону. Частка гілок у підстилці грабово-липового лісу протягом року залишається стабільною в межах 3,1–3,4 % (Жицька, 2010). За даними О. Остапчука (2012) у листопаді частка гілок у грабовій діброві Уманського лісового господарства становила 13-14 %. Швидкі зміни кількості гілок у підстилці свідчать про те, що вони активно мінералізуються протягом кількох місяців і тому разом з листям та насінням становлять активну фракцію підстилки. За даними Кар-

пачевського (1987) швидкість розкладу гілок суттєво не відрізняється від руйнування листового опаду.

За даними наукових публікацій, рельєф суттєво впливає на фракційний склад лісової підстилки. Зокрема, в умовах байраку Генералка (о. Хортиця) у листопаді на дні частка листя становила 25 %, на північно-західному схилі – 19 %, а на південно-східному – лише 9 %. Переважаючою фракцією, незважаючи на листопад, були гілки, частка яких становила 23–50 %. Максимальне накопичення трухи було характерно для тальвегу балки (34 %) (Яковлева-Носарь, 2008). Дослідження в умовах Канівського заповідника показують подібність фракційного складу підстилки для всіх дослідних ділянок не залежно від їх розташування за рельєфом (Lukashov, Levchenko, 2015).

Таким чином, на всіх дослідних ділянках відбуваються швидкі процеси руйнування всіх компонентів підстилки. Особливо інтенсивно вони проходять у літній

період, коли частка листового опаду скорочується у 3–13 разів. Найінтенсивніше руйнування гілок спостерігається восени, коли їх частка скорочується у 2,0–3,5 рази порівняно з літнім періодом.

Для кількісної оцінки сезонних змін швидкості розкладу підстилки використали аплікаційний метод визначення швидкості мінералізації целюлози. За даними Белякової (2001) інтенсивність розкладання опаду підстилки тісно корелює з інтенсивністю мінералізації целюлози. Відмінності середньорічної швидкості мінералізації целюлози на досліджених ділянках лісової екосистеми виявилися значними. Повільна мінералізація целюлози в умовах плакору цілком відповідає сповільненим темпам розкладу підстилки на цій ділянці, що було показано вище (табл. 1). Отримані дані показують, що найповільніше целюлоза розкладалася в умовах плакору ($0,006 \pm 0,001$ г/добу), а найшвидше в умовах південного схилу – ($0,11 \pm 0,002$ г/добу) (рис. 1).

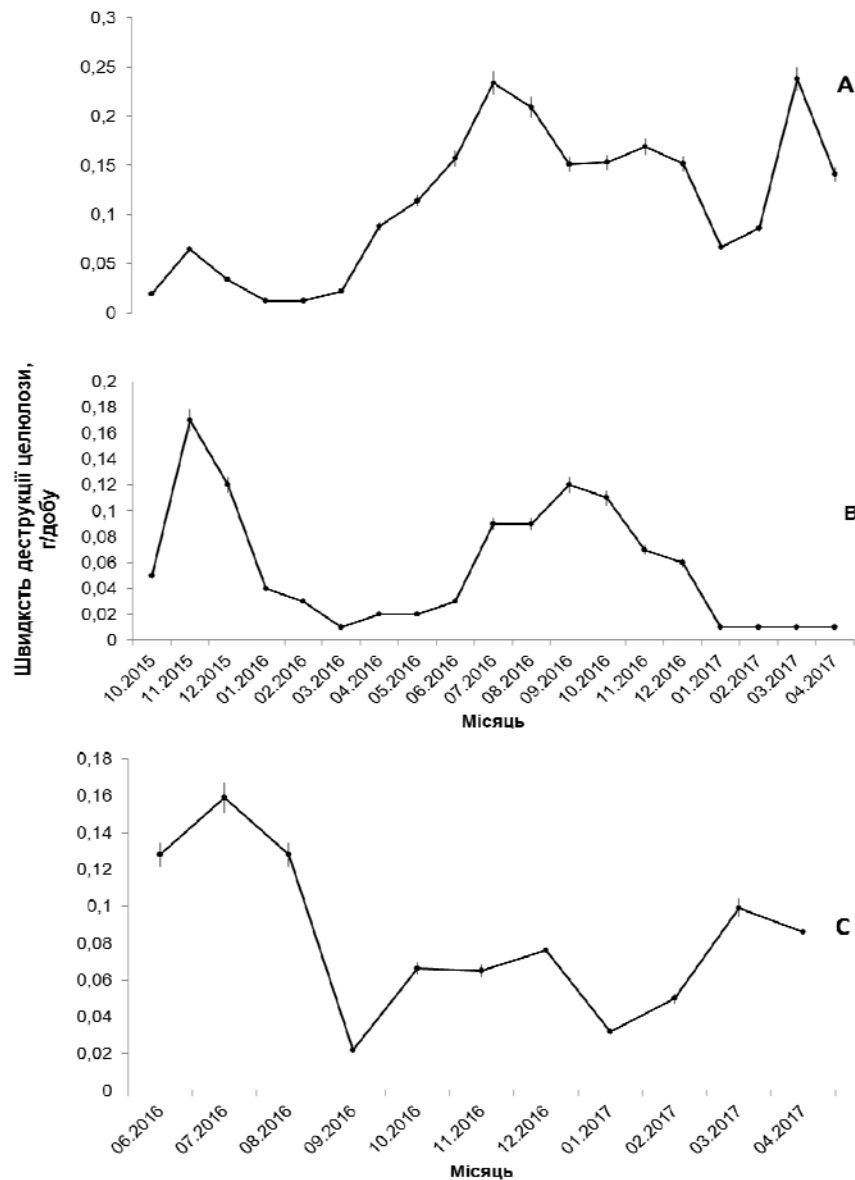


Рис. 1. Динаміка розкладання целюлози у підстилці грабової діброви НПП "Голосіївський":
А – південний схил, В – плакор, С – північний схил

Порівняння характеру сезонного ходу швидкості мінералізації целюлози на досліджених ділянках вказує на її подібність в умовах північного та південного схилів (коефіцієнт кореляції Пірсона 0,73). Середня швидкість розкладу целюлози за досліджуваний період на північному схилі становила $0,08 \pm 0,002$ г/добу, а на південному схилі – $0,11 \pm 0,002$ г/добу.

Протягом досліджуваного періоду швидкість мінералізації целюлози коливалася у межах від 0,234 г/добу до 0,067 г/добу на південному схилі та від 0,159 г/добу до 0,02 г/добу на північному схилі. Інтенсифікація процесів мінералізації целюлози на південному схилі відбувалася у липні-серпні (0,234–0,209 г/добу) та березні 2016 р. (0,238 г/добу). Це може пояснюватись тим, що в цей період спостерігалась найбільша кількість опадів та була підвищена вологість. В умовах північного схилу можна чітко виявити один період, коли спостерігаються швидкі процеси розкладу целюлози – з червня по серпень (0,128–0,158 г/добу). Також целюлоза швидко руйнувалася у березні та квітні 2017 р (0,098–0,086 г/добу). Такі результати можна пояснити умовами збереження вологості на північному схилі, що сприяє процесам мінералізації целюлози. Значні піки спадання деструкції лісової підстилки спостерігалися у вересні (0,022 г/добу) та протягом зимового періоду, а саме у січні та лютому (0,032–0,05 г/добу).

Швидкість розкладу на плакорній ділянці різко відрізнялася від умов схилу (коефіцієнт кореляції Пірсона 0,12). Найінтенсивніше розкладання целюлози на плакорній ділянці відбувалося у листопаді 2015 р. (0,017 г/добу), мінімальне значення швидкості розкладу целюлози – у березні (0,001 г/добу) 2016 р. Рівень значимості даних величин дослідження не перевищує критерій статистичної значимості ($p < 0,05$). З жовтня по листопад 2015 р. відбувається різке збільшення швидкості розкладання целюлози в три рази. Варто відзначити, що швидкість мінералізації целюлози на плакорній ділянці майже не залежить від температурного фактору. Зниження інтенсивності розкладання целюлози спостерігається як в зимовий період, так і в літній. Подібні результати були отримані під час дослідження процесів розкладу целюлози в умовах грабової діброви Канівського природного заповідника (Levchenko, Lukashov, 2016). За даними інших авторів, інтенсивність розкладу целюлози більш тісно пов'язана з кількістю атмосферних опадів, ніж з температурою поверхні ґрунту (Белякова, 2001). Цілком ймовірно, що вплив вологості підстилки на швидкість мінералізації целюлози пов'язаний з домінуванням грибів у процесах деструкції лісової підстилки. Відомо, що руйнування целюлози відбувається у 10 разів швидше при переважанні грибів у підстилці (Stursova, 2012). Вологість субстрату є більш важливим фактором розвитку мікроорганізмів, ніж його температура.

Висновки. Підстилка грабової діброви в умовах Національного природного парку "Голосіївський" є динамічною системою, яка характеризується швидкими процесами мінералізації різних фракцій рослинного опаду. Обсяги запасів підстилки та процеси мінералізації окремих її складових залежать від розташування ділянки за елементами рельєфу. Розподіл обсягів підстилки, та її структурних шарів відображає не лише особливості розкладу рослинного опаду, а також процеси його накопичення.

1. Аналіз запасів підстилки на момент закінчення листопаду показав відсутність суттєвих відмінностей на різних ділянках рельєфу (12,3-16,4 т/га). У зимовий період най-

більш інтенсивно мінералізація підстилки відбувається на південному схилі, весною – на північному. Найбільш повільно підстилка руйнується протягом всіх сезонів в умовах плакору, де її запаси навесні та влітку залишилися практично незмінними (7,7 та 6,6 т/га відповідно).

2. Обсяги запасів листяного шару на північному та південному схилах є близькими (0,66–0,60 кг/м²). Лише на плакорі кількість листя була меншою, що можна пояснити їх видуранням та накопиченням у пониженнях рельєфу. Процеси руйнування листяного шару відображає процеси мінералізації підстилки в цілому: найповільніше його мінералізація відбувається в умовах плакору. Запаси ферментованого шару підстилки на кінець осені на південному схилі та плакорі є близькими і становлять 0,98 кг/м². Кількість підстилки у ферментованому шарі на північній ділянці була меншою у 1,5 рази і становила 0,6 кг/м².

3. Домінуючою фракцією підстилки восени та навесні було опале листя. Восени його кількість у на всіх ділянках була майже однаковою, їх частка становила 65–69 %. Улітку найменша частка листя була характерною для північного схилу (5 %). Плакорна ділянка навпаки характеризувалася значним обсягом нерозкладеного листя (26 %). Важливою складовою підстилки є гілки, обсяг яких влітку становив 27–49 %, що можна пояснити опаданням цюгорічних вегетативних приростів та скороченням частки фракції листя. Восени на момент формування підстилки їх частка також є суттєвою (14–22 %).

4. Швидкість мінералізації целюлози відображає інтенсивність процесів розкладання лісової підстилки в цілому. Протягом досліджуваного періоду швидкість мінералізації целюлози коливалася у межах від 0,234 г/добу до 0,067 г/добу на південному схилі, та від 0,159 г/добу до 0,02 г/добу на північному схилі. Швидкість розкладу целюлози та її динаміка на плакорній ділянці різко відрізнялася від умов схилу. Найінтенсивніше розкладання целюлози відбувалося у листопаді (0,017 г/добу), мінімальне – у березні 0,001 г/добу).

Список використаних джерел:

- Белякова О.И. Многолетняя динамика разложения растительного опада в основных экосистемах Центральной лиственничной тайги: автореф. дисс. канд. биол. наук / Ольга Ивановна Белякова. – Воронеж, 2001. – 21 с.
- Жицька Н. Трансформація органічної речовини в підстилках листяних насаджень Черкаського регіону / Н. Жицька, О. Ханенко // Вісн. Київ. нац. ун-ту імені Тараса Шевченка. Біологія, 2011. – 58. – С. 42-44.
- Жицька Н.В. Вплив морфологічних особливостей та фракційного складу підстилок на ґрунтоутворення в листяних насадженнях / Н.В. Жицька // Питання біоіндикації та екології, 2010. – Вип. 15, №2. – С. 50-57.
- Карпачевский Л.О. Лес и лесные почвы / Л.О. Карпачевский. – Москва: Лесная промышленность, 1981. – 264 с.
- Lukashov D.V. Seasonal changes of resources and structure of hornbeam forest litter of Kaniv nature reserve (Ukraine) / D.V. Lukashov, I.V. Levchenko // Заповідна справа, 2015. – Вип. 1. – С. 61-66.
- Levchenko I.V. Influence of climatic conditions on the cellulose decomposition rate in hornbeam oak wood litter of Kaniv Natural Reserve / I.V. Levchenko, D.V. Lukashov // Заповідна справа, 2016. – Вип. 1. – С. 35-42.
- Родин Л.Е. Динамика органического вещества и биологический круговорот в основных типах растительности / Л.Е. Родин, Н.И. Базилевич. – Москва; Ленинград: Наука, 1965. – 247 с.
- Судинні рослини і мохоподібні національного природного парку "Голосіївський" / В.А. Онищенко, О.І. Прядко, В.М. Вірченко та ін. – Київ: Альтпрес, 2016. – 94 с.
- Остапчук О.С. Лісовий опад та підстилка в культурах дуба звичайного в умовах правобережного лісостепу. / О.С. Остапчук // Наук. вісн. НУБіП, 2012. – Вип. 171, №3. – С. 186-192.
- Теппер Е.З. Практикум по микробиологии / Е.З. Теппер, В.К. Шильникова, Г.И. Переверзева. – Москва: Колос, 1979. – 216 с.
- Яковлева-Носарь С.О. Морфолого-фракційна характеристика підстилки байраку Генералка / С.О. Яковлева-Носарь // Вісн. Запорізьк. ун-ту. Біол. науки, 2008. – №2. – С. 190-195.

12. Stursova J. Fungal community on decomposing leaf litter undergoes rapid successional changes / J. Stursova, P. Baldrian // ISME J., 2013. – 7. – P. 477-486.

Reference (Scopus):

1. Belyakova O.I. Perennial dynamics of decomposition of plant fall in the basic ecosystems of the Central forest-steppe [abstract o dissertation]. Voronezh; 2001. Russian.
2. Zhitska N., Khanenko O. Transformation of organic substance in litters of foliose plantings of Cherkassy region. Herald of Taras Shevchenko Kyiv National University. 2011; 58 Suppl: 42–44. Ukrainian.
3. Zhitska N.V. Influence of morphological peculiarities and fractional composition of litters on soil formation in foliose plantings. Issues of bioindication and ecology. 2010; 15 Suppl 2: 50–57. Ukrainian.
4. Karpachevsky L.O. Forest and forest soils. 1th ed. Moscow; 1981. 264 p. Russian.
5. Lukashov D.V., Levchenko IV. Seasonal changes of resources and structure of hornbeam forest litter of Kaniv nature reserve. Nature conservation. 2015; 21 Suppl 1: 61-66.
6. Levchenko I.V., Lukashov D.V. Influence of climatic conditions on the cellulose decomposition rate in hornbeam oak wood litter of Kaniv Natural Reserve. Nature conservation. 2016; 22 Suppl 1: 35-42.
7. Rodin L.E., Bazilevich N.I. The dynamics of organic matter and the biological circulation in the main types of vegetation. Leningrad: Science; 1965. 247 p. Russian.

8. Onishchenko V.A., Vijnchenko V.M., Prjadjko O.I. Vascular plants and bryophytes of Holosiivskyi National Nature Park. Kyiv: Alterpress; 2016. 94 p. Ukrainian.

9. Ostapchuk O.S. Forest oats and litter in conventional oak cultures in the right-bank forest steppe. Scientific herald of Kyiv National University of Bioresources and Environmental Management. 2012; 171 Suppl 3: 186–192. Ukrainian.

10. Tepper E.Z., Shilnikova V.K., Pereverzeva G.I. Educational aid to microbiology. Moscow: Kolos; 1979. 216 p. Russian.

11. Yakovleva-Nosar S. O. Morphological and fractional characteristics of litter of Generala ravine. Herald of Zaporizhzhia National University. Biological sciences. 2008; Suppl 2: 90–195. Ukrainian.

12. Stursova J., Baldrian P. Fungal community on decomposing leaf litter undergoes rapid successional changes. ISME Journal. 2013; Suppl 7: 477–486.

Надійшла до редколегії 01.02.2019

Отримано виправлений варіант 01.03.2019

Підписано до друку 01.03.2019

Received in the editorial 01.02.2019

Received a revised version on 01.03.2019

Signed in the press on 01.03.2019

Т. Пилипчук, студ., Т. Теселкина, студ., Д. Лукашов, д-р биол. наук
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

СЕЗОННАЯ ДИНАМИКА ФРАКЦИОННОГО СОСТАВА ЛЕСНОЙ ПОДСТИЛКИ НПП "ГОЛОСЕЕВСКИЙ"

Лесная подстилка – важный структурно-функциональный элемент лесных экосистем, динамические процессы в котором образуют связь между фитоценозом и эдафотопом. Накопление подстилочного материала и скорость его разложения характеризует интенсивность круговорота веществ в лесных экосистемах. Рассмотрены особенности формирования и разложения подстилочного слоя почвы в грабовой дубраве в условиях Национального природного парка "Голосеевский" (г. Киев). Установлены значительные ее объемы на северном склоне овражной береговой системы (16,4 т/га осенью, 4,3 т/га летом). Анализ запасов подстилки на момент окончания листопада показал отсутствие существенных различий на разных участках рельефа (12,3-16,4 т/га). В течение зимнего периода объемы подстилки существенно уменьшаются за счет интенсивных процессов минерализации под снежным покровом. Наиболее интенсивно эти процессы происходят на участках склона. Фракционный состав подстилки в целом тоже не зависел от расположения опытного участка по элементам рельефа. Доминирующей фракцией осенью и весной был лиственный опад (65-69 % общей массы). Летом росла доля трухи (38-46 %). На всех исследовательских участках наименьшее количество ветвей наблюдалось осенью и зимой, их доля была в пределах 11-22 %. Максимальный объем ветвей наблюдался на всех участках летом. Их объем составил 27-49 %. Доля семян и их остатков в течение года была незначительной и составила 1-3 %. Определена скорость минерализации целлюлозы аппликационным методом с применением фильтровальной бумаги. Динамика скорости разложения целлюлозы в условиях южного и северного склонов оврага оказалась сходной с максимумом в марте и июле-августе. На участке плакора скорость разложения целлюлозы характеризовалась значительной динамикой без четко выраженных сезонных периодов.

Ключевые слова: подстилка, опадание, минерализация.

T. Pylypchuk, stud., T. Tesolkina, stud., D. Lukashov, Dr. Sci.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

SEASONAL DYNAMICS OF THE FRACTIONAL COMPOSITION OF FOREST LITTER OF HOLOSIIVSKYI NATIONAL NATURE PARK

Leaf litter is an important structurally functional element of forest ecosystem, dynamic processes in which create a connection between phytocenosis and edaphotope. Accumulation of litter material and its decomposition rate characterize intensity of substance circulation in forest ecosystem. The present article deals with the results researching of the peculiarities of the forming and decomposition of soil litter layer in the hornbeam oak in the conditions of Holosiivskyi National Nature Park (Kyiv) were examined. Its considerable sizes on the north slope of ravine coast system (16,4 t/ha in autumn, 4,3 t/ha in the summer) were determined. Analysis of litter supply at the end of abscission showed a lack of significant differences in different sections of the terrain (12,3–16,4 t/ha). During the winter period, litter volumes are significantly reduced due to intensive mineralization processes under the snow cover. Most intensively, these processes take place in areas of the slope. Fractional composition of the litter did not generally depend on the location of the experimental area by relief elements. A dominating fraction in autumn and spring was fall (65–69 % of the total mass). In the summer, a portion of dust (38–46 %) increased. The smallest number of branches was observed in autumn and winter, their scope was between 11–22 % in all research areas. The maximum amount of branches was observed at all areas in the summer. Their volume was 27–49 %. The scope of seeds and its residues was insignificant and amounted to 1–3 % during the year. The speed of mineralization of cellulose by an application method with the use of filter paper is determined. The rate of decomposition of cellulose in the conditions of the southern and northern ravine slope turned out to be similar to the maximum in March and July–August.

Key words: litter, fall, mineralization.

УДК: 591.5:595.771(234.421.1:477)

А. Теплюк, асп., В. Теплюк, канд. біол. наук
Східноєвропейський національний університет імені Лесі Українки, Луцьк, Україна

ЕКОЛОГО-ФАУНІСТИЧНИЙ АНАЛІЗ МОШОК (*DIPTERA, SIMULIIDAE*) ГІДРОБІОЦЕНОЗІВ ПІВНІЧНО-СХІДНОГО МАКРОСХИЛУ УКРАЇНСЬКИХ КАРПАТ

Установлено, що видове багатство мошок північно-східного макросхилу Українських Карпат налічує 38 видів із 2 родів: *Prosimulium* Roubaud, 1906 (2 види) і *Simulium* Latreille, 1802 (36 видів). У струмках розвиваються 20 видів (індекс видового різноманіття Сімпсона (I_s) становить 0,22), а у річках – 26 видів ($I_s = 0,10$). Спільними для обох типів водотоків є 8 видів *Simuliidae* (індекс спільності Чекановського-Серенсена (I) становить 0,26). Тільки у струмках розвиваються 12 видів, а у річках – 18 видів мошок. Домінують у гідробіоценозах північно-східного макросхилу Українських Карпат *S. trifasciatum* Curtis, 1839, *S. reptanoides* Carlsson, 1962, *S. ornatum* Meigen, 1818 і *S. intermedium* Roubaud, 1906. Найпоширенішими є *S. trifasciatum* і *S. ornatum*. Виявлено, що фауна *Simuliidae* основних висотно-зональних рослинних угруповань регіону відрізняється за складом і кількісним співвідношенням видів. Евритопними є *S. intermedium*, *S. ornatum*, *S. reptans* Linnaeus, 1758 і *S. trifasciatum*. У гідробіоценозах округу букових лісів зареєстровано 31 вид ($I_s = 0,09$), а у водотоках округу смерекових гірськокарпатських лісів – 24 види ($I_s = 0,18$). З'ясовано, що зі зменшенням висоти в окрузі букових лісів значення індексу видового різноманіття Сімпсона зменшується від 0,16 (20 видів) у підокрузі темнохвойно-букових приводільних лісів до 0,11 (21 вид) у підокрузі ялицево-букових і буково-ялицевих прикарпатських лісів.

Ключові слова: мошки, видовий склад, гідробіоценози, струмки, річки, північно-східний макросхил Українських Карпат.

Вступ. Північно-східний макросхил Українських Карпат завдовжки приблизно 280 км тягнеться вузькою смугою (30–45 км) через гірські райони Львівської, Івано-Франківської і Чернівецької областей. Він спускається із високогірних районів Вододільно-Верховинських Карпат та включає три послідовно розташованих із північного заходу на південний схід гірських пасма: Східні Бескиди, Горгани і Покутсько-Буковинські Карпати. Північно-східний макросхил Українських Карпат характеризується значними територіальними відмінностями рельєфу, клімату та гідрології, що визначило велику різноманітність біогеоценозів із високим ступенем унікальності і багатим видовим складом їх флори і фауни. Проте постійно зростаючий в останні роки рівень експлуатації природних ресурсів Українських Карпат негативно впливає на біоту регіону.

Преімагінальні фази розвитку мошок є типовими мешканцями протічних гідробіоценозів Українських Карпат. Значна чисельність симулід обумовлює їх роль у функціонуванні водних екосистем регіону: як структурні елементи вони входять до складу багатьох ланцюгів живлення, а також є середовищем існування для паразитів [10]. Крім того, під час живлення личинки *Simuliidae* певним чином сприяють підвищенню прозорості води, відфільтровуючи з неї детрит і мікропланктон, хоча загальна частка їх участі у цьому процесі мізерна.

Більшість опублікованих праць присвячених мошкам північно-східного макросхилу Українських Карпат датуються ще кінцем минулого століття. У них акцентовано увагу на видовому складі та ландшафтному розподілі *Simuliidae* [3; 8; 9]. На початку XXI ст. А.О. Панченко для цієї території навів список із 39 видів мошок [6]. Згідно з останніми відомостями симулідофауна північно-східного макросхилу Українських Карпат нараховує 53 види [7]. Однак слід зауважити, що після декількох інвентаризацій родини *Simuliidae* провідними спеціалістами напряму [1], частина відзначених А.О. Панченком

видів, були зведені до підвидів або взагалі втратили статус окремих таксономічних одиниць.

Зважаючи на важливе значення *Simuliidae* у гідробіоценозах і високий антропогенний тиск на ці екосистеми, виникає необхідність постійного моніторингу за видовим складом, чисельністю і топічним розподілом цієї групи амфібіонтних комах.

Матеріали і методи. У роботі представлені результати аналізу власних зборів преімагінальних фаз розвитку мошок із території південно-західного макросхилу Українських Карпат, які тривали із березня по листопад впродовж 2015–2017 років. У процесі досліджень обстежено витoki річки Дністер та її праві притоки, що стікають по північно-східному макросхилу Українських Карпат (басейни річок Стрий, Свіча, Лімниця, Бистриця-Надвірнянська) і гірську ділянку басейну річки Прут (річки Черемош, Путила, Сирет та їх притоки). Всього зібрано 268 проб матеріалу. Досліджено понад 40 000 личинок та лялечок мошок. Збір, фіксацію і препарування водних фаз *Simuliidae* проводили згідно із загальноприйнятими методиками [10]. Ідентифікацію видів здійснювали за допомогою визначників [2]. Систематичне положення навели згідно із сучасними уявленнями [1]. Для аналізу кількісних показників угруповань підраховували індекси домінування (ІД), поширення (ІП) [4], спільності Чекановського-Серенсена (I), видового різноманіття Сімпсона (I_s) [11].

Результати та їх обговорення. На основі проведених досліджень встановлено, що у водотоках північно-східного макросхилу Українських Карпат розвиваються 38 видів мошок із 2 родів (табл. 1). У видовому відношенні переважає рід *Simulium* Latreille, 1802, який представлений 36 видами із 5 підродів: *Nevermannia* Enderlein, 1921 (11 видів), *Eusimulium* Roubaud, 1906 (2 види), *Wilhelmia* Enderlein, 1921 (5 видів), *Obuchovia* Rubtsov, 1947 (1 вид) і *Simulium* Latreille, 1802 (17 видів). Із роду *Prosimulium* Roubaud, 1906 зареєстровано лише 2 види.

Таблиця 1. Кількісні та якісні показники угруповань мошок гідробіоценозів північно-східного макросхилу Українських Карпат

№ за/п	Вид	Струмки	Річки	ІД	ІП
1	<i>Prosimulium hirtipes</i> Fries, 1824	+	–	0,44	3,36
2	<i>P. rufipes</i> Meigen, 1818	+	–	0,28	1,49
3	<i>S. (Nevermannia) angustitarse</i> Lundström, 1911	+	–	1,75	2,61
4	<i>S. (N.) beltukovae</i> Rubtsov, 1956	+	–	0,33	1,87
5	<i>S. (N.) bertrandi</i> Grenier et Dorier, 1959	+	–	0,11	2,99
6	<i>S. (N.) brevidens</i> Rubtsov, 1956	+	+	0,66	7,46
7	<i>S. (N.) carthusiense</i> Grenier et Dorier, 1959	+	+	0,33	4,48
8	<i>S. (N.) codreanui</i> Serban, 1958	–	+	0,04	1,49
9	<i>S. (N.) crenobium</i> Knoz, 1961	+	–	0,01	0,75
10	<i>S. (N.) cryophilum</i> Rubtsov, 1959	+	–	0,07	1,12
11	<i>S. (N.) lundstromi</i> Enderlein, 1921	+	–	0,86	1,49
12	<i>S. (N.) oligotuberculatum</i> Macquart, 1826	+	–	0,30	4,48
13	<i>S. (N.) vernum</i> Macquart, 1826	+	–	0,19	1,49
14	<i>S. (Eusimulium) aureum</i> Fries, 1824	–	+	0,14	2,61
15	<i>S. (E.) velutinum</i> Santos Abreu, 1922	–	+	0,13	1,49
16	<i>S. (Wilhelmia) balcanicum</i> Enderlein, 1924	–	+	0,38	3,36
17	<i>S. (W.) equinum</i> Linnaeus, 1758	–	+	0,24	2,99
18	<i>S. (W.) lineatum</i> Meigen, 1804	–	+	0,09	2,24
19	<i>S. (W.) paraequinum</i> Puri, 1933	–	+	0,70	1,87
20	<i>S. (W.) pseudoequinum</i> Sequy, 1921	–	+	0,25	4,48
21	<i>S. (Obuchovia) auricoma</i> Meigen, 1818	–	+	4,44	1,87
22	<i>S. (Simulium) argyreatum</i> Meigen, 1838	–	+	1,22	4,48
23	<i>S. (s.str.) baracome</i> Smart, 1944	–	+	7,48	5,97
24	<i>S. (s.str.) columbaschence</i> Scopoli, 1780	–	+	4,84	3,36
25	<i>S. (s.str.) fontanum</i> Terteryan, 1952	+	–	1,68	2,99
26	<i>S. (s.str.) frigidum</i> Rubtsov, 1940	+	–	0,07	1,12
27	<i>S. (s.str.) intermedium</i> Roubaud, 1906	+	+	10,31	8,96
28	<i>S. (s.str.) maximum</i> Knoz, 1961	–	+	0,13	2,24
29	<i>S. (s.str.) monticola</i> Friederichs, 1920	+	+	1,42	2,99
30	<i>S. (s.str.) noelleri</i> Friederichs, 1920	–	+	0,94	4,48
31	<i>S. (s.str.) ornatum</i> Meigen, 1818	+	+	10,60	26,87
32	<i>S. (s.str.) reptanoides</i> Carlsson, 1962	–	+	11,74	11,94
33	<i>S. (s.str.) reptans</i> Linnaeus, 1758	+	+	9,94	19,40
34	<i>S. (s.str.) rotundatum</i> Rubtsov, 1940	–	+	0,08	1,12
35	<i>S. (s.str.) trifasciatum</i> Curtis, 1839	+	+	18,39	23,88
36	<i>S. (s.str.) variegatum</i> Meigen, 1818	+	+	0,66	2,61
37	<i>S. (s.str.) voilense</i> Serban, 1960	–	+	7,38	3,36
38	<i>S. (s.str.) vulgare</i> Dorogostaisky, Rubtsov et Vlasenko, 1935	–	+	1,38	2,99

Примітка: + – вид зареєстрований.

Для річок і струмків характерний свій симуліїдокомплекс (табл. 1). Однак серед зареєстрованих видів є й такі (21,1 %), що розвиваються в обох типах водотоків. Спільними для річок і струмків ($I = 0,26$) є 8 видів роду *Simulium*. В обох типах водотоків розвиваються представники підродів *Nevermannia* (2 види) і *Simulium* (6 видів). Види роду *Prosimulium* виявлені лише у струмках, а представники підродів *Eusimulium*, *Wilhelmia* і *Obuchovia* роду *Simulium* – лише у річках.

Видове багатство мошок струмків представлене 20 видами, серед яких кількісно переважає рід *Simulium* (18 видів) над родом *Prosimulium* (2 види) (табл. 1, рис. 1). Рід *Simulium* представлений підродами *Nevermannia* (55,0 % від усіх зареєстрованих видів) і *Simulium* (40,0 %). Загалом, половина видів мошок (10), що мешкають у струмках належать до підроду *Nevermannia*.

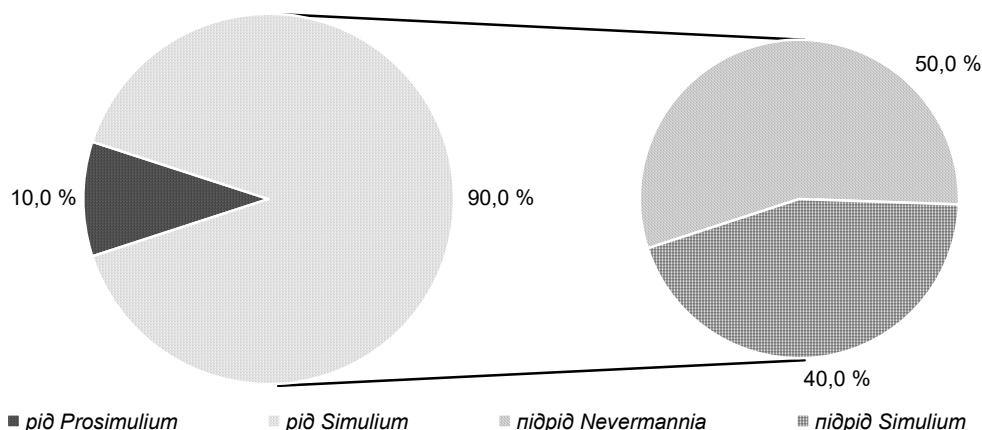


Рис. 1. Співвідношення видів Simuliidae, що розвиваються у струмках північно-східного макросхилу Українських Карпат

Симулідокомплекс річок багатший (26 видів) порівняно із струмками, але сформований лише представниками роду *Simulium* (табл. 1, рис. 2). Серед них переважають види підроду *Simulium* (57,7 % від усіх зареєстрованих видів).

Окрім них у річках розвиваються представники ще 4 підродів: *Nevermannia* (11,5 %), *Eusimulium* (7,7 %), *Wilhelmia* (19,2 %) і *Obuchovia* (3,9 %).

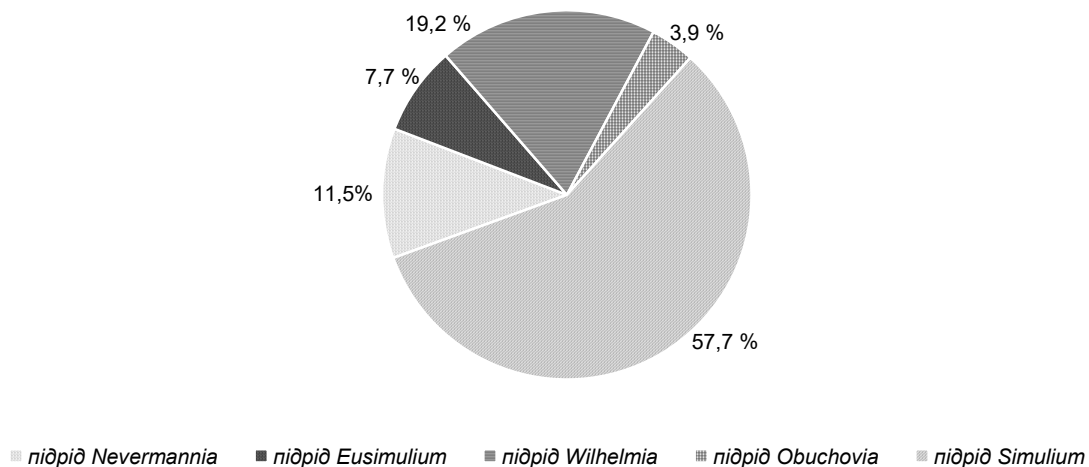


Рис. 2. Співвідношення видів Simuliidae, що розвиваються у річках північно-східного макросхилу Українських Карпат

На основі кількісного співвідношення всі зареєстровані види мошок розділено на 4 групи: масові, або домінантні (ІД становить понад 10,00 %), численні, або субдомінантні (ІД – 5,00-9,99 %), нечисленні (ІД – 1,00-4,99 %) і рідкісні (ІД – до 0,99 % включно) (табл. 1). Масовими у гідробіоценозах північно-східного макросхилу Українських Карпат є 4 види: *S. trifasciatum*, *S. reptanoides*, *S. ornatum* і *S. intermedium*. Представники цих видів становлять більше половини (51,04 %) від усіх зібраних водних фаз (рис. 3). Численними є 3 види: *S. reptans*, *S. baracorne* і *S. voilense*, на загальну частку яких в угрупованнях водних фаз мошок припадає 24,80 %. До нечисленних належать 7 видів, відносна чисельність яких разом становить 16,73 %. Переважна більшість видів симулід (24 види) належить до рідкісних. Серед них усі представники роду *Prosimulium* та підродів *Nevermannia* (за винятком *S. angustitarse*), *Eusimulium* і *Wilhelmia* роду *Simulium*. Поодинокими

особинами (до 10 особин у загальній кількості) представлені *S. codreanui* і *S. crenobium*. В цілому відносна частка представників цієї групи у гідробіоценозах регіону становить лише 7,43 %.

За індексом поширення також виділено 4 групи Simuliidae: широко розповсюджені (ІП – понад 20,00 %), поширені (ІП – 10,00-19,99 %), непоширені (ІП – 1,00-9,99 %) і локально поширені (ІП – до 0,99 % включно) (табл. 1). Найбільш поширеними у водотоках північно-східного макросхилу Українських Карпат є 4 види підроду *Simulium*, із яких широко розповсюдженими виявилися *S. ornatum* і *S. trifasciatum*, а поширеними – *S. reptans* і *S. reptanoides*. Проте переважна більшість видів мошок (33 види) належать до групи непоширених (86,8 % від усіх зареєстрованих видів). Локальне поширення має лише *S. codreanui*, який знайдений лише у верхній ділянці течії річки Прут.

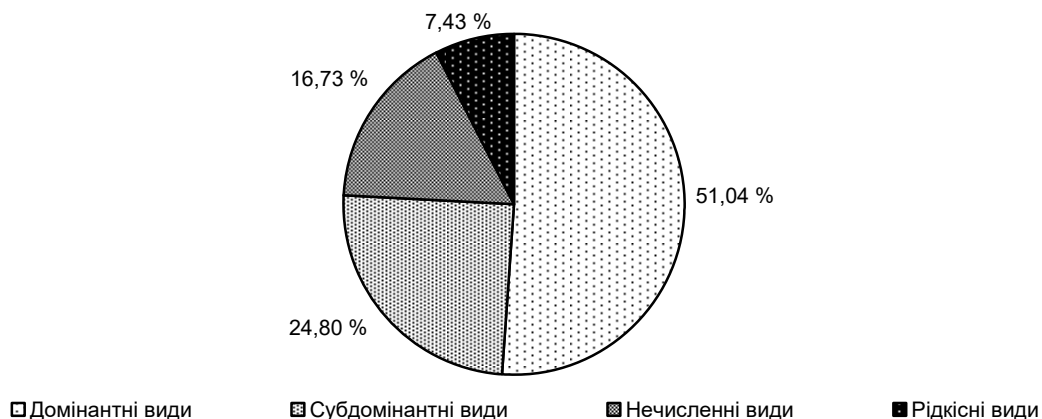


Рис. 3. Чисельність різних груп мошок у гідробіоценозах північно-східного макросхилу Українських Карпат

Хоча видове багатство симулід річок більше на 6 видів, ніж струмків, показник індексу видового різноманіття Сімпсона для цього типу водотоку значно менший

($I_s = 0,10$). Для струмків I_s становить 0,22. Це можна пояснити тим, що значна кількість видів (*S. lundstromi*, *S. brevidens*, *S. carthusiense*, *S. codreanui*, *S. rotundatum*,

S. variegatum, *S. lineatum*), які розвиваються у річках, мають дуже низьку чисельність (1-5 особин/дм²), тоді як загальна кількість представників домінантних (*S. reptanoides*, *S. ornatum*, *S. intermedium*, *S. baracorne*, *S. voilense* і *S. trifasciatum*) видів становить 130–220 особин/дм².

У межах північно-східного макросхилу Українських Карпат за типом рослинності (панівними видами деревних рослин) виділяють два основні зональні рослинні угруповання [5], кожне з яких розташований у певному висотному поясі і характеризується своїм видовим комплексом Simuliidae (рис. 4).

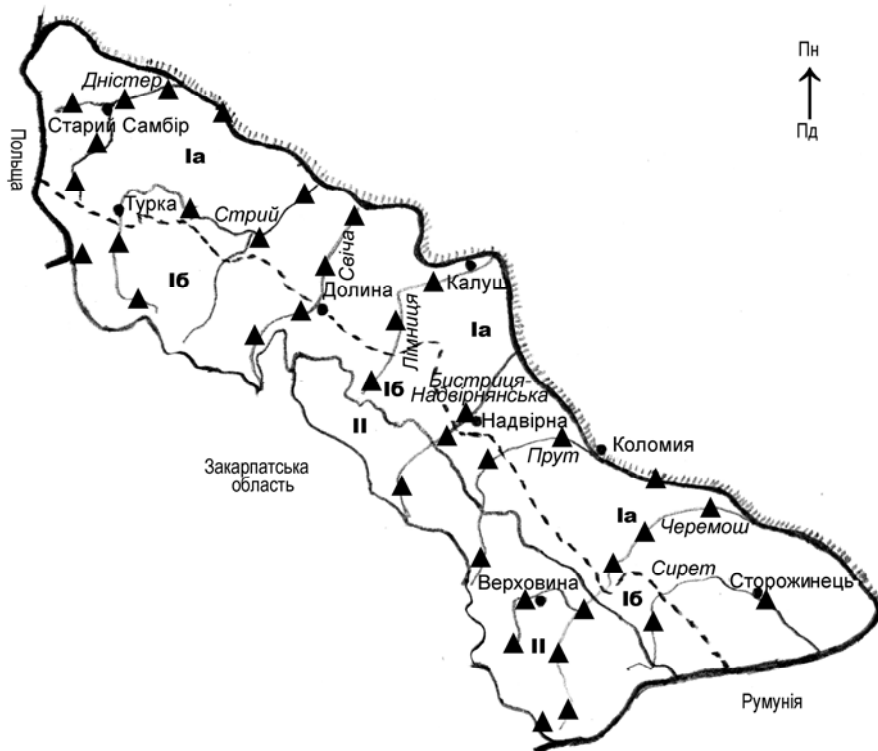


Рис. 4. Карта-схема основних висотно-зональних рослинних угруповань північно-східного макросхилу Українських Карпат:

I – округ букових карпатських лісів: Ia – підокруг ялицево-букових і буково-ялицевих прикарпатських лісів;
Ib – підокруг темнохвойно-букових привододільних лісів; II – округ смерекових гірськокарпатських лісів;
▲ – основні місця збору проб

Округ букових лісів північно-східного макросхилу Українських Карпат повністю охоплює пояс букових лісів, який зростає на висотах від 300 до 1450 м над р. м. В складі округу виділяють два підокруги. Підокруг ялицево-букових і буково-ялицевих прикарпатських лісів тягнеться широкою смугою на висотах 300–700 м над р. м. і займає більше, ніж половину території округу. Клімат тут помірно теплий, сума активних температур становить 1800–2400 °С, тривалість періоду активної вегетації коливається в межах 150–170 днів, річна сума опадів дорівнює 700–1000 мм. По цій території протікають найбільші річки регіону у ділянках їх середньої і нижньої течії, що тут впадають у Дністер (річки Стрий, Свіча, Лімниця, Бистриця-Надвірянська) чи верхів'я Прута (річки Черемош і Сирет). Малих водотоків відносно небагато.

Фауністичне багатство мошок підокругу нараховує 21 вид із роду *Simulium* (табл. 2). У кількісному (11 видів) і якісному (85,54 % від усіх зібраних преімагінальних фаз) відношеннях домінують представники підроду *Simulium*. Серед них усі масові види (*S. voilense*, *S. trifasciatum*, *S. baracorne*, *S. intermedium*, *S. ornatum* і

S. reptanoides). Підрид *Wilhelmia* хоча і представлений 5 видами, однак загальна чисельність їх представників порівняно із попередньою групою надзвичайно низька (3,67 % від усіх зібраних преімагінальних фаз). Це рідкісні види, за винятком *S. paraequinum*. Підрид *Obuchovia* представлений лише одним видом – *S. auricoma*, який, проте, займає субдомінантне положення (9,81 %) в гідробіоценозах підокругу. Представники підродів *Nevermannia* (3 види) і *Eusimulium* (1 вид) мають у водотоках регіону надзвичайно низьку чисельність і трапляються як поодинокі особини. На нашу думку це пов'язано з відносно невеликою кількістю дрібних водотоків, які є основним місцем розвитку цих видів. Лише у гідробіоценозах цього округу розвиваються всі види підродів *Wilhelmia*, а також *S. vernum*, *S. auricoma* і *S. frigidum*. Загалом ядро сімпліодофауни формують типові мешканці середніх і великих річок передгірного і низькогірного поясів.

Таблиця 2. Кількісний розподіл мошок у висотно-зональних рослинних угрупованнях північно-східного макросхилу Українських Карпат

№ за/п	Вид	Природні висотно-зональні рослинні пояси		
		округ букових карпатських лісів		
		підокруг ялицево-букових і буково-ялицевих прикарпатських лісів	підокруг темнохвойно-букових привододільних лісів	округ смерекових гірськокарпатських лісів
1	<i>P. hirtipes</i>	–	1,56	0,08
2	<i>P. rufipes</i>	–	–	1,00
3	<i>S. (N.) angustitarse</i>	0,44	5,73	–
4	<i>S. (N.) beltukovae</i>	–	1,23	–
5	<i>S. (N.) bertrandi</i>	–	–	0,40
6	<i>S. (N.) brevidens</i>	0,02	2,33	0,08
7	<i>S. (N.) carthusiense</i>	–	1,15	0,08
8	<i>S. (N.) codreanui</i>	–	–	0,16
9	<i>S. (N.) crenobium</i>	–	–	0,04
10	<i>S. (N.) cryophilum</i>	–	–	0,24
11	<i>S. (N.) lundstromi</i>	–	3,19	–
12	<i>S. (N.) oligotuberculatum</i>	–	0,29	0,80
13	<i>S. (N.) vernum</i>	0,42	–	–
14	<i>S. (E.) aureum</i>	0,10	0,37	–
15	<i>S. (E.) velutinum</i>	–	0,49	–
16	<i>S. (W.) balcanicum</i>	0,83	–	–
17	<i>S. (W.) equinum</i>	0,54	–	–
18	<i>S. (W.) lineatum</i>	0,20	–	–
19	<i>S. (W.) paraequinum</i>	1,54	–	–
20	<i>S. (W.) pseudoequinum</i>	0,56	–	–
21	<i>S. (O.) auricoma</i>	9,81	–	–
22	<i>S. (s.str.) argyreatum</i>	1,98	0,08	1,08
23	<i>S. (s.str.) baracorne</i>	12,63	–	6,39
24	<i>S. (s.str.) columbaschence</i>	–	–	17,44
25	<i>S. (s.str.) fontanum</i>	–	0,20	5,87
26	<i>S. (s.str.) frigidum</i>	0,15	–	–
27	<i>S. (s.str.) intermedium</i>	11,93	7,82	10,10
28	<i>S. (s.str.) maximum</i>	–	0,33	0,16
29	<i>S. (s.str.) monticola</i>	–	5,24	–
30	<i>S. (s.str.) noelleri</i>	0,02	0,04	3,31
31	<i>S. (s.str.) ornatum</i>	10,83	8,92	11,86
32	<i>S. (s.str.) reptanoides</i>	10,22	24,19	2,08
33	<i>S. (s.str.) reptans</i>	3,74	27,30	3,11
34	<i>S. (s.str.) rotundatum</i>	–	–	0,28
35	<i>S. (s.str.) trifasciatum</i>	15,19	7,37	34,32
36	<i>S. (s.str.) variegatum</i>	–	2,17	0,28
37	<i>S. (s.str.) voilense</i>	16,09	–	0,36
38	<i>S. (s.str.) vulgare</i>	2,76	–	0,48

Підокруг темнохвойно-букових привододільних лісів вузькою смугою охоплює підніжжя Горган, Чорногори, Свидовецьких та Мармароських гір. Він поступово зужується з північного заходу на південний схід. Умови тут відзначаються більшою кількістю опадів, вищою вологістю повітря і нижчими температурами порівняно з підокругом ялицево-букових і буково-ялицевих прикарпатських лісів: сума активних температур становить 1600–2200 °С, тривалість вегетаційного періоду знаходиться в межах 140–150 днів, річна сума опадів становить 1000–1300 мм. Територія має щільну гідрологічну сітку, яку формують струмки, середні і малі річки, витоки яких розташовані переважно у високогірних районах північно-східного макросхилу Українських Карпат.

Симулідокомплекс підокругу нараховує 20 видів мошок із 2 родів (табл. 2). Рід *Prosimulium* представлений єдиним нечисленним видом *P. hirtipes*. Із роду *Simulium* виявлені представники 3 підродів. Основу фауністичного різноманіття мошок формують представники підроду *Simulium* (11 видів). Серед них домінантні види – *S. reptans* і *S. reptanoides*, на які припадає більше половини (51,49 %) усіх зібраних преімагінальних фаз симулід. Субдомінантне положення займають *S. ornatum*, *S. intermedium*, *S. trifasciatum* і *S. monticola*. Підрід *Nevermannia* представлений 6 видами, із яких *S. angustitarse* є субдомінантом (5,73 %), що іноді ма-

сово розвивається у струмках, 4 види є нечисленними (*S. lundstromi*, *S. brevidens*, *S. beltukovae*, *S. carthusiense*), а *S. oligotuberculatum* відзначений як рідкісний. Представники підроду *Eusimulium* (2 види) є рідкісними та виявлені в деяких малих річках у загальній кількості не більше 2–4 особин/дм². Лише у гідробіоценозах цього підокругу виявлені численні тут *S. monticola*, нечисленні *S. beltukovae* і *S. lundstromi* та рідкісний *S. velutinum*.

Округ смерекових гірськокарпатських лісів займає найвищий лісовий пояс північно-східного макросхилу Українських Карпат – на верхніх частинах схилів Горган, Чорногори і Мармароських гір. Клімат тут помірно холодний, сума активних температур становить лише 1000–1600 °С, вегетаційний період становить 136 днів, за рік випадає до 1500 мм опадів. Гідрорлогічна сітка щільна, представлена малими річками і струмками, які живлять Свічу, Лімницю, Бистрицю-Надвірнянську, чи входять до складу басейну верхів'я Прута.

Фауністичне багатство мошок округу нараховує 24 види із двох родів (табл. 2). У кількісному (22 види) і якісному (98,92 % від усіх зібраних преімагінальних фаз) відношеннях переважає рід *Simulium*. Він представлений двома підродами. Підрід *Nevermannia* хоча і нараховує 7 видів, однак їх загальна частка в угрупованнях водних фаз симулід надзвичайно низька (1,8 %

від усіх зібраних особин), оскільки всі вони є рідкісними і трапляються у кількості лише 1-4 особини/дм². Із них 4 види (*S. bertrandi*, *S. codreanui*, *S. crenobium*, *S. cryophilum*) знайдені лише у водотоках цього округу. Серед представників підроду *Simulium* виявлені види з різних у чисельному відношенні груп: від рідкісних (*S. maximum*, *S. rotundatum*, *S. variegatum*, *S. voilense*, *S. vulgare*), які представлені поодинокими (1-3 особини/дм²) екземплярами з окремих водотоків, до масових (*S. intermedium*, *S. ornatum*, *S. columbaschence*, *S. trifasciatum*), що формують основу чисельності (73,72 %) угруповань водних фаз мошок. Слід зауважити, що більше третини (34,32 %) усіх зібраних преімагінальних фаз симулід у цьому окрузі належить *S. trifasciatum*, який виявлений у більшості досліджених водойм. Проникнення на такі висоти *S. voilense* можна розглядати як випадкове, оскільки його представники виявлені лише в одній пробі, що зібрана неподалік нижньої межі округу. Окрім згаданих вище представників підроду *Nevermannia* лише в гідробіоценозах округу зареєстровано ще 2 види: *P. rufipes* і *S. rotundatum*. Всі вони є типовими мешканцями високогірних районів, які знаходять оптимальні умови для розвитку у витоках малих річок і струмках.

У водотоках усіх вертикально-зональних рослинних угруповань північно-східного макросхилу Українських Карпат розвиваються *S. brevidens*, *S. argyreatum*, *S. intermedium*, *S. noelleri*, *S. ornatum*, *S. reptanoides*, *S. reptans* і *S. trifasciatum*, яких можна вважати типовими евритопними видами, що мають високу екологічну пластичність. Із них половина (*S. intermedium*, *S. ornatum*, *S. reptans* і *S. trifasciatum*) виявлені у всіх досліджених типах гідробіоценозів: струмках, малих, середніх і великих річках.

Найвище видове різноманіття мошок за індексом Сімпсона ($I_s = 0,18$) притаманне рослинному угрупованню високогірного регіону – смерековим гірськокарпатським лісам. Із зменшенням висоти в окрузі букових лісів значення цього показника зменшується від 0,16 у підокрузі темнохвойно-букових привододільних лісів до 0,11 у підокрузі ялицево-букових і буково-ялицевих прикарпатських лісів. Хоча у гідробіоценозах округу букових лісів кількість видів мошок більша (31 вид), ніж у водотоках округу смерекових гірськокарпатських лісів (24 види), однак індекс видового різноманіття Сімпсона для цієї території є вдвічі меншим ($I_s = 0,09$), оскільки відносна чисельність багатьох видів симулід досить низька, в той час як загальна кількість особин масових видів часто у десятки і навіть сотні разів вища, ніж рідкісних (табл. 2). Багатий видовий склад симулід можна пояснити наявністю більш різноманітних за гідрофізичними умовами біотопів, у яких розвиваються преімагінальні фази.

Висновки. У водотоках північно-східного макросхилу Українських Карпат зареєстровано 38 видів Simuliidae із 2 родів. Симулідокомплекс річок формують 26 ($I_s = 0,10$), а струмків – 20 видів ($I_s = 0,22$). Домінують *S. trifasciatum*, *S. ornatum*, *S. reptanoides* і *S. intermedium*, із яких перші два мають широкое розповсюдження. У водотоках усіх висотно-зональних рослинних угруповань виявлено *S. brevidens*, *S. argyreatum*, *S. intermedium*, *S. noelleri*, *S. ornatum*, *S. reptanoides*, *S. reptans* і *S. trifasciatum*. Багатим у видовому відношенні (31 вид) є симулідокомплекс

округу букових лісів, порівняно з округом смерекових гірськокарпатських лісів (24 види).

Список використаних джерел:

1. Adler P. H. World blackflies (Diptera: Simuliidae): A comprehensive revision of the taxonomic and geographical inventory / P. H. Adler, R. W. Crosskey : [Electronic resource]. 2017. – Available from: <http://www.clemson.edu/cafls/biomia/pdfs/blackflyinventory.pdf> [Accessed 10.09.2017]. – 131 p.
2. Knoz J. To identification of Czechoslovakian black-flies (Diptera, Simuliidae) / J. Knoz // Folia priro-doveed. Fac. Univ. Purkyne, 1965. – Sv. 6, spis 5. – 56 p.
3. Panchenko A. O. Landscape distribution of black flies fauna in the east Carpatians / A. O. Panchenko // Int conf. "The east Carpatians fauna: its present state and prospects of preservation". – Uzhorod, 1993. – P. 41.
4. Беклемишев В. Н. Биологические основы сравнительной паразитологии / В. Н. Беклемишев. – М.: Наука, 1970. – 502 с.
5. Голубець М. А. Геоботаничне районування Українських Карпат – основа раціонального природокористування / М. А. Голубець // Пр. наук. т-ва ім. Шевченка. Екологічний зб. Екологічні проблеми Карпатського регіону. – Львів: вид-во НТШ, 2003. – Т. XII. – С. 283-292.
6. Панченко А. А. Біорізноманіття України: Естественноисторическое изучение семейства Мошек (Diptera: Simuliidae) / А. А. Панченко. – Донецк: ДонНУ, 2004. – 169 с.
7. Панченко А. А. К фауне мошек (Diptera: Simuliidae) северного макросклона Украинских Карпат / А. А. Панченко // Мат-ли міжнар. наук. конф. "Біорізноманіття та роль зооценозу в природних і антропогенних екосистемах". – Дніпропетровськ, 2005. – С. 290-292.
8. Панченко А. Б. Мошки Украинских Карпат / А. Б. Панченко // V з'їзд Укр-го ентомологічного т-ва: Тез. доп. (Харків, 7-11 вересня, 1998). – К., 1998. – С. 123-124.
9. Панченко А. А., Усова З. В. К фауне мошек (Diptera: Simuliidae) верхнего бассейна Днестра и Прута / А. А. Панченко // Реферативная информация о законченных исследовательских работах в вузах УССР. – К., 1976. – Вып. X. – С. 35.
10. Рубцов И. А. Мошки (сем. Simuliidae). Фауна СССР. Насекомые двукрылые / И. А. Рубцов. – М.; Л.: АН СССР, 1956. – 860 с.
11. Количественная гидроэкология: методы системной идентификации / В. К. Шитиков, Г. С. Розенберг, Т. Д. Зинченко, В. К. Шитиков. – Тольятти: ИЭБ РАН, 2003. – 463 с.

References (Scopus):

1. Adler P. H., Crosskey R. W. World blackflies (Diptera: Simuliidae): A comprehensive revision of the taxonomic and geographical inventory. 2017. 131 p. doi: <http://www.clemson.edu/cafls/biomia/pdfs/blackflyinventory.pdf>
2. Knoz J. To identification of Czechoslovakian black-flies (Diptera, Simuliidae). 1965. 56 p.
3. Panchenko A. O. Landscape distribution of black flies fauna in the east Carpatians. The east Carpatians fauna: its present state and prospects of preservation. Uzhorod, 1993. 41.
4. Beklemishev V.N. Biological Basis of Comparative Parasitology. Moscow; 1970. 502 p. In Russian.
5. Golubets M. A. Geobotanical zoning of the Ukrainian Carpathians is the basis of rational nature management Environmental problems of the Carpathian region. Lviv; 2003; XII: 283-292. In Ukrainian.
6. Panchenko A. O. The biodiversity of Ukraine: Natural-historical study of the blackflies family (Diptera: Simuliidae). Donetsk; 2004. 169 p. In Ukrainian.
7. Panchenko A. O. To the blackflies fauna (Diptera: Simuliidae) of the north macroslope of the Ukrainian Carpathians. The biodiversity and the role of zoocenosis in natural and anthropogenic ecosystems. Dnipropetrovsk; 2005. 290-292. In Russian.
8. Panchenko A. B. Blackflies of the Ukrainian Carpathians. Abstracts of reports of the V Congress of the Ukrainian Entomological Society (Kharkiv, 1998 September 7-11). Kyiv; 1998. 123-124. In Russian.
9. Panchenko A. O., Usova Z. V. To the blackflies fauna (Diptera: Simuliidae) the upper basin of the Dniester and the Prut. Abstract information about completed research works in universities of the USSR. Kyiv; 1976. X: 35. In Russian.
10. Rubzov I. A. Blackflies (family Simuliidae). Fauna of the USSR. Diptera insects. Moscow, Leningrad; 1956. 860 p. In Russian.
11. Shitikov V. K., Rozenberg G. S., Zinchenko T. D. Quantitative hydroecology: methods of system identification. Tolyatti; 2003. 463 p. In Russian.

Надійшла до редколегії 01.02.2019
Отримано виправлений варіант 01.03.2019
Підписано до друку 01.03.2019

Received in the editorial 01.02.2019
Received a revised version on 01.03.2019
Signed in the press on 01.03.2019

А. Теплюк, асп., В. Теплюк, канд. биол. наук

Восточноукраинский национальный университет имени Леси Украинки, Луцк, Украина

ЭКОЛОГО-ФАУНИСТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ МОШЕК (*DIPTERA, SIMULIIDAE*) ГИДРОБИОЦЕНОЗОВ СЕВЕРО-ВОСТОЧНОГО МАКРОСКЛОНА УКРАИНСКИХ КАРПАТ

Установлено, что видовое богатство мошек северо-восточного макросклона Украинских Карпат насчитывает 38 видов из 2 родов: *Prosimulium* Roubaud, 1906 (2 вида) и *Simulium* Latreille, 1802 (36 видов). В ручьях развиваются 20 видов (индекс видового разнообразия Симпсона (I_s) составляет 0,22), а в реках – 26 видов ($I_s = 0,10$). Общими для обоих типов водотоков являются 8 видов *Simuliidae* (индекс общности Чекановского-Сёренсена (I) составляет 0,26). Только в ручьях развиваются 12 видов, а в реках – 18 видов мошек. Доминируют в гидробиоценозах северо-восточного макросклона Украинских Карпат *S. trifasciatum* Curtis, 1839, *S. reptanoides* Carlsson, 1962, *S. ornatum* Meigen, 1818 и *S. intermedium* Roubaud, 1906. Широко распространены *S. trifasciatum* и *S. ornatum*. Выявлено, что фауна *Simuliidae* основных высотных-зональных растительных сообществ региона отличается по составу и количественным соотношениям видов. Эвриотопными являются *S. intermedium*, *S. ornatum* и *S. reptans* Linnaeus, 1758 и *S. trifasciatum*. В гидробиоценозах округа буковых лесов зарегистрировано 31 вид ($I_s = 0,09$), а в водотоках округа еловых горных карпатских лесов – 24 вида ($I_s = 0,18$). Установлено, что с уменьшением высоты в округе буковых лесов значение индекса видового разнообразия Симпсона уменьшается от 0,16 (20 видов) в подокруже темнохвойно-буковых водораздельных лесов до 0,11 (21 вид) в подокруже елово-буковых и буково-лихтовых прикарпатских лесов.

Ключевые слова: мошки, видовой состав, гидробиоценозы, ручьи, реки, северо-восточный макросклон Украинских Карпат.

A. Tepluk, Ph. D. stud., V. Tepluk, Ph. D.

Lesya Ukrainka Eastern European National University, Lutsk, Ukraine

ECOLOGY-FAUNISTIC ANALYSIS OF BLACKFLIES (*DIPTERA, SIMULIIDAE*) OF HYDROBIOCENOSIS ON THE NORTH-EASTERN MACROSLOPE OF THE UKRAINIAN CARPATHIANS

It has been installed that the species richness of the blackflies of the north-eastern macroslope of the Ukrainian Carpathians counts 38 species of 2 genera: *Prosimulium* Roubaud, 1906 (2 species) and *Simulium* Latreille, 1802 (36 species). 20 species develop in the streams (Simpson's species diversity index (I_s) equals to 0,22), and 26 species develop in the rivers ($I_s = 0,10$). There are 8 common species of *Simuliidae* for both types of watercourses (similarity index by Czekanowski-Sørensen (I) is 0,26). 12 species of blackflies develop only in the streams, and 18 species develop only in the rivers. *S. trifasciatum* Curtis, 1839, *S. reptanoides* Carlsson, 1962, *S. ornatum* Meigen, 1818 and *S. intermedium* Roubaud, 1906 dominate in the hydrobiocenoses of the north-eastern macroslope of the Ukrainian Carpathians. *S. trifasciatum* and *S. ornatum* are widespread. It has been discovered that *Simuliidae* fauna of main altitudinal zonal plant groups of the region differs in composition and quantitative correlation of species. *S. intermedium*, *S. ornatum*, *S. reptans* Linnaeus, 1758 and *S. trifasciatum* are eurytopic. In the hydrobiocenoses of the district of beech forests has been registered 31 species ($I_s = 0,09$), and in the watercourses of the district of spruce mountain Carpathian forests has been registered 24 species ($I_s = 0,18$). It has been found out that with the decrease of height in the district of the beech forests, the value of Simpson's species diversity index decreases from 0.16 (20 species) in the subdistrict of the dark-coniferous-beech watershed forests to 0.11 (21 species) in the subdistrict of fir-beech and beech-fir precarpathian forests.

Key words: blackflies, species composition, hydrobiocenoses, streams, rivers, south-western macroslope of the Ukrainian Carpathians.

УДК 57.021:615.919

І. Удовиченко, асп., Д. Олійник, студ., Ю. Дудкіна, студ.,

Т. Галенова, канд. біол. наук, О. Савчук, д-р біол. наук

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

АНАЛІЗ СЕКРЕТУ ШКІРНИХ ЗАЛОЗ ЧАСНИЧНИЦІ ЗВИЧАЙНОЇ (*PELOBATES FUSCUS*) НА ПРИСУТНІСТЬ ПОТЕНЦІЙНИХ ЕФЕКТОРІВ СИСТЕМИ ГЕМОСТАЗУ

Оскільки хімічний синтез новітніх біологічно активних сполук сьогодні досить складна і коштовна процедура, а ціна на лікарські засоби, основу яких становлять дорогі синтетичні біологічно активні сполуки, постійно зростає, то науковці все більше уваги звертають на природні джерела як перспективну сировину для отримання різноманітних біологічно активних речовин. Секрети залозистих клітин шкірних покривів амфібій є потужним вмістилищем потенційних фармакологічних агентів. На сьогодні детально вивчено їхню антимікробну, антивірусну, кардіотонічну та антидіабетичну дію, однак майже нічого не відомо про вплив секрету шкірних залоз безхвостих земноводних на функціонування системи гемостазу. Проаналізовано потенційні ефекти компонентів секрету шкірних залоз одного з представників вітчизняної батрахофауни – Часничиці звичайної (*Pelobates fuscus*) на окремі параметри системи гемостазу. У результаті хроматографічного поділу загальної секрету було отримано 4 білкові фракції, які мистили широкий спектр білків з молекулярними масами у діапазоні від 17 до 150 кДа. Компоненти фракції 1 мали активуючий ефект на протромбін і фактор X плазми. Декілька компонентів фракції 4 мали протеолітичні властивості та виражали субстратну специфічність щодо колагену. Компоненти фракцій 1 та 2 подовжували час зсідання плазми у коагуляційному тесті АЧТЧ. Доведено присутність біологічно активних компонентів у складі шкірного секрету *P. fuscus*, що вказує на перспективність подальших досліджень з метою ідентифікації окремих складових, відповідальних за прояв показаних ефектів з метою вивчення структурно-функціональних особливостей та механізму їх дії. Вирішення цих питань сприятиме подальшому більш широкому використанню секретів шкірних залоз земноводних як сировини для розробки нових оригінальних фармацевтичних агентів та/або біотехнологічних продуктів з метою їх використання у медицині та різних сферах промисловості.

Ключові слова: амфібії, секрети шкірних залоз, система гемостазу, хроматографічний поділ, протеолітична активність, субстратна специфічність, хронометричні тести.

Вступ. Сьогодні не існує жодних сумнівів у тому, що лікарські засоби природного походження представляють велику цінність для медицини. При вмілому і грамотному використанні, біологічно активні сполуки, виділені з природної сировини, можуть бути корисними у лікуванні патологічних станів, знайти своє застосування в діагностиці захворювань, а також бути цінним інструментарієм у різних лабораторних дослідженнях.

Отрути земноводних і отриманні з них компоненти міцно увійшли в практичну й експериментальну медицину [1, 2]; їх властивості продовжують вивчатися, а область застосування розширюватися. В межах світової наукової спільноти в останні десятиліття у цьому напрямку досягнуті важливі успіхи, зокрема, із шкірних секретів земноводних виділено ряд активних компонентів, що мають кардіотонічні [3], антидіабетичні [4], імуномодуючі [5], антимікробні [6, 7] та антивірусні [8, 9] активності. Більш

того, були виявлені седативні [10] та анагетичні [11] властивості компонентів секретів. Однак широке використання цих речовин у лікувальній практиці поки ускладнено тим, що механізм їх дії та можливі побічні ефекти залишаються недостатньо вивчені.

Біологічні ефекти компонентів шкірного секрету Часничниці звичайної (*Pelobates fuscus* (Laurenti, 1768)) вперше зацікавили науковців ще на початку минулого сторіччя. Так, Gessner (1927) у своїх дослідженнях показав, що шкірний секрет даного виду викликав гемоліз у експериментах *in vitro* та мав летальний ефект на різних представників безхвостих амфібій, включаючи *P. fuscus*. Пізніше Labler та співавтори [12] повідомили про летальний ефект у мишей при внутрішньовенному введенні їм отрути *P. fuscus*. Автори також відзначили зниження летального ефекту секрету при підшкірному введенні та майже повну його відсутність – за умов перорального введення секрету мишам [12]. У експериментах на щурах, при внутрішньошкірному застосуванні отрути *P. fuscus*, показано геморагічну активність компонентів секрету [12]. Незважаючи на те, що була доведена присутність гемолізинів у секреті *P. fuscus* [13], більш детальні дослідження показали, що причиною загибелі тварин не був прямий гемолітичний ефект активного компоненту [12]. Отже, проаналізувавши ряд літературних джерел ми відмітили певний інтерес науковців до компонентів отрути *P. fuscus*, однак, нам не вдалося відшукати науково обґрунтованої інформації щодо природи та біологічного потенціалу конкретних складових секрету.

Беручи до уваги необхідність якісної та кількісної оцінки біологічно активних речовин, що містяться у таких мало вивчених джерелах природного походження як секрети шкірних залоз земноводних, **метою даної роботи** було дослідити потенційні ефекти компонентів шкірного секрету *P. fuscus* на параметри системи гемостазу у експериментах *in vitro*.

Матеріали та методи. Статевозрілих особин виду *P. fuscus* (n=15; обох статей) відловлювали біля р. Десна, Чернігівської області, з подальшим утриманням у фаунобоксах віварію КНУ імені Тараса Шевченка. Водні суспензії шкірних секретів отримували шляхом промивання поверхні шкіри невеликою кількістю дистильованої води (близько 5 мл) після інтенсивного механічного подразнення шкірних залоз, розміщених паралельно поздовжньої осі тіла. Отримані суспензії ліофільно висушували (Telstar LyoQuest), сухий матеріал зберігали при 4°C. Ліофілізований секрет, перед використанням розчиняли з розрахунку 100 мг сухого матеріалу на 1 мл 50 мМ Тріс-НСІ буфера (рН 7,4), що містив 0,2 М NaCl. З метою відокремлення нерозчинних компонентів суспензію центрифугували при 3000 g протягом 10 хв. Концентрацію білка у супернатанті визначали за методом Бредфорд [14]. Білки секрету фракціонували методом хроматографії, що поділяє за розміром. Як хроматографічний носій використовували Superdex 75 16/60 GL (GE Healthcare Limited, Сполучене Королівство Великої Британії). Фракції збирали по піках за швидкості потоку 1 мл/хв. Білково-пептидний склад отриманих фракцій досліджували методом диск-електрофорезу у 15 % поліакриламідному гелі згідно з описаною методикою [15]. Ензим-електрофорез проводили відповідно до методики [16]. Розділювальний гель полімеризували за присутності желатину, колагену та фібриногену з розрахунку 1 мг відповідного субстратного білка на 1 мл розділюючого гелю. Аналіз одержаних електрофореграм здійснювали з використанням програми TotalLab 2.04. Представлені електрофореграми є типовими для серії повторних дослідів.

Плазму крові отримували згідно зі стандартним протоколом із стабілізованої цитратом венозної крові кроля. Час зсідання плазми крові досліджували у хронометричних тестах: "тромбіновий час" (ТЧ), "протромбіновий час" (ПЧ) та "активованний частковий тромбопластиновий час" (АЧТЧ) з використанням готових реактивів відповідних комерційних наборів (Ренам, РФ). У кюветі коагулометра змішували 45 мкл плазми крові та 5 мкл загального секрету *P. fuscus* або 5 мкл зразків фракцій, отриманих у результаті хроматографічного розділення загального секрету. Для визначення ТЧ до суміші вносили 50 мкл розчину тромбіну з активністю 3 МО/мл; для визначення ПЧ – 100 мкл тромбопластин-кальцієвої суміші; для визначення АЧТЧ – 50 мкл АЧТЧ-реагенту з подальшим додаванням 50 мкл розчину 0,025 М CaCl₂. Час зсідання у секундах фіксували на коагулометричному аналізаторі (Rayto RT-2201C, Китай).

Протеолітичну активність визначали за здатністю гідролізувати амідний зв'язок у складі наступних синтетичних хромогенних субстратів: Phe-Pip-Arg-pNA (S₂₂₃₈, субстрат до тромбіну), Val-Leu-Lys-pNA (S₂₂₅₁, субстрат до плазміну), Ile-Glu-Gly-Arg-pNA (S₂₂₂₂, субстрат до фактору Ха), pyroGlu-Pro-Arg-pNA (S₂₃₆₆, субстрат до активованого протеїну С). Реакцію проводили у лунках 96-лункового мікропланшету. Кінцевий об'єм інкубаційного середовища становив 250 мкл. У ході дослідження до 0,05 М Тріс-НСІ буфера, рН 7,4, додавали зразок загального секрету *P. fuscus* або зразок фракцій, отриманих у ході хроматографічного розділення загального секрету, з вмістом загального білка – 20 мкг. Після 5 хв інкубації за 37° С реакцію ініціювали додаванням відповідного специфічного хромогенного субстрату, кінцева концентрація кожного з них становила 0,3 мМ. Контрольний зразок включав ті ж компоненти, але замість відповідних фракцій секрету містив рівний об'єм 50 мМ Тріс-НСІ буфера, рН 7,4. Інкубацію проводили за 37° С протягом 90 хв. Оптичну щільність проб визначали через рівні проміжки часу при довжині хвилі 405 нм, використовуючи мікропланшеточний спектрофотометр (μQuant, BioTek Instruments, США). Активність виражали у нмоль пара-нітроаніліну (п-НА), вивільненого за 1 хв у перерахунку на 1 мг білка.

Для вивчення здатності компонентів секрету *P. fuscus* активувати певні проферменти системи гемостазу, використовували інкубаційне середовище аналогічного складу як описано вище, куди окрім досліджуваних зразків також вносили 20 мкл плазми крові. Реакцію ініціювали додаванням відповідного хромогенного субстрату з кінцевою концентрацією 0,3 мМ. Контрольний зразок включав ті ж компоненти, але замість досліджуваних зразків секрету містив рівний об'єм 50 мМ Тріс-НСІ буфера, рН 7,4. Визначення кількості вільного п-НА проводили за тотожних умов, описаних вище. При аналізі потенційного ефекту компонентів секрету *P. fuscus* на проензими плазми обрахунок отриманих результатів проводили наступним чином: значення, що відповідали кількості п-НА, вивільненого з відповідного синтетичного субстрату за умов прямої гідролітичної дії компонентів секрету, віднімали від значень, що відповідали кількості п-НА, який вивільнявся у експерименті з додаванням до інкубаційного середовища плазми. Така маніпуляція дозволила виокремити активність активних ензимів плазми, що потенційно могли утворитися внаслідок дії компонентів секрету на відповідні проензими. Одержані дані було оброблено методом варіаційної статистики. Різнниця вважалася достовірною при $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення. Питання щодо потенційних терапевтичних властивостей секретів шкіри земноводних останнім часом все частіше стає предме-

том дискусії на наукових конференціях. Особливо гостро підкреслюється те, що отрути земноводних є комплексним матеріалом, що водночас містить низку біологічно активних речовин, які відрізняються своїми біологічними ефектами на організм. А отже використання цих перспективних агентів з лікувальними цілями, їх подальше впровадження в фармацевтичну промисловість та/або біотехнологічне виробництво вимагає обов'язкового поділу вихідної сировини на окремі компоненти, ідентифікації природи та механізму дії даних компонентів.

З метою фракціонування загального секрету шкірних залоз *P. fuscus* нами було застосовано метод хроматографії, що поділяє за розміром. Для забезпечення оптимального поділу як хроматографічний носій ми використовували Superdex 75, оскільки даний носій

характеризується оптимальною, на нашу думку, хроматографічною зоною для поділу шкірного секрету (від 3 до 70 кДа), високою фізико-хімічною стабільністю та інертністю до утворення неспецифічних взаємодій зі зразком, що аналізується [17]. Як робочий буфер використовували 0,05 М Трис-НСІ, рН 7,4 з вмістом 0,2 М NaCl і вихідною кондуктивністю 29,5 мС; швидкість потоку становила 1 мл/хв. Оптимальний склад буферного розчину та швидкість хроматографування були попередньо підібрані експериментальним шляхом (дані не представлені). Зокрема, у ході хроматографічного розділення загального секрету шкірних залоз *P. fuscus* було отримано 4 піки, які було використано як об'єкт для подальших досліджень (рис. 1).

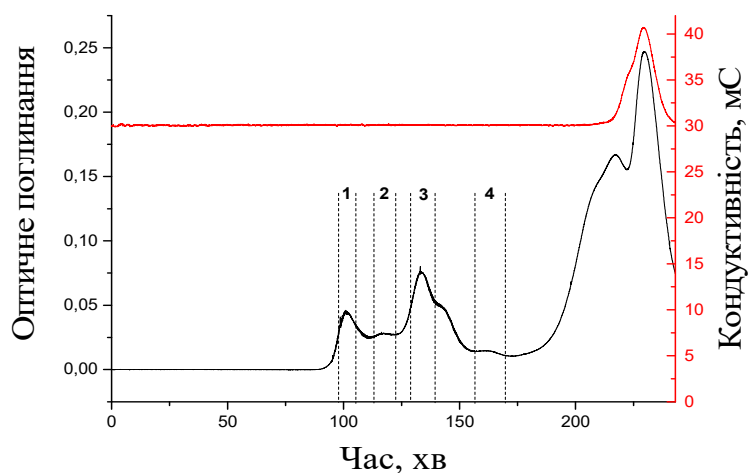


Рис. 1. Типова хроматограма поділу загального секрету шкірних залоз *P. fuscus* на колонці з Superdex 75 за умов використання як робочого буфера 0,05 М трис-НСІ, рН 7,4 з вмістом 0,2 М NaCl та при швидкості потоку 1 мл/хв. Цифрами (1-4) позначено піки хроматографічного розділення

Якісний аналіз білкового складу отриманих фракцій із застосуванням методу одновимірного диск-електрофорезу в поліакриламідному гелі за присутності

додецилсульфату натрію показав присутність у досліджуваних зразках широкого спектру білкових молекул, що різняться за молекулярними масами (рис. 2).

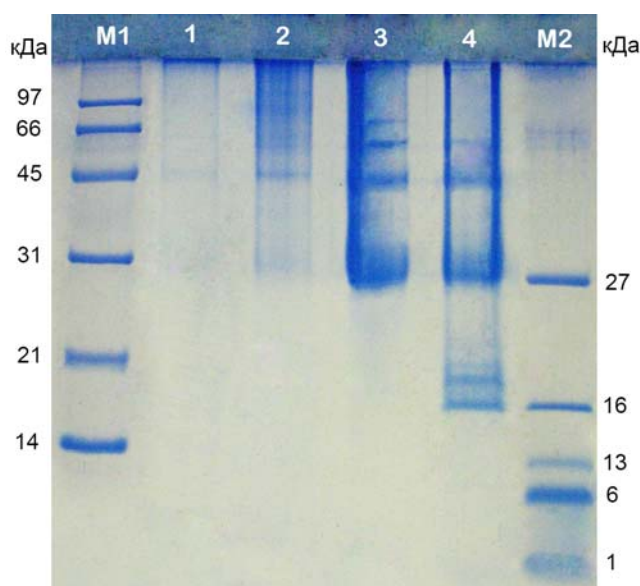


Рис. 2. Типова електрофореграма поділу білків секрету шкірних залоз *P. fuscus*. Цифрами (1-4) позначено номери піків хроматографічного розділення. Треки M1 та M2 – маркери молекулярних мас (кДа)

Подальший аналіз ензим-електрофореграм за допомогою програми TotalLab 2.04 дозволив ідентифікувати білки у діапазоні молекулярних мас від 17 до 150 кДа (табл. 1).

Таблиця 1. Молекулярні маси (ММ) білків у фракціях, отриманих у результаті хроматографічного поділу секрету шкірних залоз *P. fuscus*

№ фракції	ММ, кДа
1	150; 96; 88; 53
2	88; 53; 45; 37; 30
3	74; 54; 44; 30
4	56; 44; 30; 19; 17

Протеолітичну активність компонентів отриманих білкових фракцій досліджували методом ензим-електрофорезу. З метою деталізації субстратної специфічності протеолітичних ферментів у складі досліджуваних зразків, розділяючи гель полімеризували за присутності різних білків-субстратів – желатину, колаге-

ну та фібриногену. Поява у площині гелю, що містив колаген як субстратний білка, світлих зон гідролізу зумовлена проявом протеолітичної активності, що слугувало доказом присутності в досліджуваних фракціях секрету *P. fuscus* активних ферментів, що виявляли специфічність до колагену як субстрату (рис. 3).

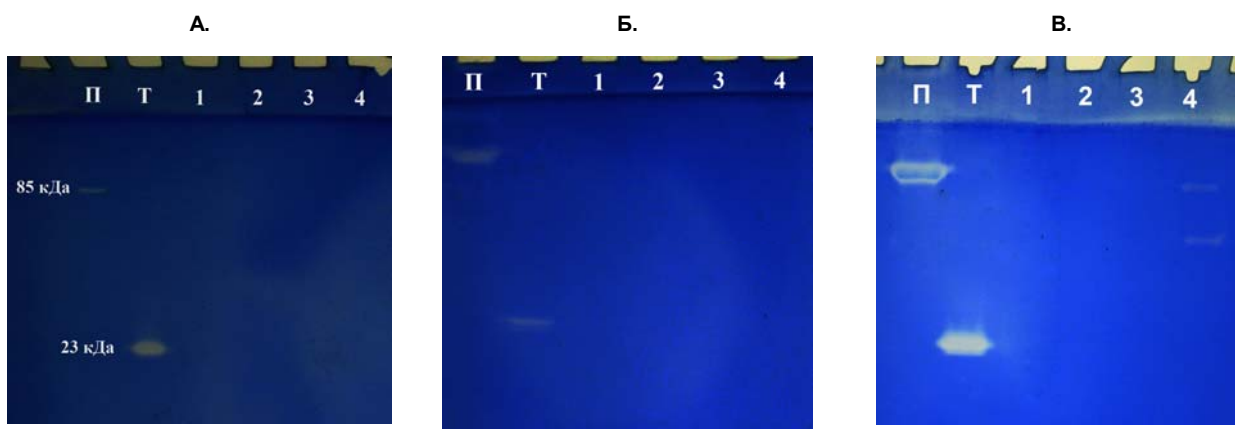


Рис. 3. Типові ензим-електрофореграми дослідження протеолітичної активності фракцій секрету *P. fuscus* із застосуванням як субстратів – желатину (А), фібриногену (Б), колагену (В).

Цифрами (1-4) позначено номери піків хроматографічного розділення.

Трек П – плазмін (85 кДа); трек Т – трипсин (23 кДа)

Специфічну протеолітичну активність компонентів фракцій, отриманих у результаті хроматографічного розділення шкірного секрету *P. fuscus* визначали за здатністю гідролізувати амідний зв'язок у синтетичних

хромогенних субстратах, специфічних до плазміну, тромбіну, фактора Ха та протеїну С. Результати дослідження наведені у табл. 2.

Таблиця 2. Протеолітична активність компонентів білкових фракцій (нмоль п-НА/мг*хв), отриманих у ході хроматографічного поділу загального секрету шкірних залоз *P. fuscus*

№ фракції	Субстрат до тромбіну	Субстрат до плазміну	Субстрат до фактора Ха	Субстрат до протеїну С
Загальний секрет	0,16±0,02	-	-	0,24±0,03
1	0,40±0,04	0,15±0,03	0,19±0,03	0,68±0,02
2	0,31±0,04	-	-	0,79±0,07
3	0,13±0,02	-	-	0,23±0,03
4	-	-	-	-

Наступним нашим завданням було визначити потенційний ефект компонентів фракцій секрету *P. fuscus* на відповідні проензими плазми. Для проведення цього експерименту в інкубаційне середовище з відповідним субстратом та зразком секрету шкірних залоз *P. fuscus* додатково вносили плазму крові кроля.

Встановлено, що загальний секрет шкірних залоз *P. fuscus* ініціював утворення активного тромбіну та фактору Ха у плазмі, тоді як під час дослідження впливу чотирьох фракцій даного виду амфібії, лише компоненти фракції №1 показали здатність активувати протромбін та фактор Х у плазмі (табл. 3).

Таблиця 3. Активність специфічних ензимів плазми (нмоль п-НА/мг*хв), які утворилися в результаті активації відповідних проензимів компонентами фракцій, отриманих у ході хроматографічного поділу загального секрету шкірних залоз *P. fuscus*

№ фракції	Активність тромбіну	Активність плазміну	Активність фактора Ха	Активність протеїну С
Загальний секрет	0,77	-	0,56	-
1	0,85	-	0,64	-
2	-	-	-	-
3	-	-	-	-
4	-	-	-	-

Коагуляційний гемостаз – каскад ферментативних реакцій, за допомогою яких неактивні попередники перетворюються у активні фактори. Обидва, зовнішній та внутрішній шляхи гемостазу призводять до утворення фібрину – білка, який зв'язує тромбоцити та інші молекули у стабільний тромб. У даній роботі для дослідження впливу компонентів фракцій шкірного секрету *P. fuscus* на функцію згортання плазми використовували коагулометричні тести АЧТЧ визначали для оцінки функціональної активності факторів згортання XII, IX, XI, VIII, X, V, протромбіну та фібриногену, які запускають внутрішній шлях коагуляційного гемостазу. Зовнішній шлях зсідання крові відтворювали за допомогою тесту ПЧ, де швидкість утворення згустку суттєво залежить від концентрації фактора VII, а також активності V і X факторів. ТЧ показує час, необхідний фібриногену для утворення ниток фібрину в присутності тромбіну. Визначення параметрів даного тесту дозволяє виявити порушення на кінцевих стадіях коагуляційного гемостазу.

Нам не вдалося виявити статистично значущих змін часу зсідання плазми крові у тестах ПЧ та ТЧ за умов

інкубації плазми з досліджуваними фракціями секрету шкірних залоз *P. fuscus*. Показники даних тестів за умов інкубації плазми з загальним секретом *P. fuscus* також були на рівні контрольних значень (табл. 4). Більш цікаві результати було отримано під час визначення часу зсідання плазми крові у тесті АЧТЧ. Показано, що при інкубації плазми крові кроля з загальним секретом шкірних залоз *P. fuscus* показник АЧТЧ перевищував контрольні значення на 35 %. Властивість подовжувати час, необхідний плазмі на утворення згустку у ході даного тесту був показаний для компонентів фракції 1 та 2, отриманих у ході хроматографічного розділення загального шкірного секрету *P. fuscus*. Оскільки для компонентів даних фракцій, як і для загального секрету в цілому, нами було відмічено низький рівень протеолітичної активності, отримані результати навряд чи можуть бути обумовлені деградацією факторів внутрішнього шляху коагуляційного гемостазу під впливом компонентів секрету *P. fuscus*. Тому припустимо присутність у даних фракціях інгібіторів факторів, що задіяні до процесу зсідання плазми.

Таблиця 4. Час зсідання плазми крові (с) за дії компонентів фракцій секрету шкірних залоз *P. fuscus* у коагуляційних тестах

Номер фракції	АЧТЧ	ПЧ	ТЧ
Контроль	18,1 ± 0,5	6,4 ± 0,1	33,3 ± 2,2
Загальний секрет	24,3 ± 0,3*	6,7 ± 0,5	32,0 ± 0,4
1	28,3 ± 0,3*	7,3 ± 0,3	33,0 ± 0,2
2	29,9 ± 0,5*	7,1 ± 0,2	32,2 ± 0,5
3	19,3 ± 0,4	8,3 ± 0,5	30,2 ± 0,2
4	21,3 ± 0,3	7,6 ± 0,4	28,4 ± 0,7

Примітка: * зміни статистично достовірні, порівняно з контролем

Висновки. Отже, у результаті попереднього скринінгу потенційних ефектів компонентів секрету шкірних залоз *P. fuscus* на окремі параметри системи гемостазу показано, що дана природна сировина може бути перспективним джерелом біологічно активних речовин, які мають протеолітичну активність, здатні активувати проензими плазми, зокрема протромбін та фактор X, а також впливати на коагуляційний гемостаз. На нашу думку, перспективним є подальше отримання та характеристика окремих білкових молекул, що відповідають за прояв показаних ефектів з метою подальшого вивчення структурно-функціональних особливостей та механізму їх дії. Вирішення цих питань буде сприяти подальшому більш широкому використанню секретів шкірних залоз земноводних як сировини для розробки нових оригінальних фармацевтичних агентів та/або біотехнологічних продуктів з метою їх використання у медицині та різних сферах промисловості.

Список використаних джерел:

1. Clarke B. T. The natural history of amphibian skin secretions, their normal functioning and potential medicinal applications / B.T. Clarke // Biol.

Rev., 1997. – Vol. 72, № 3. – P. 365-379. doi: 10.1111/j.1469-185X.1997.tb00018.x.

2. Xu X. The chemistry and biological activities of peptides from amphibian skin secretions / X. Xu, R. Lai // Chem. Rev., 2015. – Vol. 115, № 4. – P. 1760-1846. doi: 10.1021/cr4006704.

3. Congestive heart failure model in rabbits: effects of digoxin and a drug containing toad venom / S. Morishita, M. Shoji, Y. Oguni et al. // Jpn. J. Pharmacol., 1991. – Vol. 56, № 4. – P. 427-432. doi: 10.1254/jjp.56.427.

4. Skin secretion of the toad *Bombina variegata* contains multiple insulin-releasing peptides including bombesin and entirely novel insulinotropic structures / L. Marenah, P.R. Flatt, D. F. Orr et al. // Biol. Chem., 2004. – Vol. 385, №3-4. – P. 315-321. doi: 10.1515/BC.2004.027.

5. Shimizu Y. Effect of the water-soluble and non-dialyzable fraction isolated from Senso (Chan Su) on lymphocyte proliferation and natural killer activity in C3H mice / Y. Shimizu, E. Inoue, C. Ito // Biol. Pharm. Bull., 2004. – Vol. 27, №2. – P. 256-260. doi: 10.1248/bpb.27.256.

6. Barberio C. A low molecular weight protein with antimicrobial activity in the cutaneous 'venom' of the yellow-bellied toad (*Bombina variegata pachypus*) / C. Barberio, G. Delfino, G. Mastromei // Toxicon., 1987. – Vol. 25, №8. – P. 899-909.

7. Soravia E. Antimicrobial properties of peptides from Xenopus granular gland secretions / E. Soravia, G. Martini, M. Zasloff // FEBS Lett., 1988. – Vol. 228. – P. 337-342. doi: 10.1016/0014-5793(88)80027-9.

8. 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. – Vol. 19, №3. – P. 187-194.

9. Inactivation of frog virus 3 and channel catfish virus by esculentin-2P and ranaturin-2P, two antimicrobial peptides isolated from frog skin / V. G. Chinchar, J. Wang, G. Murti et al. // *Virology*, 2001. – Vol. 288, №2. – P. 351-357. doi: 10.1006/viro.2001.1080.
10. The primary structure of tryptophan containing peptides from skin extracts of *Phyllomedusa rhodei* (tryptophyllins) / P. C. Montecucchi, L. Gozzini, V. Erspamer, P. Melchiorri // *Int. J. Peptide. Res.*, 1984. – Vol. 24, №4. – P. 276-281. doi: 10.1111/j.1399-3011.1984.tb02720.x.
11. Amino acid composition and sequence of dermorphin, a novel opiate-like peptide from the skin of *Phyllomedusa sauvagei* / P. C. Montecucchi, R. de Castiglione, S. Piani et al. // *Int. J. Pept. Protein. Res.*, 1981. – Vol. 17, №3. – P. 275-283.
12. Toxic skin secretions of the spadefoot toad *Pelobates fuscus* / L. Lábler, H. Keilová, F. Sorm et al. // *Toxicon.*, 1968. – Vol. 5, №4. – P. 247-251.
13. Michl H. Chemie und biochemie der amphibiengifte / H. Michl, E. Kaiser // *Toxicon.*, 1963. – Vol. 1, №4. – P. 175-228.
14. Bradford M. M. A rapid and sensitive method 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.
15. Laemmli K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / K. Laemmli // *Nature*, 1970. – Vol. 227, № 5259. – P. 680-685.
16. Ostapchenko L. Enzyme electrophoresis method in analysis of active components of haemostasis system / L. Ostapchenko, O. Savchuk, N. Burlova-Vasilieva // *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 2011. – Vol. 2. – P. 20-26. doi:10.4236/abb.2011.21004.
17. The Hand book Collection. Gel filtration. Principles and methods // GE Healthcare, 2001. – P. 1093-1100.

Reference (Scopus):

1. Clarke B. T. The natural history of amphibian skin secretions, their normal functioning and potential medicinal applications. *Biol Rev* 1997;72(3):365-379. doi: 10.1111/j.1469-185X.1997.tb00018.x
2. Xu X., Lai R. The chemistry and biological activities of peptides from amphibian skin secretions. *Chemical Reviews*. 2015;115(4):1760-1846. doi: 10.1021/cr4006704.
3. Morishita S., Shoji M., Oguni Y., Ito C., Noguchi K., Sakanashi M. Congestive heart failure model in rabbits: effects of digoxin and a drug containing toad venom. *Jpn. J. Pharmacol.* 1991;56(4):427-432. doi: 10.1254/jip.56.427
4. Marenah L., Flatt P. R., Orr D. F., McClean S., Shaw C., Abdel-Wahab Y. H. Skin secretion of the toad *Bombina variegata* contains multiple insulin-releasing peptides including bombesin and entirely novel insulinotropic structures. *Biol Chem.* 2004;385(3-4):315-321. doi: 10.1515/BC.2004.027
5. Shimizu Y., Inoue E., Ito C. Effect of the water-soluble and non-dialyzable fraction isolated from Senso (Chan Su) on lymphocyte proliferation and natural killer activity in C3H mice. *Biol Pharm Bull.* 2004;27(2):256-260. doi: 10.1248/bpb.27.256

6. Barberio C., Delfino G., Mastromei G. A low molecular weight protein with antimicrobial activity in the cutaneous 'venom' of the yellow-bellied toad (*Bombina variegata pachypus*). *Toxicon.* 1987;25(8):899-909.
7. Soravia E., Martini G., Zasloff M. Antimicrobial properties of peptides from *Xenopus* granular gland secretions. *FEBS Lett.* 1988;228:337-342. doi: 10.1016/0014-5793(88)80027-9
8. 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(3):187-194.
9. Chinchar V. G., Wang J., Murti G., Carey C., Rollins-Smith L. Inactivation of frog virus 3 and channel catfish virus by esculentin-2P and ranaturin-2P, two antimicrobial peptides isolated from frog skin. *Virology*. 2001;288(2):351-7. doi: 10.1006/viro.2001.1080
10. Montecucchi P. C., Gozzini L., Erspamer V., Melchiorri P. The primary structure of tryptophan containing peptides from skin extracts of *Phyllomedusa rhodei* (tryptophyllins). *Int. J. Peptide. Res.* 1984;24(4):276-281. doi: 10.1111/j.1399-3011.1984.tb02720.x
11. Montecucchi P. C., de Castiglione R., Piani S., Gozzini L., Erspamer V. Amino acid composition and sequence of dermorphin, a novel opiate-like peptide from the skin of *Phyllomedusa sauvagei*. *Int. J. Pept. Protein. Res.* 1981;17(3):275-283.
12. Lábler L., Keilová H., Sorm F., Kornalík F., Stýblová Z. Toxic skin secretions of the spadefoot toad *Pelobates fuscus*. *Toxicon.* 1968;5(4):247-51.
13. Michl H., Kaiser E. Chemie und biochemie der amphibiengifte. *Toxicon.* 1963;1(4):175-228
14. Bradford M. A rapid and sensitive method for quantities of utilizing the principle of protein binding. *Analytical Biochemistry*. 1976;72(2):248-254.
15. Laemmli K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-685.
16. Ostapchenko L., Savchuk O., Burlova-Vasilieva N. Enzyme electrophoresis method in analysis of active components of haemostasis system. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. 2011;2:20-26. doi:10.4236/abb.2011.21004
17. The Hand book Collection. Gel filtration. Principles and methods. GE Healthcare. 2001;1093-1100.

Надійшла до редколегії 01.02.2019
Отримано виправлений варіант 04.03.2019
Підписано до друку 04.03.2019

Received in the editorial 01.02.2019
Received a revised version on 04.03.2019
Signed in the press on 04.03.2019

И. Удовиченко, асп., Д. Олейник, Ю. Дудкина, студ.,
Т. Галенова, канд. биол. наук, О. Савчук д-р биол. наук
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

АНАЛИЗ СЕКРЕТА КОЖНЫХ ЖЕЛЕЗ ЧЕСНОЧНИЦЫ ОБЫКНОВЕННОЙ (*PELOBATES FUSCUS*) НА ПРИСУТСТВИЕ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ЭФФЕКТОРОВ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА

Поскольку химический синтез новых биологически активных соединений в наше время является достаточно сложной и дорогостоящей процедурой, а цена на лекарственные средства, основу которых составляют дорогие синтетические биологически активные соединения, постоянно растет, то ученые все больше внимания обращают на природные источники как перспективное сырье для получения различных биологически активных веществ. Секреты железистых клеток кожных покровов амфибий являются мощным естественным фармакологическим агентом. На сегодня подробно изучены их антимикробное, противовирусное, кардиотоническое и противодиабетические действия, однако почти ничего не известно о влиянии секретов кожных желез бесхвостых земноводных на функционирование системы гемостаза. Проанализированы потенциальные эффекты компонентов секрета кожных желез одного из представителей отечественной батрахофауны – чесночницы обыкновенной (*Pelobates fuscus*) на отдельные параметры системы гемостаза. В результате хроматографического разделения общего секрета было получено 4 белковые фракции, содержащие широкий спектр белков с молекулярными массами в диапазоне от 17 до 150 кДа. Компоненты фракции 1 имели активирующий эффект на протромбин и фактор X плазмы. Несколько компонентов фракции 4 имели протеолитические свойства и выражали субстратную специфичность по отношению к коллагену. Компоненты фракций 1 и 2 удлиняли время свертывания плазмы в коагуляционном тесте АЧТВ. Доказано присутствие биологически активных компонентов в составе кожного секрета *P. fuscus*, что указывает на перспективность дальнейших исследований с целью идентификации отдельных составляющих, ответственных за проявление показанных эффектов для изучения структурно-функциональных особенностей и механизма их действия. Решение этих вопросов будет способствовать дальнейшему более широкому использованию секретов кожных желез земноводных как сырья для разработки новых оригинальных фармацевтических агентов и/или биотехнологических продуктов с целью их использования в медицине и различных сферах промышленности.

Ключевые слова: амфибии, секреты кожных желез, система гемостаза, хроматографическое разделение, протеолитическая активность, субстратная специфичность, хронометрические тесты.

I. Udovychenko, Ph. D. stud., D. Oliynyk, stud.,
J. Dudkina, stud., T. Halenova, Ph. D., O. Savchuk, Dr. Sci.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

ANALYSIS OF THE COMMON SPADEFOOT TOAD (*PELOBATES FUSCUS*) SKIN SECRETIONS ON THE PRESENCE OF THE POTENTIAL HEMOSTASIS SYSTEM EFFECTORS

Since nowadays the chemical synthesis of new bioactive compounds is a complicated and expensive procedure, alongside with the increased price for drugs based on synthetic biologically active compounds, scientists lay emphasis on natural sources as a promising raw material for various biologically active substances. Amphibian skin glands secretions are a powerful source of potential pharmacological agents. Currently their antimicrobial, antiviral, cardiotonic and antidiabetic activities have been studied in detail, although almost nothing is known about the effects

of the tailless amphibians' skin secretions on the functioning of the hemostasis system. The aim of this study was to analyze the potential effects of the components of skin glands secretions of a representative of Ukrainian batrachofauna – the Common spadefoot toad (*Pelobates fuscus*) on some parameters of hemostasis system. In the result of chromatographic separation of general skin secretions, 4 protein fractions were obtained, containing a variety of proteins with molecular masses ranging from 17 to 150 kDa. The components of fraction 1 activated prothrombin and factor X in plasma. Several components of fraction 4 had proteolytic activity and substrate specificity for collagen. The components of fractions 1 and 2 prolonged plasma coagulation time in the APTT. Thus, it was proved the presence of biologically active compounds in the *P. fuscus* skin secretions, that indicates the prospects for further research to identify the individual components responsible for the manifestation of the shown effects in order to provide clues in understanding the structural and functional characteristics and mechanism of action. Moreover, advances in this area will further increase the use of amphibian skin secretions as a raw material for the development of new original pharmaceutical agents and/or biotechnological products.

Key words: amphibians, skin glands secretions, hemostasis system, chromatographic separation, proteolytic activity, substrate specificity, plasma coagulation tests.

УДК 578.85/86

І. Пожилов, магістр 2-го року навч., Т. Руднєва, канд. біол. наук,
Т. Шевченко, канд. біол. наук, О. Шевченко, канд. біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна,
В. Цвігун, канд. біол. наук
Інститут агроєкології і природокористування НААН України, Київ, Україна

ФІЛОГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ ГЕНА КАПСИДНОГО БІЛКА ІЗОЛЯТІВ ВІРУСУ МОЗАЇКИ ТОМАТУ, ЩО ЦИРКУЛЮЮТЬ В УКРАЇНІ

Вірус мозаїки томатів (ВМТо) викликає контагіозні захворювання овочевих культур, а у випадку контамінації насіння і повну втрату врожаю. Метою роботи було встановлення філогенетичної спорідненості українських ізолятів ВМТо, виділених з рослин томатів, з відомими ізолятами шляхом порівняння гена капсидного білка. Методи: ІФА, електронна мікроскопія, ЗТ-ПЛР, аналіз нуклеотидного секвенсу за допомогою програми MEGA 5. Секвеновані нуклеотидні послідовності капсидного білка двох нових українських ізолятів ToMV-ukr-5 і ToMV-ukr-10 були порівнянні між собою та з відомими ізолятами ВМТо. Побудова філогенетичного дерева дозволила об'єднати досліджувані штами та ізоляти ToMV у два окремі кластери. Ізоляти ToMV-ukr-5 та ToMV-ukr-10 увійшли до першого кластера разом з ще 28 досліджуваними ізолятами, відсоток гомології у яких з українськими ізолятами становив 96-98,9 %. У межах першого кластера чітко виділяються два субкластери: до першого входять ізоляти, відсоток гомології яких з українськими ізолятами становить більше 96,7 %, а до другого – три штами та ізоляти з відсотком гомології 96,1 % відносно українських ізолятів: ізолят SL-1, штам *satellia* та ізолят *Dahlemense* DSMZ PV-0135. Два ізоляти вірусу мозаїки томатів ToMV-ukr-5 і ToMV-ukr-10 були виділені з рослин томатів відкритого ґрунту різних регіонів України. У філогенетичному аналізі показано високу спорідненість українських ізолятів між собою і з уже відомими штамами та ізолятами цього вірусу за геном капсидного білка. Найбільш високий відсоток гомології (>98 %) українські ізоляти мали з бразильським ізолятом *Heterocallis*, китайським ізолятом G2 та томатними ізолятами AH4, *Queensland*, ToMV-tom і *Is-K*, S14 та FERA_160205. Гомологія ізолятів простежувалась незалежно від джерела виділення вірусу, виду рослини-хазяїна та їх географічного поширення.

Ключові слова: вірус мозаїки томату, рослини томату, філогенетичний аналіз, ізоляти, секвенування, українські ізоляти ВМТо.

Вступ. На сьогодні вірус мозаїки томатів (ВМТо), що належить до роду *Tobamovirus* родини *Virgaviridae* знайдено практично в усіх кутках земної кулі. Його ідентифікують в тепличних і польових умовах на багатьох видах рослин на всіх континентах, окрім Антарктиди [10]. Вірус мозаїки томатів здатен уражувати не лише покритонасінні, а і голонасінні рослини, його у великій кількості виділяють з льодовикової та річкової води [6]. Однак найбільш часто ВМТо детектують на рослинах з родини пасльонових і її найтипівіших представниках: томатах, перці, баклажанах, картоплі [10]. Симптоми проявляються на будь-якій стадії росту рослини, як на вегетативних, так і на генеративних органах.

Вірус мозаїки томатів спричиняє серйозні висококонтагіозні захворювання овочевих культур, а якщо рослини розвиваються з вірусінфікованого насіння, то може призвести і до повної втрати врожаю. Подібно до вірусу мозаїки тютюну, ВМТо здатний протягом багатьох років зберігатися в ґрунті і залишках рослинного матеріалу, він ефективно передається насінням, через контакт рослин, робочий інвентар, а також з допомогою дрібних тварин та птахів у процесі їх харчування [10].

Зважаючи на високу контагіозність та убиквітарність ВМТо, дослідження його в агроценозах України наразі є дуже актуальним. До того ж, на сьогодні немає жодної інформації стосовно штамового різноманіття ВМТо в умовах України, таким чином було цікаво порівняти українські ізоляти вірусу мозаїки томатів з уже відомими штамами і ізолятами цього вірусу. Протягом останніх років ми детектували ВМТо виключно в умовах відкрито-

того ґрунту на рослинах томатів, перцю та баклажанів. В основному це була моноінфекція, однак траплялася і змішана інфекція з Y-вірусом картоплі [3, 4].

В агроценозах України, при ураженні ВМТо, на вірусінфікованих рослинах перцю розвивалися симптоми жовтої кільцевої мозаїки та жовто-зеленої листкової мозаїки, плоди при цьому деформувалися; рослини баклажанів демонстрували системну некротичну реакцію, а на листі томатів розвивалася темно-зелена і жовто-зелена мозаїка, а також спостерігалася деформація листкової пластинки з засиханням країв листка та скручуванням листкової пластинки. На плодах томатів спостерігалися світлі плями у вигляді кілець [3,4].

У наших попередніх дослідженнях велику увагу було приділено перевірці комерційного насіння овочевих культур на наявність антигенів ВМТо. Імуноферментним методом було проаналізовано різні сорти насіння томатів, перцю овочового і баклажанів та виявлено значний відсоток вірусконтамінованого насіння [4]. Таким чином, доцільно припустити, що вірусінфіковане комерційне насіння може бути однією з причин появи і розповсюдження ВМТо в агроценозах України. Більш того, з вірусінфікованого насіння було виділено ізолят ВМТо (ToMV-ukr3) та депонувано його послідовність гена капсидного білка до Ген Банку [5].

Зважаючи на вищесказане та враховуючи результати наших попередніх досліджень, метою роботи було встановлення філогенетичної спорідненості українських ізолятів ВМТо, виділених з рослин томатів, з відомими

штамами та ізолятами ВМТо, шляхом порівняння нуклеотидної послідовності гена капсидного білка віріона.

Матеріали і методи. Рослинні зразки відбирали з відкритого ґрунту шляхом візуального обстеження рослин на наявність вірусних симптомів. Для досліджень використовували листки середнього або верхнього ярусу та плоди рослин [2].

Зразки на наявність вірусних антигенів аналізували імуноферментним аналізом (ІФА) у модифікації "сендвіч". Аналіз проводили у полістиролових планшетах "Labsystem". Результати реєстрували на рідері Thermo Labsystems Opsis MR (США) із програмним забезпеченням Dynex Revelation Quicklink при довжинах хвиль 405/630 нм [1, 7].

Рослинні зразки (вегетативні органи і плоди рослин) для ІФА готували шляхом гомогенізації інфікованого рослинного матеріалу у 0,1 М фосфатно-солевому буфері з додаванням 0,001М ЕДТА у співвідношенні 1:2 з наступним центрифугуванням у режимі 4000 об/хв протягом 20 хв при 4°C на центрифугі PC-6 [8]. Отриманий гомогенат використовували для імуноферментного аналізу.

При постановці ІФА використовували тест-систему до вірусу мозаїки томату виробництва Loewe (Німеччина). Аналіз проводили згідно з рекомендаціями виробника. Для виділення тотальної РНК використовували рослини томатів з агроценозів Полтавської та Черкаської областей, які в ІФА позитивно реагували з тест-системою до вірусу мозаїки томату. Виділення тотальної РНК зі зразків здійснювали за допомогою кіта RNeasy Plant Mini kit (Qiagen, Великобританія). Аналіз проводили згідно з рекомендаціями виробника [12]. Виділення тотальної РНК контролювали за допомогою електрофорезу нуклеїнових кислот у 1,5 % агарозному гелі.

Для проведення зворотнотранскрипційної полімеразної ланцюгової реакції (ЗТ-ПЛР) було використано специфічні праймери до ділянки РНК, яка кодує капсидний білок вірусу мозаїки томату

forward primer – CGGAAGGCCTAAACCAAAAG;
Tob-Uni1 primer – ATTTAAGTGGAGGGAAAAACACT.

Дані праймери ампліфікують фрагмент розміром 700 п.о., який відповідає гена капсидного білка вірусу [11]. Візуалізацію результатів ПЛР здійснювали за допомогою горизонтального електрофорезу у 1,5 % агарозному гелі, використовуючи стандартний набір маркерів HyperLadder™ 50bp (Bioline) (<https://www.bioline.com/sg/hyperladder-50bp.html>) [8]. Продукти ампліфікації (кДНК) виділяли з гелю і очищали за допомогою Gel Using Mini Elute Columns (Qiagen, Великобританія).

Сиквенування очищених ампліфікованих фрагментів проводили на аналізаторі Applied Biosystems 3730x1 DNA Analyzer з використанням Big Dye terminators, version 3.1 (Applied Biosystems, USA).

Філогенетичну спорідненість українських ізолятів вірусу мозаїки томату ToMV-ukr-5 і ToMV-ukr-10 між собою та з відомими штамми і ізолятами вірусу мозаїки томату встановлювали шляхом порівняння ділянки нуклеотидного сиквенсу, що відповідає гену капсидного білка вірусу. Послідовності штамів та ізолятів вірусу мозаїки томату було взято з Генбанку. Нами було проаналізовано 30 ізолятів з Генбанку (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (табл. 1).

Аналіз нуклеотидного сиквенсу проводили за допомогою програми MEGA 5 [13]. Для вирівнювання нуклеотидних послідовностей використовували метод CLUSTAL W. Побудову філогенетичних дерев ізолятів проводили за допомогою програми MEGA 5, використовуючи метод Maximum Likelihood на основі моделі Tamura-Nei [13]. Для перевірки достовірності дерев застосовували бутстреп аналіз (1000 реплікацій) [9].

Результати та обговорення. За результатами імуноферментного аналізу, у 2017 р. вірус мозаїки томатів було детектовано на рослинах томатів у агроценозах Полтавської та Черкаської областей. Вірусифіковані рослини демонстрували симптоми жовто-зеленої мозаїки та скручування листової пластинки. На плодах томатів, уражених ВМТо, спостерігалися світлі кільцеподібні плями (рис. 1).



Рис. 1. Скручування листової пластинки та жовто-зелена мозаїка листової пластинки рослин томатів (а), а також світлі кільцеподібні плями на плодах томату, індуковані вірусом мозаїки томату (б)

Результати імуноферментного аналізу було підтверджено результатами електронної мікроскопії. У полі зору мікроскопа спостерігались паличкоподібні віріони

розміром 300x15 нм, що за морфологічними параметрами були подібними до вірусу мозаїки томатів.

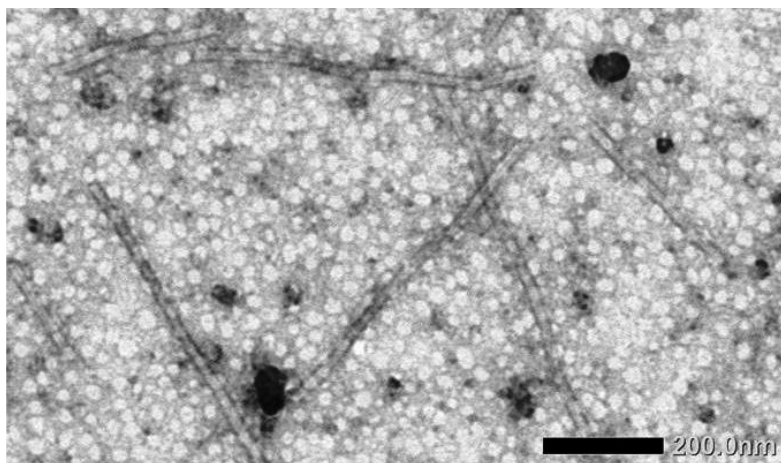


Рис. 2. Електронно-мікроскопічне зображення українського ізоляту вірусу мозаїки томатів (інструментальне збільшення $\times 200000$)

Для виділення тотальної РНК використовували рослини томатів з вищеписаними симптомами з агроценозів Полтавської і Черкаської областей. Ізолят ToMV-ukr-5 було виділено з рослин томатів відкритого ґрунту Черкаської області, а ізолят ToMV-ukr-10 – з Полтавської області. Після візуалізації тотальної РНК проводили

зворотнотранскрипційну полімеразну ланцюгову реакцію (ЗТ–ПЛР). У результаті проведення ЗТ–ПЛР було отримано продукти ампліфікації розміром 700 п.о., що відповідає за розміром ділянці геному, яка кодує капсидний білок вірусу (рис. 3).

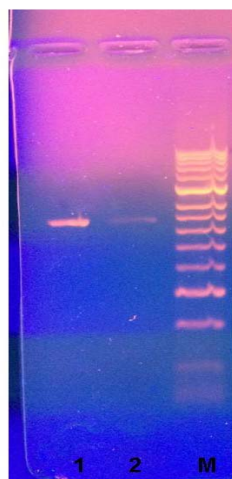


Рис. 3. Електрофореграма отриманих продуктів кДНК українських ізолятів вірусу мозаїки томату:
М – маркер молекулярних мас HyperLadder™ 50bp (Bioline);
1 – кДНК капсидного білка ізоляту ToMV-ukr-5; 2 – кДНК капсидного білка ізоляту ToMV-ukr-10, 700 п.о.

Після сиквенування кДНК українських ізолятів вірусу мозаїки томату проводили порівняння сиквенованих нуклеотидних послідовностей капсидного білка українських ізолятів ToMV-ukr-5 і ToMV-ukr-10 між собою та з такими ж відомих штамів і ізолятів ВМТо. Послідовності штамів та ізолятів ВМТо було взято з Генбанку

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Штами та ізоляти з Генбанку ми відбирали таким чином, щоб охопити, за можливості, всі країни та всі види рослин, на яких було виявлено вірус мозаїки томатів. Нами було проаналізовано 10 штамів та 20 ізолятів з Генбанку (табл. 1).

Таблиця 1. Штами і ізоляти ВМТо з Генбанку, які використовували у філогенетичному аналізі

Назва штам/ ізоляту	Регістраційний номер послідовності	Джерело виділення	Країна
Ізолят G2	JX025566	Gomphrena globosa	Китай
Ізолят T1	JX025564	Lycopersicon esculentum	Китай
Ізолят P2	JX025563	Solanum muricatum	Китай
Ізолят SL-1	KY912162	tomato	Словакія
Штам camellia	AJ417701	camellia	Китай
Ізолят mutoko	KX711903	Solanum lycopersicum	Зімбабве
Ізолят Hemerocallis	DQ230836	Hemerocallis	Бразилія
Ізолят ukr3	KP861861	tomato seeds	Україна

Продовження табл. 1

Назва штаму/ ізоляту	Регістраційний номер послідовності	Джерело виділення	Країна
Ізолят 99-1	KR537870	<i>Jasminum multiflorum</i>	США, Флорида
Ізолят Penghu	KJ207374	<i>Solanum muricatum</i>	Тайвань
Ізолят Kh-C239	KC914400	<i>Cucumis sativus</i>	Іран
Ізолят Sm-T107	KC914397	<i>Solanum lycopersicum</i>	Іран
Ізолят Ham.Tom.19	JX112025	tomato	Іран
Ізолят Queensland	NC_002692	<i>Lycopersicon esculentum</i> cv. Grosse Lisse	Австралія
Ізолят S14	JF810437	tomato	Іспанія
Ізолят Ls-K	HM623426	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Південна Корея
Ізолят ToMV-tom	EU885417	tomato	Південна Корея
Штам L11Y	AB355139	Tobacco plant	Японія
Штам ToMV1-2	DQ873692		
Штам FERA_160205	KY810788	<i>Solanum lycopersicum</i>	Великобританія
Ізолят SN SLM 1	KX424990	<i>Solanum nigrum</i>	Індія
Ізолят AH4	KU321698	tomato	Єгипет
Ізолят Palmira	JX101616	<i>Solanum lycopersicum</i> variedad cerasiforme	Колумбія
Штам Kazakh strain K1	AJ243571		Казахстан
Ізолят Dahlemense DSMZ PV-0135	AJ429084		Німеччина
Штам TOMV-M	AF067236	tomato	Малайзія
Штам IV1150-2B1097	AF067238	glacial ice melt water	Гренландія
Штам TOMV-46	AF067241	lake water	США, гірський хребет Катамаунт
Штам TOMV-38	AF067234	stream water	США, гора Вайтфейс
Штам TOMV-RS	AF067230	Red Spruce	США, гірський хребет Адіорондак

Побудова комплексного (консенсусного) філогенетичного дерева дозволила об'єднати досліджувані штами і ізоляти ToMV у два окремі кластери. До першого, найбільш багаточисельного кластера, увійшли майже всі досліджувані штами та ізоляти вірусу, а до другого – лише два представники вірусу мозаїки томату – ізолят T1 та ізолят Ham.Tom.19, які з українськими ізолятами були гомологічними на 79,4 %. Обидва ізоляти було виділено з рослин томату: T1 – в Китаї, а Ham.Tom.19 в Ірані (рис.4).

Досліджувані українські ізоляти ToMV-ukr-5 та ToMV-ukr-10 були гомологічними на 100 % та увійшли до першого кластера. Окрім двох українських ізолятів сюди увійшли ще 28 досліджуваних штамів та ізолятів, відсоток гомології у яких з українськими ізолятами становив від 96 до 98,9 %.

У межах першого кластера чітко виділяються два субкластера. До першого субкластера входять штами та ізоляти, у яких відсоток гомології з українськими ізолятами становить більше 96,7 %, а до другого – три штами та ізоляти з відсотком гомології 96,1 щодо українських ізолятів. Це словацький ізолят SL-1, виділений з рослин томатів, китайський штам *camellia*, виділений із декоративної рослини камелії та германський ізолят *Dahlemense* DSMZ PV-0135.

Як показали результати філогенетичного аналізу, українські ізоляти ToMV-ukr-5 та ToMV-ukr-10, виділені з рослин томату, мали дуже високу (більше 98,4 %) гомологію зі штамми та ізолятами вірусу мозаїки томату, виділеного з рослин не лише томатів, але і пепіно, і навіть декоративних рослин, що належать до різних родин. Дуже цікавим є факт, що українські ізоляти є високोगомологічними до бразильського ізоляту *Neurocalis*, виділеного з декоративної рослини лілійника родини Ксанторієвих, або китайського ізоляту G2, виділеного з рослини *Gomphrena globosa* родини Амарантових. Також слід згадати про ізоляти вірусу, ізольовані з рослин томатів, які мали саму різноманітну географічну локацію: єгипетський AH4, австралійський Queensland, південно-кореєцький ToMV-tom та Ls-K, іспанський S14 та великобританський штам FERA_160205.

Дещо менший відсоток гомології, від 97,2 до 97,8 %, в українських ізолятів був з уже дослідженим українським ізолятом ukr-3, ізольованим нами раніше з насіння томату, томатними ізолятами Palmira з Колумбії, mutoko з Зімбабве, Sm-T107 з Ірану та штамом TOMV-M з Малайзії. Поряд з цим прослідковувалась висока спорідненість з японським штамом з тютюну (L11Y), індійським (SN SLM 1) та тайванським (Penghu) ізолятами з пасльону, і навіть іранським ізолятом з огірків. Дуже цікаво, що українські ізоляти були близькоспорідненими зі штамом IV1150-2B1097, ізольованим дослідниками з талої льодовикової води у Гренландії, а також з ізолятом 99-1, виділеним з рослини жасмину у Сполучених Штатах Америки.

І нарешті, відсоток гомології в межах від 96,1 до 96,7 % українські ізоляти мали зі штамми з США, ізольованими з водного середовища у штаті Нью-Йорк: TOMV-38 – зі струмка на горі Вайтфейс та TOMV-46 – озера на горі Катамаунт, а також зі штамом TOMV-RS, виділеним з ялини червоної (родина Соснові), що належать до голонасінних рослин. Штами із США, виділені із нетипових джерел, разом з малайзійським томатним штамом TOMV-M та японським тютюновим штамом L11Y формують окремий невеликий субсубкластер у межах першого субкластера.

Аналізуючи отримані результати, можна стверджувати про дуже високу гомологію українських ізолятів з відомими штамми і ізолятами вірусу мозаїки томатів. Причому, висока, а це більше 96 % гомологія, прослідковується незалежно від джерела виділення вірусу чи виду рослини-хазяя, а тим паче їх географічного поширення. Як бачимо, вірус мозаїки томату може легко долати міжвидові бар'єри, уражуючи як овочеві, так і декоративні рослини. Більш того, маючи за природного хазяя пасльонові культури, вірус мозаїки томату легко уражує хвойні рослини. Його у великій кількості виділяють з талої льодовикової, струмкової та озерної води. Все це вказує на убіквітарні властивості вірусу.

Прослідкувати шляхи потрапляння в Україну вірусу мозаїки томату і встановити джерело інфекції наразі дуже важко. Дослідження та аналіз філогенетичних де-

рев, на жаль, не можуть надати вичерпної інформації з цього приводу. На сьогодні ареал вірусу значно розширився і його детектують у багатьох країнах світу на всіх континентах, окрім Антарктиди.

Що стосується України, то протягом останніх років ми виявляли вірус мозаїки томатів у агроценозах відкритого ґрунту на культурах томату, перцю овочевого та

баклажанів. У тепличних же умовах на території України даний вірус не зустрічався. Враховуючи той факт, що на ринку України наявне насіння, контаміноване вірусом мозаїки томатів, можна припустити, що саме в такий спосіб даний вірус поширюється в агроценозах країни і не виключено, що разом з інфікованим насінням вірус мозаїки томатів був завезений в Україну.

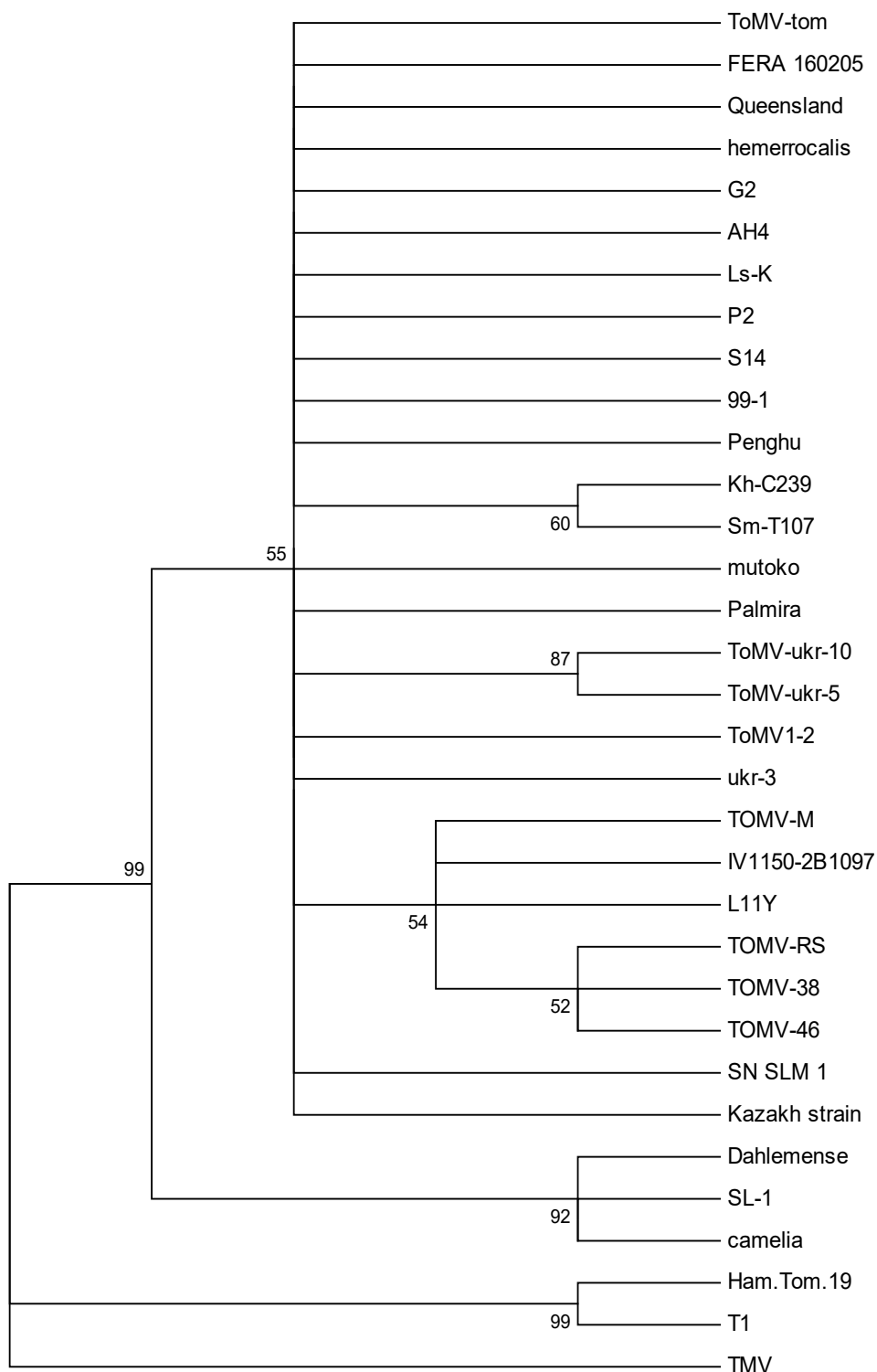


Рис. 4. Комплексне (консенсусне) філогенетичне дерево побудоване за результатами аналізу нуклеотидних послідовностей гена капсидного білка штамів та ізолятів ВМТо методом Maximum Likelihood на основі моделі Tamura-Nei, 1000 бутстреп реплікацій. Числа показують відсоток бутстрепа. Величини бутстрепа більші, ніж 50 %, показано у вузлах дерева, менші 50 % – конденсовано. Як корінь філограми використано китайський ізолят Bijie-2 (HE818414) вірусу тютюнової мозаїки (*Tobacco mosaic virus*, TMV)

Висновки. Два нових ізоляти вірусу мозаїки томатів: ToMV-ukr-5 і ToMV-ukr-10 було виділено з рослин томатів відкритого ґрунту різних регіонів України. У філогенетичному аналізі було показано високу спорідненість за геном капсидного білка українських ізолятів між собою та з уже відомими штамми та ізолятами цього вірусу. Найбільш високий відсоток гомології, більше 98 %, українські ізоляти мали з бразильським ізолятом *Негероскаліс*, виділеним з декоративної рослини лілійника родини Ксанторієвих, китайським ізолятом G2, виділеним з рослини *Gomphrena globosa* родини Амарантових та томатними ізолятами: єгипетським AN4, австралійським Queensland, південно-корейськими ToMV-tom і Ls-K, іспанським S14 та великобританським штамом FERA_160205. 28 із 30-ти проаналізованих штамів та ізолятів ВМТО були більше ніж на 96 % гомологічними з українськими ізолятами, причому така гомологія прослідковувалась незалежно від джерела виділення вірусу, виду рослини-хазяя та їх географічного поширення.

Список використаних джерел:

1. Гнута Р.В. Серология и иммунохимия вирусов растений / Раиса Васильевна Гнута. – М.: Наука, 1993. – 301 с.
2. Омелюта В.П. Облік шкідників і хвороб сільськогосподарських культур / В.П. Омелюта, І.В. Григорович, В.С. Чабан. – К.: Урожай, 1986. – 296 с.
3. Вірусні хвороби томатів в Україні: діагностика та методи боротьби: метод. рекомендації. / Т.О. Руднева, Т.П. Шевченко, В.П. Поліщук, А.Л. Бойко. – Київ: ЦОП "Глобус", 2012. – 23 с.
4. Віруси перцю солодконого у агроценозах України та насінневого матеріалу / Т.О. Руднева, Т.П. Шевченко, В.О. Цвігун та ін. // Мікробіологія і біотехнологія, 2012. – №4. – С. 29–35.
5. Phylogenetic analysis of Tomato mosaic virus isolated from seeds of *Lycopersicon esculentum* L. / E. AlDalain, A. Bysov, T. Shevchenko та ін. / наук. доповіді НУБІП України, 2 (51). [Електронний ресурс], 2015. – №2. – С. 1–7.
6. Detection of tomato mosaic tobamovirus RNA in ancient glacial ice / J. Castello, S. Rogers, W. Starmer, C. Catranis // Polar. biol., 1999. – №22. – С. 207–212.
7. Crowther J.R. (Ed.) ELISA. Theory and practice / J.R. Crowther. – N.Y.: Humana Press, 1995. – P. 223.
8. Dijkstra J. Practical Plant Virology: Protocols And Exercises / J. Dijkstra, P. Ceas de Jager. – Berlin: – Springer Verlag and Heidelberg GmbH & Co, 1998. – P. 459.
9. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap / Joseph Felsenstein // Evolution, 1985. – №39. – С. 783–791.
10. 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.

11. Detection and differentiation of serologically cross-reacting tobamoviruses of economical importance by RT-PCR and RT-PCR-RFLP / B. Letschert, G. Adam, D.-E. Lesemann et al. // J. of Virological Methods, 2002. – Vol. 106. – P. 1–10.
12. QIAGEN. One step RT-PCR Kit. Handbook, 2002. – 39 с.
13. Tamura K. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees / K. Tamura, M. Nei // Molecular Biology and Evolution, 1993. – Vol. 10 – P. 512–526.

References (Scopus):

1. Gnutowa R [Serology and immunochemistry of plant viruses]. Moscow: Nauka; 1993. Russian.
2. Omeljuta V., Grygorovych I., Chaban V. Accounting of pests and diseases of agricultural crops. Kyiv: Urozhay; 1986. Ukrainian.
3. Rudnieva T., Shevchenko T., Polishchuk V., Boyko A. [Viral diseases of tomatoes in Ukraine: diagnostics and methods of struggle: Methodical recommendations]. Kyiv: "Globus"; 2012. Ukrainian.
4. Rudnieva T., Shevchenko T., Tsvigun V., Shamraichuk V., Bysov A., Polishchuk V. Viruses of sweet pepper at agroecosis of Ukraine and seed material. Microbiology and Biotechnology. 2013; 4(20), 29 – 35. Ukrainian. doi: 10.18524/2307-4663.2012.4(20).90441
5. AlDalain E., Bondar O., Tymchyshyn O., Shevchenko T., Budzanivska I., Polishchuk V. Phylogenetic analysis of Tomato mosaic virus isolated from seeds of *Lycopersicon esculentum* L. Scientific reports of NULES of Ukraine, 2015-2 (51). http://nd.nubip.edu.ua/2015_2/12e.pdf
6. Castello J., Rogers S., Starmer W., Catranis C. Detection of tomato mosaic tobamovirus RNA in ancient glacial ice. Polar biol. 1999;22:207 – 212.
7. Crowther J. ELISA. Theory and practice. New York: Humana Press; 1995.
8. Dijkstra J., De Jager Cees P. Practical Plant Virology: Protocols And Exercises. Berlin: Springer Publisher, Verlag and Heidelberg GmbH & Co; 1998.
9. Felsenstein J., Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution. 1985; 39:783–791
10. 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.
11. Letschert B., Adam G., Lesemann D.-E. Detection and differentiation of serologically cross-reacting tobamoviruses of economical importance by RT-PCR and RT-PCR-RFLP. Journal of Virological Methods. 2002; 106:1–10.
12. QIAGEN. One step RT-PCR Kit Handbook. Quiagen; Oct., 2012: 39 p.
13. Tamura K. Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. Molecular Biology and Evolution. 1993;10: 512–526.

Надійшла до редколегії 01.02.2019

Отримано виправлений варіант 04.03.2019

Підписано до друку 04.03.2019

Received in the editorial 01.02.2019

Received a revised version on 04.03.2019

Signed in the press on 04.03.2019

И. Пожилов, магистр 2-го года обуч., Т. Руднева, канд. биол. наук, Т. Шевченко, канд. биол. наук, А. Шевченко, канд. биол. наук
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина,
В. Цвигун, канд. биол. наук
Институт агроэкологии и природопользования НААН Украины, Киев, Украина

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ГЕНА КАПСИДНОГО БЕЛКА ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА МОЗАИКИ ТОМАТА, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В УКРАИНЕ

Вирус мозаики томатов (ВМТО) вызывает контагиозные заболевания овощных культур, а при контаминации семян и полную потерю урожая. Целью данной работы было изучение филогенетического родства украинских изолятов ВМТО, выделенных из растений томата, с другими известными изолятами ВМТО путем сравнения нуклеотидной последовательности гена капсидного белка вируса. Методы: ИФА, электронная микроскопия, ОТ-ПЦР, анализ нуклеотидных последовательностей с помощью программного пакета MEGA 5, статистические методы. КДНК двух новых украинских изолятов ToMV-ukr-5 и ToMV-ukr-, соответствующие гену капсидного белка, были секвенированы, после чего их сравнивали между собой и с другими известными изолятами ВМТО. Построение филогенетического дерева позволило объединить исследуемые изоляты ВМТО в два отдельных кластера. Вместе с новыми украинскими изолятами ToMV-ukr-5 и ToMV-ukr-10 к первому кластеру отнесены еще 28 исследуемых изолятов, на 96-98,9 % идентичные украинским. В пределах первого кластера четко выделялись два субкластера: в первый вошли изоляты, гомологичные украинским более чем на 96,7 %; а во второй – три изолята с уровнем гомологии 96,1 % (томатный изолят SL-1, штамм *satellia* и изолят *Dahlemense DSMZ PV-0135*). Выводы: Два новых украинских изолята ToMV-ukr-5 и ToMV-ukr-10 были выделены из томата в условиях открытого грунта в разных регионах Украины. Филогенетический анализ подтвердил высокое родство украинских изолятов между собой, а также с другими изолятами этого вируса. Украинские изоляты ToMV-ukr-5 и ToMV-ukr-10 наиболее подобны (> 98 %) бразильскому изоляту *Негероскаліс*, китайскому изоляту G2 и следующим томатным изолятам: AN4, Queensland, ToMV-tom и Ls-K, S14 и FERA_160205. Высокий уровень гомологии исследуемых изолятов не зависит от источника вируса, растения-хозяина и их географического распространения.

Ключевые слова: вирус мозаики томата, растения томата, филогенетический анализ, изоляты, секвенирование, украинские изоляты ВМТО.

I. Pozhylov, Master of 2 years, T. Rudnieva, Ph. D.,
T. Shevchenko, Ph. D., O. Shevchenko, Ph. D.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine
V. Tsvigun, Ph. D.
Institute of agroecology and nature management of NAAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

PHYLOGENETIC ANALYSIS OF COAT PROTEIN GENE OF TOMATO MOSAIC VIRUS ISOLATES CIRCULATING IN UKRAINE

Tomato mosaic virus (ToMV) induces highly infectious disease of vegetables, whereas use of virus-contaminated seed may lead to complete yield loss. This work was aimed at studying phylogenetic relationships of Ukrainian tomato isolates of ToMV with its known isolates by comparing nucleotide sequence of coat protein gene. ELISA, TEM, RT-PCR, sequence analysis using MEGA 5 software, and statistical methods. cDNAs of two novel Ukrainian isolates ToMV-ukr-5 and ToMV-ukr-10 corresponding to coat protein (CP) gene were sequenced and compared with other published ToMV sequences. On the constructed phylogenetic tree, ToMV isolates were grouped into two separate clusters. In addition to novel Ukrainian isolates ToMV-ukr-5 and ToMV-ukr-10, the first and larger cluster contained nearly all virus isolates used in this study with high (96-98,9 %) level of homology to Ukrainian isolates. The larger cluster was clearly separated into two subclusters: one grouping isolates with over 96,7 % identity with Ukrainian isolates, and the other containing three strains and isolates with 96,1 % identity (tomato isolate SL-1, strain camellia isolated from a decorative plant, and isolate Dahlemense DSMZ PV-0135). Two novel Ukrainian isolates ToMV-ukr-5 and ToMV-ukr-10 have been isolated from tomato plants cultivated in open field conditions in different regions of Ukraine. Phylogenetic analysis confirmed high identity of Ukrainian isolates between themselves and with other published ToMV sequences. Ukrainian isolates were most homologous (>98 %) to Brazilian isolate Hemerocallis, to Chinese isolate G2, and to the following tomato isolates: AH4, Queensland, ToMV-tom and Ls-K, S14, and FERA_160205. The high level of homology was traced independently of the source of virus isolation, its plant host and their geography.

Key words: Tomato mosaic virus, tomato plants, phylogenetic analysis, isolates, sequencing, Ukrainian ToMV isolates.

УДК 579.64/579.842.1/.2+578.811/578.32

N. Korniienko, Ph. D. stud., E. Dukhno, stud.,
A. Kharina, Ph. D., I. Budzanivska, Dr. Sci.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

ISOLATION OF BACTERIOPHAGES WITH LYTIC ACTIVITY AGAINST A NEWLY IDENTIFIED *PANTOEA AGGLOMERANS*

*In a consequence of agricultural human activity, a set of phytopathogenic bacteria gain new properties and ability to cause diseases in animal and human organisms. Moreover, bacterial loss of sensitivity to antibiotics becomes more increasing threat. The most effective alternative method of processing of plants are bacteriophages. The aim of this work is isolation and identification of a vegetable enterobacteria and search of its specific bacteriophages. Methods: biochemical identification of bacteria, analysis on sensitivity to antibiotics by means of disks, titration and accumulation of virus, electronic microscopy. Results: from onions samples with symptoms of a bacteriosis several bacteria were isolated. One of them was identified as *Pantoea agglomerans*. The sensitivity of this isolate to antibiotics was investigated, the resistance to cefalexin and norfloxacin is revealed. The bacteriophage specific to this bacteria is isolated from waste waters. The morphology of a bacteriophage is investigated by means of electronic microscopy, the virus belongs to the Myoviridae family. Phytopathogenic properties of bacteria and the antibacterial activity of phage isolate were investigated on potatoes in vitro. *P. agglomerans* led to development of a bacteriosis on potatoes cubes, and the isolated bacteriophage successfully inhibited its growth. Conclusions: This study demonstrated that common vegetables such as onions could be a source of human pathogenic bacteria. In this work, we isolated *P. agglomerans*, member of family Enterobacteriaceae. Taking into account that this bacteria was unsensitive to some antibiotics, it can be regarded as an alarming sign. The use of bacteriophages could solve problems of antimicrobial resistance and protecting of crops from bacterial infections. Isolated bacteriophage from waste waters inhibited growth of *P. agglomerans* in vitro showing that it could be considered as a part of phage drugs.*

Key words: *Pantoea agglomerans*, onion, phage therapy, bacteriophages.

Introduction. *Pantoea agglomerans* (known also as *Erwinia herbicola*) is a gram-negative aerobic bacteria from the family Enterobacteriaceae. Species from the genus *Pantoea* are mostly plant pathogens, they can be isolated from biological waste, plants, and soil (1). There they can act as pathogens as well as commensals (15). *P. agglomerans* is one of the genus species that mostly isolated from human feces, urine and blood. Moreover, it is one of common causes of nosocomial infections (3, 4). Wound infections with *P. agglomerans* usually caused by follow piercing of skin with a plant infected material (11, 21). In hospital conditions, exogenous infection with *P. agglomerans* mostly results in septic arthritis or synovitis, but there are also reports about endophthalmitis, periostitis, endocarditis and osteomyelitis (19). Immunodeficient individuals are the most vulnerable to those infections, especially if contaminated medical equipment is used (18). Fatal cases of nosocomial septicemia have been described in several countries, both in adults and children (2, 6, 14). Even though *P. agglomerans* has a quite good susceptibility to a list of antimicrobials (13), it has a potential to develop resistance to those medicines in near future like other common human pathogens from Enterobacteriaceae.

Antimicrobial resistance became a big threat in recent decades. Members of family Enterobacteriaceae, *Staphy-*

lococcus sp. and *Streptococcus sp.* became unsusceptible to many antibiotics we used to (9, 10). To defeat these multiresistant pathogens, physicians use chemicals and medicines with numerous side effects that also have influence on human organism and especially microflora (22). As a number of resistant microorganisms increases every year, more scientists start to work with bacteriophages. Bacteriophages (viruses of bacteria) are the only alternative to antimicrobials as they are biologically safe and highly specific. In contrast with antimicrobials, phages persist in human organism until the last bacterial cell's death. Furthermore, phages don't interact with other bacteria in the gut and have not side effects that makes them more safe than antibiotics (12). Some phages are so-called polyvalent phages that are able to infect bacterial strains from different species and genera. Many enterobacteria phages are polyvalent that is very important for developing phage-based drugs (7, 20). Taking into account that bacteria can develop resistance to phages as well as to drugs, phage polyvalence helps to solve this problem.

For *P. agglomerans*, phage therapy can be used in different aspects, such as reduction of bacterial residues on fruits or vegetables, sanitation of appliances used in agriculture, or use as an alternative for antibiotics in human disease control. Aim of our work was to isolate and identify an *Enter-*

obacteriaceae member from onions with bacterial rot as well as to find bacteriophages active against this bacteria.

Materials and methods. The content of brown rot from onions was placed on LB growth medium (gms/l: tryptone – 10, yeast extract – 5, NaCl – 10, agar – 10, pH=7,5). Bacterial cells were stained according to Gram and examined on magnification x100 (MICROmed XS-4130). Type of respiration was established after tests on cytochromoxidase with Hugh-Leifson medium (main solution: peptone – 2, NaCl – 5, KH_2PO_4 – 0,3, agar – 3, bromothymol blue 0,1% solution – 3 ml, pH=7,1, glucose solution: 10 g glucose, 60 ml dH_2O). Biochemical diagnostic features of bacteria were investigated at the clinical diagnostic laboratory of Public national institution "Scientific and practical center of preventive and clinical medicine" of State Directorate for Affairs (PNI "SPC PCM" SDA) with a number of selective medium: Kligler's agar (enzymatic digest of casein – 10, enzymatic digest of animal tissue – 10, lactose – 10, dextrose – 1, ferric ammonium citrate – 0.5, NaCl – 5, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ – 0.5, phenol red – 0.025, agar – 15, pH = 7.2), urease (urea – 20, Na_2HPO_4 – 9.5, KH_2PO_4 – 9.1, yeast extract – 0.1, phenol red – 0.01, pH=6.8), TTC (Pancreatic digest of gelatin – 10, NaCl – 5, beef extract – 3, agar – 4, triphenyltetrazolium chloride – 0.5, pH=7.3), Simmons citrate agar (MgSO_4 – 0.2, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ – 1, K_2HPO_4 – 1, sodium citrate – 2, NaCl – 5, bromothymol blue – 0.8, agar – 15, pH=6.8) and lysine decarboxylase (Glucose – 1, L-lysine – 5, Bromocresol purple – 0.016, pH=6.1).

The sensitivity to antibiotics was determined by sensitivity discs "HiMedia". Bacteria was streaked onto a Petri dish with Mueller-Hinton Agar to form a bacterial lawn and then disks with antimicrobials (max.5 per plate) were plated on. Results was determined by diameter of diffusion of antibiotics around disks and were verified according to the standard of sensitivity of EUCAST.

The morphological features of bacterial colonies were studied using stereoscopic microscope (Biomed MS-1 ZOOM) at the PNI "SPC PCM" SDA. Phytopathogenic properties of bacterial isolate was investigated on potato *in vitro*. Cut off potato cubes (3-4 cm) were inoculated with night culture of bacteria and left in plates with sterile saline at 27°C.

In order to isolate bacteriophages the samples of waste waters were used. To amplify bacteriophages in samples enrichment method was applied. The content of brown rot lesions was transferred to liquid LB broth and incubated for 48 hours at 27°C. After incubation LB broth was centrifuged (5000 r/m, 25 min), supernatant was mixed with chloroform to remove bacteria. The samples were plated on a bacterial lawn by agar overlay method. Separate phage plaques were than picked and transferred to sterile saline (1 ml). Isolated bacteriophages were purified by serial propagation of single plaques.

To obtain high titer phage lysates were prepared from confluent lysis plates by adding 10 ml of saline to 10 plates. The soft-agar layers were scrapped off after 30 min. Lysates were clarified by low speed centrifugation at 15.000g for 15 min.

For bacteriophage staining, phage solution was deposited on formvar coated copper grid for two minutes and stained by 2% (w/v) uranyl acetate, pH 4 – 4.5. The solution was drained through filter paper and phage particles were observed through transmission electron microscopy (JEOL 1400, instrumental magnification of 40.000-90.000).

Results and discussion. A total of 5 onion bulbs with symptoms of bacterial rot were taken from different markets in Kyiv, Ukraine. Samples were plated on LB media that is common for many enterobacteria. Three samples out of five resulted in bacterial growth on LB medium. One of the isolates formed yellow, domed, shining and mucoid colonies (fig.1).

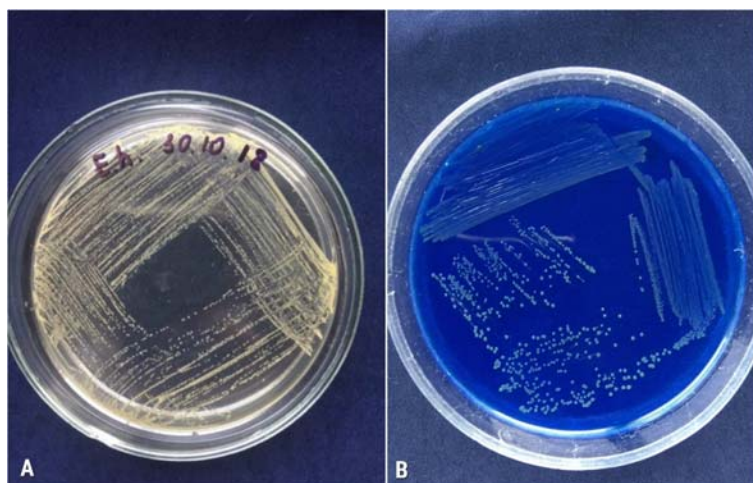


Figure 1. A – Colonies of *P. agglomerans* on plate with LB agar; B – Simmons citrate agar

The bacterial colonies were stained according to Gram and studied using light microscope. Isolate was Gram-negative, rod-shaped bacteria, 1-4 μm in length.

In Hugh-Leifson medium bacteria changed color of medium in aerobic and anaerobic conditions that indicates its ability to ferment glucose. This feature is common for facultative anaerobic bacteria.

Bacterial biochemical characterization was conducted using selective medium for Gram-negative bacteria: Kligler's agar, urease, TTC, Simmons citrate agar and lysine decarboxylase tests. The results of bacterial identification are presented in tab 1. Kligler's test indicated the ability of bacteria to ferment glucose, without H_2S

release. The urease test was negative, so that the bacteria were not capable to secrete an urease enzyme. TTC test was more positive than negative6 bacteria showed a spread throughout the medium but after 48h of incubation. Furthermore, the bacteria was able to utilize a citrate in the Simmons citrate agar. The results of lysine decarboxylase test was negative, therefore it indicated the inability of the bacteria to use a lysine as a source of carbon and energy for growth. This isolate was classified as *Pantoea agglomerans* (formerly *Erwinia herbicola*) according to the results obtained and to the Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (tab. 1).

Table 1. Biochemical characteristics of *P.agglomerans*

Biochemical marker	Kligler's agar	Urease	TTC (motility)	Simmons citrate agar	Lysine decarboxylase
<i>P. agglomerans</i>	+ (glucose fermentation)	-	+/-	+	-

The results of bacterial susceptibility to antibiotics showed that isolated *P.agglomerans* was resistant to some of them. The resistance to cefalexin, cefotaxime, ceftazidime, ciprofloxacin, chloramphenicol, cefuroxime and norfloxacin was observed that indicates a general resistance to β -

lactams. Also, some antibiotics showed boundary values between resistance and sensitivity that indicates development bacterial resistance to them. The results of bacterial susceptibility to antibiotics are presented in the table 2.

Table 2. Antibiotic sensitivity of isolated bacteria

Antibiotic	Zone of inhibition (mm)	Reaction ¹
<i>Amikacin</i>	20	S
<i>Ampicillin</i>	20	S
<i>Amoxiclav</i>	14	S
<i>Cefalexin</i>	14	R
<i>Cefaclor</i>	16	S
<i>Cefotaxime</i>	21	R
<i>Ceftazidime</i>	20	R
<i>Ciprofloxacin</i>	24	R
<i>Chloramphenicol</i>	20	R
<i>Cefuroxime</i>	16	R
<i>Gentamicin</i>	19	S
<i>Norfloxacin</i>	12	R
<i>Levofloxacin</i>	20	S
<i>Nitrofurantoin</i>	17	S
<i>Doxycyclin</i>	17	S
<i>Moxifloxacin</i>	27	S
<i>Netilmicin</i>	18	S

According to data obtained our isolate of *P.agglomerans* can be the source of antibiotic resistance factors. Taking into account that this bacteria is cross-kingdom pathogen, horizontal gene transfer with plant and human bacteria in the environment can cause an evolving of new multiresistant bacteria.

Then detection of pathogenic properties was conducted on potato cubes. This model system was chosen in order to test bacteria on other typical vegetable as the preliminary phytopathogenicity test on onions yielded the expected positive result. Bacteria caused tissue maceration

resulting in rotting and formation of bacterial plaque on slices. *P.agglomerans* isolate showed to be capable of developing bacterial infection in plants and biochemical tests indicate its potential of human pathogen.

According to the obtained results, we attempted isolation of specific bacteriophages from waste waters that is the source of phages of human pathogens due to constant intake of human feces. Waste waters were taken from treatment facilities, then filtrated and plated with *P.agglomerans* by agar overlay method. As a result, specific bacteriophage was isolated (fig.2).



Figure 2. Phage plaques on bacterial lawn of *P.agglomerans*

Bacteriophage, given work name Eh1, produced small plaques, $d < 1$ mm. After serial propagation, bacteriophages formed negative colonies on bacterial test cultures with no decrease in phage titres, which indicates the lytic cycle of viral reproduction and, moreover, is an indispensable condition for developing phage-based products.

Phage isolate Eh1 was investigated with electron microscopy and it was indicated that this virus was member of family *Myoviridae* (fig 3). Isolate had icosahedral head $95 \times 95 \pm 4$ nm in diameter and tail 120 ± 5 nm in length. Basal plate of the virus was also observed.

¹ R – resistance, S – sensitivity.

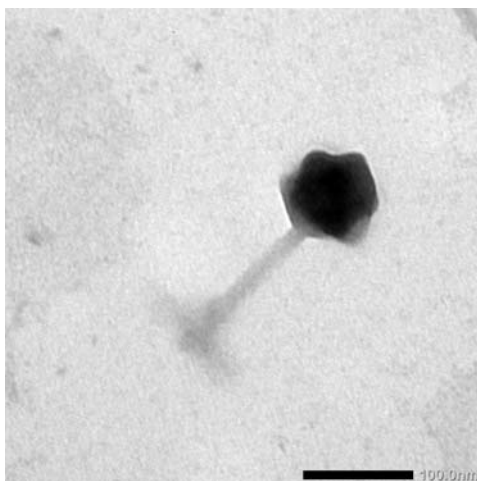


Figure 3. Electron microscopy of isolate Eh1 (family Myoviridae)

To investigate whether the isolate Eh1 is able to suppress bacterial infection *in vitro* method of potato slices was used again. As a result, bacterial growth on potato cubes was limited by bacteriophage successfully (fig.4).

Slices inoculated only by bacteria displayed the signs of rot while cubes inoculated with bacteria and phage were clear without any symptoms.

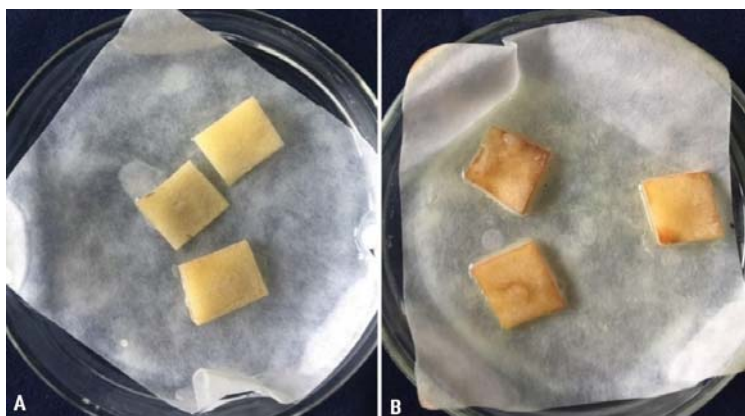


Figure 4. A – slices inoculated with bacteria and phage; B – only bacteria

In recent years researchers from different parts of the world report more often about isolation of enterobacteria from agricultural plants (5, 8, 17). Plant rhizosphere is high in nutrients and it is enough for human pathogens to live and survive. Violation of crop rotation could be the reason that led organisms such as *P.agglomerans* into new ecological niche. Introduced in agroecosystems with organic wastes, these bacteria adapted and started to invade new organisms – plants. Therefore, using of untreated human excreta contaminated with enteric pathogens to grow vegetables should be strictly controlled (16). Although, successful infection by these bacteria often occurs in co-infection with other phytopathogenic bacteria, this fact do not reduce the risk for human, for example those who eat fresh fruits and vegetables or drink juices. That is why it is important to revise classical strategies of bacterial control and to introduce alternative methods such as bacteriophages.

Conclusions. As the result bacteria was isolated from onion with bacterial rot symptom. Bacteria was identified as *Pantoea agglomerans* due to morphological and biochemical tests. Antimicrobial sensitivity profile of *P.agglomerans* was investigated, isolate showed resistance to some antibiotics. A specific bacteriophage was isolated from waste waters. Phage isolate Eh1 was examined by electron microscopy and identified as a member of family Myoviridae.

Ability of the phage to inhibit bacterial infection of *P.agglomerans in vitro* was demonstrated on potato slices.

References:

1. Dust-borne bacteria in animal sheds, schools and children's day care centres / A.M. Andersson, N. Weiss, F. Rainey, M.S. Salkinoja-Salonen // J. of applied microbiology, 1999. – Vol. 86, N 4. – P. 622. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10212408>.
2. Nosocomial outbreak of *Pantoea agglomerans* in a pediatric urgent care center / E.L. Bricudo, V. O. Macedo, M.A. Carrara et al. // The Brazilian journal of infectious diseases: an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases, 2007. – Vol. 11, N.2. – P. 281. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17625778>.
3. Isolation of *Pantoea agglomerans* in two cases of septic monoarthritis after plant thorn and wood splinter injuries / C. De Champs, Le Seaux, J.J. Dubost et al. // J. of clinical microbiology, 2000. – Vol. 38, N.2. – p. 460–1. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10618144>.
4. Flatauer F.E. Septic arthritis caused by *Enterobacter agglomerans* / F.E.Flatauer, M.A. Khan // Archives of internal medicine, 1978. – Vol. 138, N.5. – P. 788. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/646543>.
5. *Pantoea agglomerans* as a New Etiological Agent of a Bacterial Necrotic Disease of Mango Trees / J.A. Gutiérrez-Barranquero, F.M. Cazorla, J.A. Torés, A. de Vicente // Phytopathology, 2019. – Vol. 109, N.1. – P. 17–26. doi: 10.1094/PHYTO-06-18-0186-R.
6. Habsah H. An outbreak of *Pantoea* spp. in a neonatal intensive care unit secondary to contaminated parenteral nutrition / H. Habsah // J. of Hospital Infection, 2005. – Vol. 61, N.3. – P. 213–218. doi: 10.1016/j.jhin.2005.01.004.
7. Characterization of two polyvalent phages infecting Enterobacteriaceae / S. Hamdi, G.M. Rousseau, S.J. Labrie et al. // Sci. reports. Nature Publishing Group, 2017. – P. 40349. doi: 10.1038/srep40349.
8. First report of *Serratia marcescens* causing yellow wilt disease on sunflower in Russia / A.N. Ignatov, M.V. Khodykina, V.A. Polityko,

M.V. Sukhacheva // New Disease Reports. British Society for Plant Pathology, 2016. – Vol. 33. – P. 8. doi: 10.5197/j.2044-0588.2016.033.008.

9. Iredell J. Antibiotic resistance in Enterobacteriaceae: mechanisms and clinical implications / J. Iredell, J. Brown, K. Tagg // BMJ, 2016. – P. h6420. doi: 10.1136/bmj.h6420.

10. Jeljaszewicz J. Antibiotic resistance in Gram-positive cocci / J. Jeljaszewicz, G. Mlynarczyk, A. Mlynarczyk // Internat. j. of antimicrobial agents, 2000. – Vol. 16, N. 4. – P. 473. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11118861>.

11. Pantoea agglomerans as a cause of septic arthritis after palm tree thorn injury; case report and literature review / A. Kratz, D. Greenberg, Y. Barki et al. // Archives of disease in childhood, 2003. – Vol. 88, N. 6. – P. 542. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12765929>.

12. Bacteriophage therapy against Enterobacteriaceae / Xu Y, Liu Y, Liu Y et al. // Virologica Sinica, 2015. – Vol. 30, N. 1. – P. 11–18. doi: 10.1007/s12250-014-3543-6.

13. Mardaneh J. Isolation, identification and antimicrobial susceptibility of Pantoea (Enterobacter) agglomerans isolated from consumed powdered infant formula milk (PIF) in NICU ward: First report from Iran / J. Mardaneh, M.M.S. Dallal // Iranian J. of Microbiol. Tehran Univ. of Med. Sci., 2013. – Vol. 5, N. 3. – P. 263. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3895565>.

14. Enterobacter sepsis in infants and children due to contaminated intravenous fluids / N.S. Matsaniotis, V.P. Syriopoulou, M.C. Theodoridou et al. // Infection control : IC. – 1984. – Vol. 5, N. 10. – P. 471–477. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6567611>.

15. Monier J.-M. Aggregates of Resident Bacteria Facilitate Survival of Immigrant Bacteria on Leaf Surfaces / J.-M. Monier, S.E. Lindow // Microbial Ecology, 2005. – Vol. 49, N.3. – P. 343–352. doi: 10.1007/s00248-004-0007-9.

16. Internalization of enteropathogenic human bacteria in lettuce and coriander plant tissue / G. Nduhiu, M.M. Gicheru, P.B. Gathura et al. // ISABB Jour. of Health and Environmental Sci., 2018. – Vol. 5, N. 3. – P. 28–32. doi: 10.5897/ISAAB-JHE2018.0043.

17. Nithya A. Prevalence of plant beneficial and human pathogenic bacteria isolated from salad vegetables in India / A. Nithya, S. Babu // BMC Microbiology. BioMed Central, 2017. – Vol. 17, N. 1. – P. 64. doi: 10.1186/s12866-017-0974-x.

18. Popoca E. O. F. Pantoea agglomerans in Immunodeficient Patients with Different Respiratory Symptoms / E.O.F. Popoca // The Sci. World Jour. Hindawi Limited, 2012. doi: 10.1100/2012/156827.

19. Raphael E. Infections Caused by Antimicrobial Drug-Resistant Saprophytic Gram-Negative Bacteria in the Environment / E. Raphael, L.W. Riley // Frontiers in medicine. Frontiers Media SA, 2017. – Vol. 4. – P. 183. doi: 10.3389/fmed.2017.00183.

20. Souza K. A. Isolation of a polyvalent bacteriophage for Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, and Aerobacter aerogenes / K.A. Souza, H.S. Ginoza, R.D. Haight // J. of Virology. American Society for Microbiology (ASM), 1972. – Vol. 9, N. 5. – P. 851–856. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4554466>.

21. Ulloa-Gutierrez R. Pantoea agglomerans and thorn-associated suppurative arthritis / R. Ulloa-Gutierrez, T. Moya, M.L. Avila-Aguero // The Pediatric infectious disease jour., 2004. – Vol. 23, N. 7. – P. 690. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15247618>.

22. Side effects associated with the treatment of multidrug-resistant tuberculosis at a tuberculosis referral hospital in South Korea: A retrospective study / T.W. Yang, H.O. Park, H.N. Jang et al. // Medicine. Wolters Kluwer Health, 2017. – Vol. 96, N. 28. – P. e7482. doi: 10.1097/MD.0000000000007482.

References (Scopus):

1. Andersson AM et al. Dust-borne bacteria in animal sheds, schools and children's day care centres. J.appl.microbiol.1999; 86(4); 622–34. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10212408>.

2. Bicudo EL et al. Nosocomial outbreak of Pantoea agglomerans in a pediatric urgent care center. Braz J Infect Dis. 2007; 11(2); 281–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17625778>.

3. De Champs C. et al. Isolation of Pantoea agglomerans in two cases of septic monoarthritis after plant thorn and wood sliver injuries. J Clin mi-

crobiol. 2000; 38(1); 460–1. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10618144>.

4. Flatauer FE, Khan MA. Septic arthritis caused by Enterobacter agglomerans. JAMA Intern. Med.1978; 138(5); 788. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/646543>.

5. Gutiérrez-Barranquero, J. A. et al. Pantoea agglomerans as a New Etiological Agent of a Bacterial Necrotic Disease of Mango Trees. Phytopathol. 2019; 109(1); 17–26. doi: 10.1094/PHYTO-06-18-0186-R.

6. Habsah H. et al. An outbreak of Pantoea spp. in a neonatal intensive care unit secondary to contaminated parenteral nutrition. J. Hosp. Infect. 2005; 61(3); 213–218. doi: 10.1016/j.jhin.2005.01.004.

7. Hamdi S. et al. Characterization of two polyvalent phages infecting Enterobacteriaceae. Sci. Rep.2017; 7; 40349. doi: 10.1038/srep40349.

8. Ignatov, A. N. et al. First report of Serratia marcescens causing yellow wilt disease on sunflower in Russia, New Dis. Rep. Brit. Soc. For Plant Pathol. 2016; 33(8); 8. doi: 10.5197/j.2044-0588.2016.033.008.

9. Iredell J, Brown J, Tagg K. Antibiotic resistance in Enterobacteriaceae: mechanisms and clinical implications. BMJ.2016; h6420. doi: 10.1136/bmj.h6420.

10. Jeljaszewicz J, Mlynarczyk G, Mlynarczyk A. Antibiotic resistance in Gram-positive cocci. Int J Antimicrob Agents. 2000; 16(4); 473–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11118861>.

11. Kratz A et al. Pantoea agglomerans as a cause of septic arthritis after palm tree thorn injury; case report and literature review. Arch. Dis. Child.2003; 33(6); 542–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12765929>.

12. Liu Y et al. Bacteriophage therapy against Enterobacteriaceae. Vir Sinica. 2015; 30(1); 11–18. doi: 10.1007/s12250-014-3543-6.

13. Mardaneh J, Dallal MMS. Isolation, identification and antimicrobial susceptibility of Pantoea (Enterobacter) agglomerans isolated from consumed powdered infant formula milk (PIF) in NICU ward: First report from Iran. I JM. 2013; 5(3); 263. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3895565>.

14. Matsaniotis NS et al. Enterobacter sepsis in infants and children due to contaminated intravenous fluids. Infection control : IC.1984; 5 (10); 471–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6567611>.

15. Monier J.-M, Lindow SE. Aggregates of Resident Bacteria Facilitate Survival of Immigrant Bacteria on Leaf Surfaces. Microb Ecol. 2005; 49 (3); 343–352. doi: 10.1007/s00248-004-0007-9.

16. Nduhiu, G. et al. Internalization of enteropathogenic human bacteria in lettuce and coriander plant tissue. ISABB J Health Environ.I Sci. 2018; 5(3); 28–32. doi: 10.5897/ISAAB-JHE2018.0043.

17. Nithya, A. and Babu, S. Prevalence of plant beneficial and human pathogenic bacteria isolated from salad vegetables in India. BMC Microbiol. BioMed Centr. 2017; 17(1); 64. doi: 10.1186/s12866-017-0974-x.

18. Popoca EOF. et al. Pantoea agglomerans in Immunodeficient Patients with Different Respiratory Symptoms. Sci. World J. 2012; doi: 10.1100/2012/156827.

19. Raphael E, Riley LW. Infections Caused by Antimicrobial Drug-Resistant Saprophytic Gram-Negative Bacteria in the Environment. Front. Med. 2017; 4; 183. doi: 10.3389/fmed.2017.00183.

20. Souza KA, Ginoza HS, Haight RD. Isolation of a polyvalent bacteriophage for Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, and Aerobacter aerogenes.J. Virol.1972; 9(5); 851–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4554466>.

21. Ulloa-Gutierrez R, Moya T. Avila-Aguero ML. Pantoea agglomerans and thorn-associated suppurative arthritis. Pediatr. Infect. Dis. J. 2004; 23(7); 690. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15247618>.

22. Yang TW et al. Side effects associated with the treatment of multidrug-resistant tuberculosis at a tuberculosis referral hospital in South Korea: A retrospective study. Medicine (Baltimore). 2017; 96(28); e7482. doi: 10.1097/MD.0000000000007482.

Надійшла до редколегії 01.02.2019
Отримано виправлений варіант 04.03.2019
Підписано до друку 04.03.2019

Received in the editorial 01.02.2019
Received a revised version on 04.03.2019
Signed in the press on 04.03.2019

Н. Корнієнко, асп., Е. Духно, студ.,
А. Харіна, канд. біол. наук, І. Будзанівська, д-р біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

ВИДІЛЕННЯ БАКТЕРІОФАГУ З ЛІТИЧНОЮ АКТИВНІСТЮ ПРОТИ НОВОЇ ІДЕНТИФІКОВАНОЇ PANTOEA AGGLOMERANS

Унаслідок сільськогосподарської діяльності людини, багато фітопатогенних бактерій набувають нових властивостей та здатність викликати захворювання в організмі тварин та людини. Більше того, втрата бактеріями чутливості до антибіотиків стає дедалі більшою загрозою. Найбільш ефективним альтернативним методом обробки та профілактики рослин є бактеріофаги. Метою цієї роботи є виділення та ідентифікація рослинної ентеробактерії і пошук специфічних до неї бактеріофагів. Методи: біохімічна ідентифікація бактерії, аналіз на чутливість до антибіотиків за допомогою дисків, титрування та накопичування вірусів, електронна мікроскопія. Результати: зі зразків цибулі із симптомами бактеріозу виділено декілька бактерій. Одну з них ідентифіковано як *Pantoea agglomerans*. Даний ізолят досліджено на резистентність до антибіотиків, виявлена стійкість до цефалексину та норфлоксацину. Зі стічних вод виділено бактеріофаг, специфічний до ідентифікованої бактерії. Морфологія бактеріофага досліджена за допомогою електронної мікроскопії, вірус належить до родини *Myoviridae*. Фітопатогенні властивості бактерії та антимікробна активність ізоляту бактеріофагу досліджена на картоплі *in vitro*. *P. agglomerans* призводила до розвитку бактеріозу на зрізах картоплі, а виділений бакте-

ріофаг успішно пригнічував її ріст. Висновки: Це дослідження демонструє те, що такі звичайні овочі як цибуля можуть бути джерелом патогенних для людини бактерій. В цій роботі ми виділили *P.agglomerans* – бактерію з родини *Enterobacteriaceae*. Беручи до уваги те, що ця бактерія була нечутливою до деяких антибіотиків, це можна розцінювати як тривожний знак. Використання бактеріофагів може вирішити проблеми резистентності до антибіотиків та захисту рослин від бактеріальних інфекцій. Ізольований нами зі стічних вод бактеріофаг пригнічував ріст *P.agglomerans in vitro* і його можна розглядати як складову частину фагових препаратів.

Ключові слова: *Pantoea agglomerans*, цибуля, фаготерапія, бактеріофаги.

Н. Корниенко, асп., Е. Духно, студ.,

А. Харина, канд. биол. наук, И. Будзанивская, д-р биол. наук

Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

ВЫДЕЛЕНИЕ БАКТЕРИОФАГА С ЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ ПРОТИВ НЕДАВНО ИДЕНТИФИЦИРОВАННОЙ *PANTOEА AGGLOMERANS*

В следствие сельскохозяйственной деятельности человека, множество фитопатогенных бактерий приобретают новые свойства и способность вызывать заболевания в организме животных и человека. Более того, потеря бактериями чувствительности к антибиотикам становится все большей угрозой. Наиболее эффективным альтернативным методом обработки растений являются бактериофаги. Целью этой работы является выделение и идентификация растительной энтеробактерии и поиск специфических к ней бактериофагов. Методы: биохимическая идентификация бактерии, анализ на чувствительность к антибиотикам с помощью дисков, титрование и накопление вируса, электронная микроскопия. Результаты: из образцов лука с симптомами бактериоза выделили несколько бактерий. Одну из них идентифицировали как *Pantoea agglomerans*. Исследовали резистентность к антибиотикам данного изолята, выявлена стойкость к цефалексину и норфлоксацину. Из сточных вод выделен бактериофаг, специфический к данной бактерии. Морфология бактериофага исследована с помощью электронной микроскопии, вирус принадлежит к семейству *Myoviridae*. Фитопатогенные свойства бактерии и антибактериальная активность изолята бактериофага исследована на картофеле *in vitro*. *P. agglomerans* приводила к развитию бактериоза на срезах картофеля, а выделенный бактериофаг успешно ингибировал её рост. Выводы: Это исследование демонстрирует, что такие обычные овощи как лук могут быть источником патогенных для человека бактерий. В этой работе мы выделили *P.agglomerans* – бактерию из семейства *Enterobacteriaceae*. Принимая во внимание то, что эта бактерия была нечувствительна к некоторым антибиотикам, это можно расценивать как тревожный знак. Использование бактериофагов может решить проблемы резистентности к антибиотикам и защиты растений от бактериальных инфекций. Выделенный нами из сточных вод бактериофаг угнетал рост *P.agglomerans in vitro* и его можно рассматривать как составную часть фаговых препаратов.

Ключевые слова: *Pantoea agglomerans*, лук, фаготерапия, бактериофаги.

UDK 57.084.1:615.357:616-091.814:616-056.527

O. Kalmukova, Ph. D. stud., M. Dzerzhynsky, Dr. Sci.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

THE EFFECTS OF MELATONIN ADMINISTRATION IN DIFFERENT TIMES OF DAY ON THE BROWN ADIPOSE TISSUE IN RATS WITH HIGH-CALORIE DIET-INDUCED OBESITY

The aim of our study was to determine morpho-functional state (area of nucleus, brown adipocytes and also area and number of lipid droplets in each cells, general optical density of tissue) of brown adipose tissue in rats with high-calorie (high fat) diet-induced obesity after melatonin administration in different time of the day (morning and evening). Melatonin was administered daily by gavage for 7 weeks in dose 30 mg/kg either 1 h after lights-on (ZT01) or 1 h before lights-off (ZT11) rats with high-calorie diet (HCD). Besides morphometric parameters as well were measured related visceral fat weight and related brown adipose tissue mass. Rats with HCD had huge changes in brown adipocytes morphology, which summarized in become resembles of classical white adipocytes: grown lipid droplets and cells area, but goes down lipid droplets number and optical density of brown adipose tissue. In general brown adipose tissue with above mentioned characteristic from HCD rats lose their ability to conduct strongly thermoproduction function. After melatonin used in rats with HCD arise leveling of pathological changes, which associated with consumption of HCD. Namely, in groups HCD ZT01 and HCD ZT11 we obtain decreased cells and lipid droplets area, increased lipid droplets number and optical density of brown adipose tissue, in relation to group HCD. These received changes has evidence about functionally active brown adipose tissue state, which can also dissipate of exceed energy (lipids – triacylglycerols) amount into whole organism during heat production for avoid to its storage in white adipose tissue and in outside adipose tissue. In addition, evening administration of melatonin (group HCD ZT11) demonstrate more activated state of brown adipose tissue and also related visceral weight gain less, than morning (group HCD ZT01). In conclusions, melatonin influence on morpho-functional state brown adipose tissue in rats with HCD, moreover evening administration can use for obesity therapy via its strong action on activate brown adipocytes.

Key words: melatonin, obesity, chronotherapy, adipocytes, high-fat diet, brown adipose tissue.

Introduction. The overweight and obesity become wide medical problem, since were shown its involvement in development of 2 type diabetes [1]. The number of people with overweight and obese are grown every year [2]. Potentially, this people fall into risk diabetes group [3]. The search continues for effective and safe methods to prevent obesity. One of way to treatment obesity is target activated brown adipose tissue (BAT) [4, 5]. BAT through decrease fat mass, increase glucose uptake ameliorate insulin sensitivity and prevent 2 type diabetes development [6, 7].

Brown adipose tissue (BAT) – connecting tissue with specific function of lipids deposition for the heat production [8]. Since 2007 when activated BAT were open in adult human, its presence induce a huge interest [9, 10]. Usually, BAT activated after cold exposure or sympathetic influence

of adrenaline [11, 12]. But these methods of initiate BAT have many side effect (for example, adrenaline on cardiovascular systems). So, actual is finder agents to trigger BAT without (or with minimize) side effect for obesity improve [13, 14]. One of the potentiate candidate can be melatonin.

Melatonin – pineal gland hormone, which regulate circadian systems of organism in accordance to environmental changes [15], which control metabolism (blood pressure, blood glucose, body temperature, energy production) [16], seasonal reproduction [17], immune response [18] and aging [19, 20]. During obesity development was shown desynchronize some functions, while melatonin may act as orchestrating regulator molecule [21, 22].

In the other hand was demonstrate presence of melatonin receptor on brown adipocytes [23, 24]. Melatonin provoke in brown adipocytes expression of uncoupling proteins UCP1 in mitochondria [25] and induction thermogenesis [26, 27]. Thus effect may be beneficial for obesity therapy [28]. Now grow intensify studying about chronotherapy uses for cure most of illness, including obesity [29, 30]. It is need more dedicated study of chronopharmacological agents, including melatonin, in the treatment of metabolic diseases [31].

Materials and methods. White nonlinear male rats weighing 100-120 g were used in this study. The light cycle was 12-h light and 12-h darkness, with lights-off at 19:00 h. All experiments on animals were carried out in compliance with the international principles of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for experimental and other scientific purposes (European Convention, Strasbourg, 1986), Article 26 of the Law of Ukraine "On the Protection of Animals from Cruelty" (No. 3447-IV, February 21, 2006) as well as all norms of bioethics and biological safety.

During the first week, all animals received standard rodent chow. On the 8th day, the animals were randomized into 2 groups: control animals received standard chow (3,81 kcal/g) for 10 weeks and experimental rats received high-calorie diet (5,35 kcal/g) consisting of standard chow (60 %), lard (10 %), eggs (10 %), sugar (9 %), peanut (5 %), dry milk (5 %) and vegetable oil (1 %) [32]. Food and water were available ad libitum. To confirm the development of obesity the animals were weighed one times a week until the average body gain reached a significant difference of at least 30 % between the two groups and the respective animals were classified as having the normal body mass (Control) and those with development of obesity (HCD). Rats of HCD groups were divided into tree subgroups: one subgroup received no MT, animals of the second and third subgroups obtained different modes of MT administrations – single peroral by gavage introductions, 1 h after light switching on (group HCD ZT01) and 1 h before light switching off (group HCD ZT11) (modes "morning" and "evening", respectively). Thus, the experimental subgroups are indicated below as normal body mass (control), HCD, HCD ZT01, HCD ZT11.

Melatonin (Alcon Biosciences, USA) was administered daily by gavage for 7 wk (30 mg/kg) either 1 h after lights-on (Zeitgeber time (ZT) 01) or 1 h before lights-off (ZT11). Melatonin treatment was began at 6th week of study after obesity is developed.

Food and water consumption were measured daily at the same time (09:00 to 10:00 h) and body weights were determined once a week. Body weight gain, relative daily food (kcal/day/g body weight) and relative daily water consumption (ml/day/g body weight) was determined for each rat.

On the last day of the experiment, the animals were decapitated, and then the brown adipose tissue was isolated from the interscapular region and weighed for the calculation of the relative mass. Also the visceral (epididymal, retroperitoneal, mesenteric, perirenal) fat pads were dissected and immediately weighed.

Histological examination was performed to characterize the morphology and functional status of brown adipose tissue. Fragments of brown adipose tissue in the size of 1x1 cm were fixed in 4 % of paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer for 72 h, after which they were dehydrated and embedded into paraffin according to a standard procedure. From the paraffin blocks, 5 μ m sections were performed and stained with Bemer's hematoxylin and eosin. Further examination of sections was performed using a light microscope BX41 (Olympus, Japan). Microphotographs were taken using the DP20 (Olympus, Japan) digital camera and the QuickPHOTO MICRO software (Promicra, Czech Republic).

The cross-sectional area of the nucleus, cells and lipid droplets, nuclear-cytoplasmic ratio (NCR), the number of lipid inclusions per one cell and the optical density of the tissue were used as criteria for assessing the morphology and functional status of brown adipocytes. All parameters were measured using the ImageJ software (National Institutes of Heath, USA).

Statistical data analysis was performed using the Statistica 6.0 (Stat-Soft, USA) and Microsoft Excel 2010 software (Microsoft, USA). The distribution of values was estimated using Shapiro-Wilk W-test. Since the deviation of these values distribution of from the normality was minor, to evaluate the differences between the values we used Student's t-test. The differences with probability of the null hypothesis $p < 0.05$ were considered significant. The obtained results are presented as the mean $\pm$ standard error of mean.

Results and discussion. In control group (Fig. 1 A) brown adipocytes have polygonal cell morphology with round-shaped central-located nucleus. In cytoplasm accommodate a few amount droplets of lipid (Fig. 1, asterisk), which did not stain with water-soluble dyes, thats why they look like white bubble. Another part of cytoplasm, which contain a large number of mitochondria, show eosinophilic properties. After consumption HCD (Fig. 1 B) brown adipocytes become resembles morphology of white adipocytes: round cells with peripheral-located oval nucleus, because practically unilocular lipid droplet occupy almost all space of cytoplasm. Described changes indicate about decrease of brown adipocytes functional activity [33, 34]. If melatonin used at morning time of day (group HCD ZT01, Fig. 1 C), adipocytes represent improvement, although the shape of cells remain circularized, nucleus become at the centre of cell and accordingly lipid droplets size goes down, also their number rise. But, melatonin administration at the evening time of day (group HCD ZT01, Fig. 1 D) give a more stronger effect: adipocytes in line with control have polygonal cell morphology and round central nucleus (characteristics, which completely reverse manifestation of obesity-associated phenotype of brown adipocyte), they demonstrate maintain multilocular little lipid droplets. Thats changes have marked pronounced functional activation of brown adipocytes thermogenesis [35].

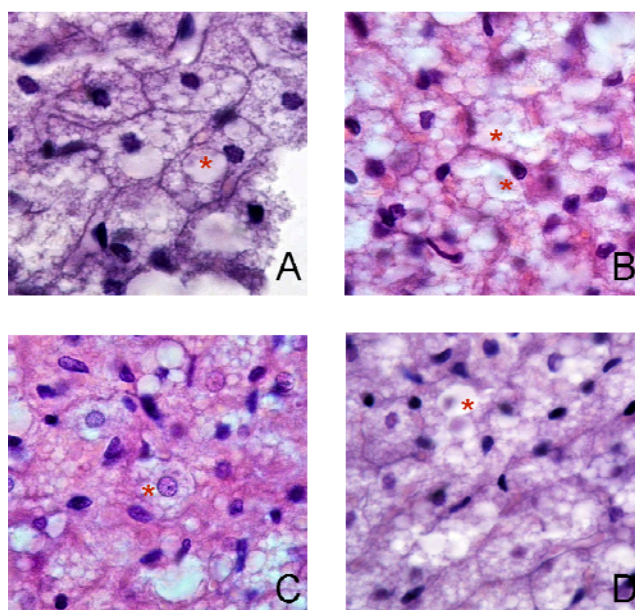


Fig. 1. Microphotographs of rats' brown adipose tissue sections:
A – control group, B – HCD group, C – group HCD ZT01, D – group HCD ZT11;
hematoxylin-eosin staining; oc. x10, ob. x100. Notes: * – lipid droplets

In HCD group the area of brown adipocytes (Fig. 2) was increase by 30 %, but in case melatonin administration this parameter decrease in group HCD ZT01 by 16 % and in group HCD ZT11 by 50 % (compare to control). In turn in rely to HCD group melatonin provoke significant reduction in group HCD ZT01 by 35 % and in group HCD ZT11 by 60 %. Besides, was difference between HCD ZT01 and HCD ZT11 groups by 40 %. It can be explain by changing their function during obesity development – to deposit exceed lipids, that why they have rise in size in HCD group and become as white adipocytes [36]. In continuation of this pathologic changes under diet-induced obesity (group HCD) adipocytes undergo to magnification area of lipid droplets by 44 %, and melatonin application decline its by 28 % in HCD ZT01 and by 61 % in HCD ZT11 both in relation to control level; that is in compare to HCD group by 50 % and 73 % in HCD ZT01 and HCD ZT11, respectively, (also have fixed significant difference between morning and evening administration by 47 %). Obtained data demonstrate starting lipolysis process after melatonin application, moreover most effectively it manifested in HCD ZT11 group, which can be connected with targeting REV-ERB nuclear receptor by melatonin [37] (which involve in regulate circadian rhythm expression of a key lipolysis enzymes in adipocytes [38]), through its more sensing because REV-ERB mRNA high level in brown adipocytes is fixed at the beginning of night [39].

In the other hand, the number of lipid droplets did not change during obesity development. Intriguing, that in group HCD ZT11 (evening melatonin administration) lipid

droplets amount rise in relation to control by 16 % and in compare with HCD by 22 %. Similar results were obtained after melatonin uses in rats with standard diet [40]. This effect connected with activation of melatonin receptor in brown adipocytes and enhance lipolysis, as well as UCP1 producing [41, 42]. Also was shown that increase lipid droplets number and decrease their area are testify about strong activity of cells in heat production [43].

At standard histological tissue processing, lipids, which are deposited in the adipocytes in the form of inclusions, are washed out during the dehydration of the tissue. Therefore, the places of their localization in the cytoplasm of the cell after staining with eosin remain uncoloured. At a smaller magnification of the lens, it is possible to estimate the overall brightness, which depends directly on the amount of lipids in the tissue – optical density of brown adipose tissue. As HCD group consume high-calorie diet and consequently has enriched of lipid adipocytes, tissue shown less optical density by 34 % in relation on control. After melatonin induction the optical density reverse to level of control and, respectively, grow by 45 % in HCD ZT01 and by 46 % in HCD ZT11 without no significant difference between group with morning/evening administration melatonin. Thats data suggest about decrease lipid content in brown adipocytes and also increased eosinophilic part of cytoplasm. Its can be in relation with mitochondria amount grown, because melatonin influence on mitochondria metabolism due to localization on mitochondria membrane melatonin receptors MT1 and MT2 [44, 45].

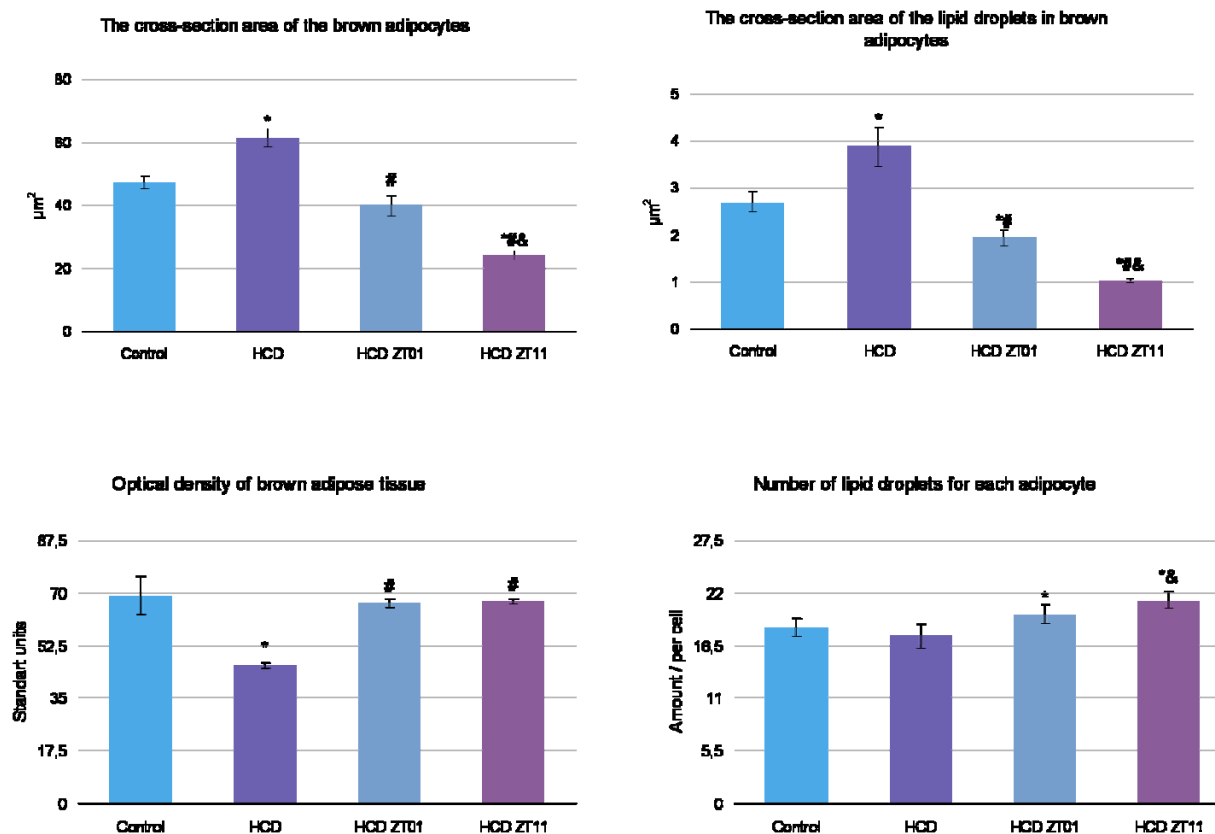


Fig. 2. The morphometric analysis data of rats' brown adipose tissue.

Notes: * – a significant difference between the control and experimental groups, $p \leq 0.05$;

– a significant difference between the HCD and experimental groups, $p \leq 0.05$;

& – a significant difference between the groups HCD ZT01 and HCD ZT11, $p \leq 0.05$

In general, melatonin administration influence on fat deposition and body weight (Table 1) [46, 47]. There no significant difference change in related brown adipose tissue mass, which can be explain functional rebuilding of tissue: in HCD lipid droplets content amplify, while in HCD ZT01 and HCD ZT11 enlarged respectively cell's number, which connected with enhance functional activity

adipocytes. The literature data is contradictory about change brown adipose tissue mass after melatonin intervention: some shown its increased activity and volume grown [48, 49], other – decreased mass, but rise of activity too [50]. Presented different data can be depend on various dose, route and time of melatonin administration.

Table 1. General characteristics of changes in mass of brown adipose tissue, visceral adipose tissue and food intake

	Control	HCD	HCD ZT01	HCD ZT11
Related visceral adipose tissue mass (%)	1,78 $\pm$ 0,03	2,93 $\pm$ 0,31*	2,11 $\pm$ 0,14 * #	1,79 $\pm$ 0,18 # &
Related brown adipose tissue mass (%)	0,68 $\pm$ 0,05	0,73 $\pm$ 0,03	0,71 $\pm$ 0,04	0,77 $\pm$ 0,04
Relative daily food consumption (kcal/day/g body weight)	0,25 $\pm$ 0,02	0,34 $\pm$ 0,02*	0,33 $\pm$ 0,02*	0,35 $\pm$ 0,04*
Relative daily water consumption (ml/day)	39 $\pm$ 0,75	32 $\pm$ 0,43*	30 $\pm$ 0,59*	33 $\pm$ 0,69*

Notes: Data are presented as the $M \pm SEM$; * $p < 0.05$ compared with control value; # $p < 0.05$ compared HCD with experimental groups; & $p < 0.05$ compared HCD ZT01 with HCD ZT11.

During consumption of HCD the related visceral adipose tissue weight significant grow in compare with control by 65 %, that is confirm developed obesity. Morning melatonin introduction lower related visceral adipose tissue weight by 28 % in compare with HCD group, and by 18,5 % in compare with control. Thus, in HCD ZT01 group related visceral adipose tissue mass has intermediate place: its significant differ both from control and HCD group. Evening melatonin administration reduce related visceral adipose tissue weight by 39 % in rely to HCD and reach control value. Shown changes occur without any alterations in food and water consumption.

Conclusions. High-calorie diet change morpho-functional state brown adipocytes, closer their phenotype to

white adipocytes. Melatonin treatment improve brown adipose tissue state (adipocyte size and lipid contain) in rats with diet-induced obesity, moreover after evening administration brown adipocyte activity increased in obese rats even in comparison with non-obese. Also activated brown adipose tissue may be one of the way to spread excess lipids, since related visceral adipose tissue mass decrease without reduction food and water consumption.

Reference:

1. From obesity to diabetes and cancer: epidemiological links and role of therapies / C. García-Jiménez, M. Gutiérrez-Salmerón, A. Chocarro-Calvo et al. // British journal of cancer., 2016. – Vol. 114, № 7. – P. 716–722.
2. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for

the Global Burden of Disease Study 2013 / M. Ng, T. Fleming, M. Robinson et al. // *The Lancet*, 2014. – Vol. 384, № 9945. – P. 766–781.

3. The official data of the WHO Bulletin published in May 2017. Available from: <http://www.who.int>

4. Stress-induced activation of brown adipose tissue prevents obesity in conditions of low adaptive thermogenesis / M. Razzoli, A. Frontini, A. Gurney et al. // *Molecular metabolism*, 2016. – Vol. 5, № 1. – P. 19–33.

5. Cinti S. The role of brown adipose tissue in human obesity / S. Cinti // *Nutrition, metabolism and cardiovascular diseases*, 2006. – Vol. 16, № 8. – P. 569–574.

6. Brown adipose tissue activity as a target for the treatment of obesity/insulin resistance / A.L. Poher, J. Altirriba, C. Veyrat-Durebex et al. // *Frontiers in physiology*, 2015. – Vol. 6, №4. – P. 1–9.

7. Tapia P. Biology and pathological implications of brown adipose tissue: promises and caveats for the control of obesity and its associated complications / P. Tapia, M. Fernández - Galilea, F. Robledo et al. // *Biological Reviews*, 2018. – Vol. 93, № 2. – P. 1145–1164.

8. Cannon B. Brown adipose tissue: function and physiological significance / B. Cannon, J. A. N. Nedergaard // *Physiological reviews*, 2004. – Vol. 84, № 1. – P. 277–359.

9. Nedergaard J. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans / J. Nedergaard, T. Bengtsson, B. Cannon // *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 2007. – Vol. 293. – P. E444–E452.

10. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans / A.M. Cypess, S. Lehman, G. Williams et al. // *New England Journal of Medicine*, 2009. – Vol. 360, № 15. – P. 1509–1517.

11. Cold-activated brown adipose tissue in healthy men / W.D. van Marken Lichtenbelt, J.W. Vanhommerig, N.M. Smulders et al. // *New England Journal of Medicine*, 2009. – Vol. 360, № 15. – P. 1500–1508.

12. Activation of human brown adipose tissue by a β 3-adrenergic receptor agonist / A.M. Cypess, L.S. Weiner, C. Roberts-Toler et al. // *Cell metabolism*, 2015. – Vol. 21, № 1. – P. 33–38.

13. Inhibiting peripheral serotonin synthesis reduces obesity and metabolic dysfunction by promoting brown adipose tissue thermogenesis / J.D. Crane, R. Palanivel, E.P. Motillo et al. // *Nature medicine*, 2015. – Vol. 21, № 2. – P. 166.

14. Brown adipose tissue transplantation reverses obesity in Ob/Ob mice / X. Liu, S. Wang, Y. You et al. // *Endocrinology*, 2015. – Vol. 156, № 7. – P. 2461–2469.

15. Butler M. Circadian regulation of endocrine functions / M. Butler, L.J. Kriegsfeld, R. Silver // *Hormones, Brain and Behavior Online*, Elsevier Inc., 2010. – P. 473–507.

16. Role of melatonin in metabolic regulation / A. Korkmaz, T. Topal, D.X. Tan et al. // *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 2009. – Vol. 10, № 4. – P. 261–270.

17. Melatonin and reproduction revisited / R.J. Reiter, D.X. Tan, L.C. Manchester et al. // *Biology of reproduction*, 2009. – Vol. 81, № 3. – P. 445–456.

18. Guerrero J.M. Melatonin-immune system relationships / J.M. Guerrero, R.J. Reiter // *Current topics in medicinal chemistry*, 2002. – Vol. 2, № 2. – P. 167–179.

19. Melatonin regulates aging and neurodegeneration through energy metabolism, epigenetics, autophagy and circadian rhythm pathways / A. Jenwitheesuk, C. Nopparat, S. Mukda et al. // *Internat. j. of mol. sci.*, 2014. – Vol. 15, № 9. – P. 16848–16884.

20. Melatonin, immune function and aging / V. Srinivasan, G.J. M. Maestroni, D.P. Cardinali et al. // *Immunity & Ageing*, 2005. – Vol. 2, № 1. – P. 17.

21. Garaulet M. Chronobiology and obesity: the orchestra out of tune / M. Garaulet, P. Gómez-Abellán, J.A. Madrid // *Clinical Lipidology*, 2010. – Vol. 5, № 2. – P. 181–188.

22. Chronobiological aspects of obesity and metabolic syndrome / P. Gómez-Abellán, J.A. Madrid, J.M. Ordóñez et al. // *Endocrinología y Nutrición (English Ed.)*, 2012. – Vol. 59, № 1. – P. 50–61.

23. Evidence of a role for melatonin in fetal sheep physiology: direct actions of melatonin on fetal cerebral artery, brown adipose tissue and adrenal gland / C. Torres-Farfan, F.J. Valenzuela, M. Mondaca et al. // *The Journal of physiology*, 2008. – Vol. 586, № 16. – P. 4017–4027.

24. Functional expression of MT2 (Mel1b) melatonin receptors in human PAZ6 adipocytes / L. Brydon, L. Petit, P. Delagrèze et al. // *Endocrinology*, 2001. – Vol. 142, № 10. – P. 4264–4271.

25. Melatonin: a mitochondrial targeting molecule involving mitochondrial protection and dynamics / D.X. Tan, L. Manchester, L. Qin et al. // *Internat. j. of mol. sci.*, 2016. – Vol. 17, № 12. – P. 2124.

26. Yang F. Adaptive thermogenesis of brown adipose tissue in tree shrews (*Tupaia belangeri*): Role of melatonin / F. Yang, L. Zhang, W. Zhu // *J. of Zoological and Biosci. Res.*, 2017. – Vol. 1, № 4. – P. 1–7.

27. Roman S. Brown adipose tissue and novel therapeutic approaches to treat metabolic disorders / S. Roman, A. Agil, M. Peran et al. // *Translational Research*, 2015. – Vol. 165, № 4. – P. 464–479.

28. McMillan A.C. Induction of thermogenesis in brown and beige adipose tissues: molecular markers, mild cold exposure and novel therapies / A.C. McMillan, M.D. White // *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*, 2015. – Vol. 22, № 5. – P. 347–352.

29. Sellix M.T. For Management of Obesity and Diabetes: Is Timing the Answer? / M.T. Sellix // *Endocrinology*, 2016. – Vol. 157, № 12. – P. 4545–4549.

30. Yamada R.G. Compass in the data ocean: Toward chronotherapy / R.G. Yamada, H.R. Ueda // *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2017. – Vol. 114, № 20. – P. 5069–5071.

31. Chronomedicine and type 2 diabetes: shining some light on melatonin / A.C. Forrestel, S.U. Miedlich, M. Yurcheshen et al. // *Diabetologia*, 2017. – Vol. 60, № 5. – P. 808–822.

32. Effect of C60 fullerene nanoparticles on the diet-induced obesity in rats / T. Halenova, N. Raksha, T. Vovk et al. // *International journal of obesity* (2005), 2018. – Vol. 42, № 12. – P. 1987–1998.

33. Adipose-specific deficiency of fumarate hydratase in mice protects against obesity, hepatic steatosis, and insulin resistance / H. Yang, J.W. Wu, S.P. Wang et al. // *Diabetes*, 2016. – Vol. 65, № 11. – P. 3396–3409.

34. Increased inflammation, oxidative stress and mitochondrial respiration in brown adipose tissue from obese mice / M. Alcalá, M. Calderon-Dominguez, E. Bustos et al. // *Scientific reports*, 2017. – Vol. 7, № 16082.DOI:10.1038/s41598-017-16463-6.

35. Gao A.W. Mitochondrial fission: firing up mitochondria in brown adipose tissue / A.W. Gao, R.H. Houtkooper // *The EMBO journal*, 2014. – Vol. 33, № 5. – P. 401–402.

36. Roberts-Toler C. Diet-induced obesity causes insulin resistance in mouse brown adipose tissue / C. Roberts-Toler, B.T. O'Neill, A.M. Cypess // *Obesity*, 2015. – Vol. 23, № 9. – P. 1765–1770.

37. Kojetin D.J. REV-ERB and ROR nuclear receptors as drug targets / D.J. Kojetin, T.P. Burris // *Nature reviews Drug discovery*, 2014. – Vol. 13, № 3. – P. 197–216.

38. Circadian clocks and insulin resistance / D.J. Stenvers, F.A. Scheer, P. Schrauwen et al. // *Nature Reviews Endocrinology*, 2019. – Vol. 15. – P. 75–86.

39. Brown adipose tissue exhibits a glucose-responsive thermogenic biorhythm in humans / P. Lee, R. Bova, L. Schofield et al. // *Cell metabolism*, 2016. – Vol. 23, № 4. – P. 602–609.

40. Kalmukova O. The effects of different time of melatonin administration on differentiation and functional status of the brown adipocytes in vivo / O. Kalmukova, M.E. Dzerzhinsky // *Cell and Organ Transplantation*, 2018. – Vol. 6, № 1. – P. 80–85.

41. Significance and application of melatonin in the regulation of brown adipose tissue metabolism: relation to human obesity / D.X. Tan, L.C. Manchester, L. Fuentes-Broto et al. // *Obesity Reviews*, 2011. – Vol. 12, № 3. – P. 167–188.

42. Melatonin Multiple Effects on Brown Adipose Tissue Molecular Machinery / C.A.P. de Souza, C. Congentino Gallo, L. Scodeler de Camargo et al. // *Journal of pineal research*, 2018. – e12549.doi:10.1111/jpi.12549

43. Oelkrug R. Brown adipose tissue: physiological function and evolutionary significance / R. Oelkrug, E.T. Polymeropoulos, M. Jastroch // *Journal of comparative physiology B*, 2015. – Vol. 185, № 6. – P. 587–606.

44. Tan D.X. Mitochondria: the birth place, battle ground and the site of melatonin metabolism in cells / D.X. Tan, R.J. Reiter // *Melatonin Research*, 2019. – Vol. 2, № 1. – P. 44–66.

45. Cecon E. Melatonin receptors: molecular pharmacology and signalling in the context of system bias / E. Cecon, A. Oishi, R. Jockers // *British journal of pharmacology*, 2018. – Vol. 175, № 16. – P. 3263–3280.

46. Kalmukova O. The effects of different mode of melatonin administration on the development of high-calorie diet-induced obesity in rats / O. Kalmukova, A. Yurchenko, M. Dzerzhinsky // *Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv-Problems of Physiological Functions Regulation*, 2018. – Vol. 25, № 2. – P. 19–25.

47. Kalmukova O. Effect of melatonin different time administration on the development of diet-induced obesity in rats / O. Kalmukova, A. Pustovalov, I. Varenuk // *Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv-Problems of Physiological Functions Regulation*, 2018. – Vol. 23, № 2. – P. 20–27.

48. Melatonin Increases Brown Adipose Tissue Volume and Activity in Melatonin Deficient Patients: a Proof-of-Concept Study / B. Halpern, M.C. Mancini, C. Bueno et al. // *Diabetes*, 2019; db180956.<https://doi.org/10.2337/db18-0956>.

49. Fernández Vázquez G. Melatonin increases brown adipose tissue mass and function in Zucker diabetic fatty rats: implications for obesity control / G. Fernández Vázquez, R.J. Reiter, A. Agil // *Journal of pineal research*, 2018. – 64(4). – e12472–12482.

50. Hagelstein K.A. Effects of photoperiod, cold acclimation and melatonin on the white rat / K.A. Hagelstein, Jr.G.E. Folk // *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 1979. – Vol. 62(2). P. 225–229.

Reference (Scopus):

1. García-Jiménez C., Gutiérrez-Salmerón M., Chocarro-Calvo A., García-Martínez J. M., Castaño A., De la Vieja A. From obesity to diabetes and cancer: epidemiological links and role of therapies. *British journal of cancer*. 2016; 114(7): 716–722.

2. Ng M., Fleming T., Robinson M., Thomson B., Graetz N., Margono C., et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet*. 2014; 384(9945): 766–781.

3. The official data of the WHO Bulletin published in May 2017. Available from: <http://www.who.int>

4. Razzoli M., Frontini A., Gurney A., Mondini E., Cubuk C., Katz L. S., et al. Stress-induced activation of brown adipose tissue prevents obesity in conditions of low adaptive thermogenesis. *Molecular metabolism*. 2016; 5(1): 19-33.
5. Cinti S. The role of brown adipose tissue in human obesity. *Nutrition, metabolism and cardiovascular diseases*. 2006;16(8): 569-574.
6. Poher A. L., Altirriba J., Veyrat-Durebex C., Rohner-Jeanrenaud F. Brown adipose tissue activity as a target for the treatment of obesity/insulin resistance. *Frontiers in physiology*. 2015;6 (4): 1-9.
7. Tapia P., Fernández-Galilea M., Robledo F., Mardones P., Galgani J. E., Cortés V. A. Biology and pathological implications of brown adipose tissue: promises and caveats for the control of obesity and its associated complications. *Biological Reviews*. 2018; 93(2): 1145-1164.
8. Cannon B., Nedergaard J. A. N. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiological reviews*. 2004; 84(1): 277-359.
9. Nedergaard J., Bengtsson T., Cannon B. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2007; 293: E444-E452.
10. Cypess A. M., Lehman S., Williams S., Tal I., Rodman D., Goldfine A. B., et al. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *New England Journal of Medicine*. 2009;360(15): 1509-1517.
11. van Marken Lichtenbelt W. D., Vanhommerig J. W., Smulders N. M., Drossaerts J. M., Kemerink G. J., Bouvy N. D., et al. Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *New England Journal of Medicine*. 2009;360(15):1500-1508.
12. Cypess A. M., Weiner L. S., Roberts-Toler C., Elia E. F., Kessler S. H., Kahn P. A., et al. Activation of human brown adipose tissue by a β 3-adrenergic receptor agonist. *Cell metabolism*. 2015;21(1): 33-38.
13. Crane J. D., Palanivel R., Mottillo E. P., Bujak A. L., Wang H., Ford R. J., et al. Inhibiting peripheral serotonin synthesis reduces obesity and metabolic dysfunction by promoting brown adipose tissue thermogenesis. *Nature medicine*. 2015;21(2): 166-172.
14. Liu X., Wang S., You Y., Meng M., Zheng Z., Dong M., et al. Brown adipose tissue transplantation reverses obesity in Ob/Ob mice. *Endocrinology*. 2015; 156(7): 2461-2469.
15. Butler, M., Kriegsfeld, L. J., & Silver, R. Circadian regulation of endocrine functions. In *Hormones, Brain and Behavior* Online Elsevier Inc.; 2010. p. 473-507.
16. Korkmaz A., Topal T., Tan D. X., Reiter R. J. Role of melatonin in metabolic regulation. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*. 2009; 10(4): 261-270.
17. Reiter R. J., Tan D. X., Manchester L. C., Paredes S. D., Mayo J. C., Sainz R. M. Melatonin and reproduction revisited. *Biology of reproduction*. 2009;81(3): 445-456.
18. Guerrero J. M., Reiter R. J. Melatonin-immune system relationships. *Current topics in medicinal chemistry*. 2002;2(2): 167-179.
19. Jenwitheesuk A., Nopparat C., Mukda S., Wongchitrat P., Govitrapong P. Melatonin regulates aging and neurodegeneration through energy metabolism, epigenetics, autophagy and circadian rhythm pathways. *International journal of molecular sciences*. 2014;15(9): 16848-16884.
20. Srinivasan V., Maestroni G. J. M., Cardinali D. P., Esquifino A. I., Perumal S. P., Miller S. C. Melatonin, immune function and aging. *Immunity & Ageing*. 2005;2(17):E 1-10.
21. Garaulet M., Gómez-Abellán P., Madrid J. A. Chronobiology and obesity: the orchestra out of tune. *Clinical Lipidology*. 2010;5(2): 181-188.
22. Gómez-Abellán P., Madrid J. A., Ordóñez J. M., Garaulet M. Chronobiological aspects of obesity and metabolic syndrome. *Endocrinología y Nutrición (English Edition)*. 2012;59(1): 50-61.
23. Torres - Farfan C., Valenzuela F. J., Mondaca M., Valenzuela G. J., Krause B., Herrera E. A., et al. Evidence of a role for melatonin in fetal sheep physiology: direct actions of melatonin on fetal cerebral artery, brown adipose tissue and adrenal gland. *The Journal of physiology*. 2008;586(16): 4017-4027.
24. Brydon L., Petit L., Delagrè P., Strosberg A. D., Jockers R. Functional expression of MT2 (Mel1b) melatonin receptors in human PAZ6 adipocytes. *Endocrinology*. 2001;142(10): 4264-4271.
25. Tan D. X., Manchester L., Qin L., Reiter R. Melatonin: a mitochondrial targeting molecule involving mitochondrial protection and dynamics. *International journal of molecular sciences*. 2016;17(2124): E1-21.
26. Yang F., Zhang L., Zhu W. Adaptive thermogenesis of brown adipose tissue in tree shrews (*Tupaia belangeri*): Role of melatonin. *Journal of Zoological And Bioscience Research*. 2017;1(4): 1-7.
27. Roman S., Agil A., Peran M., Alvaro-Galve E., Ruiz-Ojeda F. J., Fernandez-Vazquez G., et al. Brown adipose tissue and novel therapeutic approaches to treat metabolic disorders. *Translational Research*. 2015;165(4):464-479.
28. McMillan A. C., White M. D. Induction of thermogenesis in brown and beige adipose tissues: molecular markers, mild cold exposure and novel therapies. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*. 2015;22(5):347-352.
29. Sellix M. T. For Management of Obesity and Diabetes: Is Timing the Answer?. *Endocrinology*. 2016; 157(12):4545-4549.
30. Yamada R. G., Ueda H. R. Compass in the data ocean: Toward chronotherapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2017;114(20): 5069-5071.
31. Forrestel A. C., Miedlich S. U., Yurcheshen M., Wittlin S. D., Sellix M. T. Chronomedicine and type 2 diabetes: shining some light on melatonin. *Diabetologia*. 2017; 60(5): 808-822.
32. Halenova T., Raksha N., Vovk T., Savchuk O., Ostapchenko L., Prylutsky Y., et al. Effect of C60 fullerene nanoparticles on the diet-induced obesity in rats, *International Journal of Obesity*. 2018; 42:1987-1998.
33. Yang H., Wu J. W., Wang S. P., Severi I., Sartini L., Frizzell N., et al. Adipose-specific deficiency of fumarate hydratase in mice protects against obesity, hepatic steatosis, and insulin resistance. *Diabetes*. 2016;65(11):3396-3409.
34. Alcalá M., Calderon-Dominguez M., Bustos E., Ramos P., Casals N., Serra D., et al. Increased inflammation, oxidative stress and mitochondrial respiration in brown adipose tissue from obese mice. *Scientific reports*. 2017; 7: 16082. DOI:10.1038/s41598-017-16463-6
35. Gao A. W., Houtkooper R. H. Mitochondrial fission: firing up mitochondria in brown adipose tissue. *The EMBO journal*. 2014; 33(5): 401-402.
36. Roberts - Toler C., O'Neill B. T., Cypess A. M. Diet - induced obesity causes insulin resistance in mouse brown adipose tissue. *Obesity*. 2015; 23(9): 1765-1770.
37. Kojetin D. J., Burris T. P. REV-ERB and ROR nuclear receptors as drug targets. *Nature reviews Drug discovery*. 2014;13(3): 197-216.
38. Stenvers D. J., Scheer F. A., Schrauwen P., la Fleur S. E., Kalsbeek A. Circadian clocks and insulin resistance. *Nature Reviews Endocrinology*. 2019;15: 75-86.
39. Lee P., Bova R., Schofield L., Bryant W., Dieckmann W., Slatery A., et al. Brown adipose tissue exhibits a glucose-responsive thermogenic biorhythm in humans. *Cell metabolism*. 2016;23(4): 602-609.
40. Kalmukova O., Dzerzhinsky M. The effects of different time of melatonin administration on differentiation and functional status of the brown adipocytes in vivo. *Cell and Organ Transplantation*. 2018; 6(1): 80-85.
41. Tan D. X., Manchester L. C., Fuentes - Broto L., Paredes S. D., Reiter R. J. Significance and application of melatonin in the regulation of brown adipose tissue metabolism: relation to human obesity. *Obesity Reviews*. 2011; 12(3): 167-188.
42. de Souza C. A. P., Congentino Gallo C., Scodeler de Camargo L., Vargas Versignassi de Carvalho P., Fernandes Olesguck I., Macedo F., et al. Melatonin Multiple Effects on Brown Adipose Tissue Molecular Machinery. *Journal of pineal research*. 2018;e12549.doi: 10.1111/jpi.12549
43. Oelkrug R., Polymeropoulos E. T., Jastroch M. Brown adipose tissue: physiological function and evolutionary significance. *Journal of comparative physiology B*. 2015; 185(6): 587-606.
44. Tan D. X., Reiter R. J. Mitochondria: the birth place, battle ground and the site of melatonin metabolism in cells. *Melatonin Research*. 2019; 2(1): 44-66.
45. Cecon E., Oishi A., Jockers R. Melatonin receptors: molecular pharmacology and signalling in the context of system bias. *British journal of pharmacology*. 2018; 175(16): 3263-3280.
46. Kalmukova O., Yurchenko A., Dzerzhinsky M. The effects of different mode of melatonin administration on the development of high-calorie diet-induced obesity in rats. *Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv-Problems of Physiological Functions Regulation*. 2018; 25(2): 19-25.
47. Kalmukova O., Pustovalov A., Varenjuk I., Dzerzhinsky M. Effect of melatonin different time administration on the development of diet-induced obesity in rats. *Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv-Problems of Physiological Functions Regulation*. 2018;23(2): 20-27.
48. Halpern B., Mancini M. C., Bueno C., Barcelos I. P., de Melo M. E., Lima M. S., et al. Melatonin Increases Brown Adipose Tissue Volume and Activity in Melatonin Deficient Patients: a Proof-of-Concept Study. *Diabetes*. 2019; db180956. <https://doi.org/10.2337/db18-0956>
49. Fernández Vázquez G., Reiter R. J., Agil A. Melatonin increases brown adipose tissue mass and function in Zucker diabetic fatty rats: implications for obesity control. *Journal of pineal research*. 2018;64(4): e12472-12482.
50. Hagelstein K. A., Folk Jr G. E. Effects of photoperiod, cold acclimation and melatonin on the white rat. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*. 1979;62(2): 225-229.

Надійшла до редколегії 05.02.2019

Отримано виправлений варіант 05.03.2019

Підписано до друку 05.03.2019

Received in the editorial 05.02.2019

Received a revised version on 05.03.2019

Signed in the press on 05.03.2019

О. Калмыкова, асп., М. Держинський, д-р біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

ВПЛИВ ВВЕДЕННЯ МЕЛАТОНІНУ В РІЗНИЙ ЧАС ДОБИ НА БУРУ ЖИРОВУ ТКАНИНУ ЩУРІВ ІЗ ВИСОКОКАЛОРИЙНИМ ОЖИРІННЯМ

Метою нашого дослідження було визначення морфофункціонального стану (площі ядра, бурих адипоцитів, площі і кількості ліпідних включень у кожній клітині, загальної оптичної щільності тканини) бурої жирової тканини у щурів з індукованою дією (висококалорійною) ожирінням після введення мелатоніну в різний час доби (вранці і ввечері). Мелатонін вводили щоденно перорально за допомогою зонда протягом 7 тижнів у дозі 30 мг/кг або за 1 год після еклюдіння (ZT01), або за 1 год перед вимкненням світла (ZT11) щурів з висококалорійною дією (ВКД). Окрім морфометричних параметрів також вимірювали відносну масу вісцеральної білої і бурої жирової тканини. У щурів з ВКД знайдені значні зміни в морфології бурих адипоцитів, які загалом наближуються до морфології класичних білих адипоцитів: зростає площа ліпідних включень і клітин, проте відповідно знижується кількість ліпідних включень та оптична щільність бурої жирової тканини. Такі морфометричні зміни бурої жирової тканини у щурів ВКД свідчать про зниження її здатності до теплопродукції. Після введення мелатоніну щурам з ВКД спостерігається нівелювання патологічних змін у бурій жировій тканині, які пов'язані з споживанням ВКД. У групах ВКД ZT01 і ВКД ZT11 показано зменшення площі клітин і ліпідних включень, а також збільшення кількості ліпідних включень та оптичної щільності бурої жирової тканини щодо групи ВКД. Отримані зміни свідчать про функціонально активний стан бурої жирової тканини, яка, у свою чергу, може працювати на розсіювання надлишкової енергії (у вигляді ліпідів – триацилгліцеридів) для теплопродукції, водночас уникаючи її надмірного запасання в білій жировій тканині та поза нею (в інших органах). Вечірнє введення мелатоніну (група ВКД ZT11) демонструє більш виражений стан активації бурої жирової тканини та зниження відносної маси вісцеральної жирової тканини порівняно з ранковими введеннями (група ВКД ZT01). Отже, мелатонін змінює морфофункціональний стан бурої жирової тканини у щурів з ВКД, причому, вечірнє введення може застосовуватися для терапії ожиріння через його сильну дію на активацію бурих адипоцитів (на відміну від ранкового).

Ключові слова: мелатонін, ожиріння, хронотерапія, адипоцити, висококалорійна дієта, бура жирова тканина.

О. Калмыкова, асп., Н. Держинський, д-р биол. наук
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

ВЛИЯНИЕ ВВЕДЕНИЯ МЕЛАТОНИНА В РАЗНОЕ ВРЕМЯ СУТОК НА БУРОЮ ЖИРОВУЮ ТКАНЬ КРЫС С ВИСОКОКАЛОРИЙНЫМ ОЖИРЕНИЕМ

Цель нашего исследования – определение морфофункционального состояния (площади ядра, бурых адипоцитов, а также площади и количества липидных включений в каждой клетке, общей оптической плотности ткани) бурой жировой ткани у крыс с индуцированной диетой (высококалорийной) ожирением после введения мелатонина в разное время суток (утром и вечером). Мелатонин вводили ежедневно перорально с помощью зонда в течение 7 недель в дозе 30 мг/кг или за 1 ч после включения (ZT01) или за 1 ч перед выключением света (ZT11) крысам с высококалорийной диетой (ВКД). Кроме морфометрических параметров также измеряли относительную массу белой висцеральной и бурой жировой ткани. У крыс с ВКД найдены значительные изменения в морфологии бурых адипоцитов, которые в целом приближаются к морфологии классических белых адипоцитов: растет площадь липидных включений и клеток, однако снижается количество липидных включений и оптическая плотность бурой жировой ткани. Такие морфометрические изменения бурой жировой ткани у крыс ВКД свидетельствуют о снижении ее способности к теплопродукции. После введения мелатонина крысам с ВКД наблюдается нивелирование патологических изменений в бурой жировой ткани, которые связаны с потреблением ВКД. В группах ВКД ZT01 и ВКД ZT11 показано уменьшение площади клеток и липидных включений, а также увеличение их количества (липидных включений) и оптической плотности бурой жировой ткани, касательно группы ВКД. Полученные изменения свидетельствуют о функционально активном состоянии бурой жировой ткани, которая, в свою очередь, может работать на рассеивание избыточной энергии (в виде триацилглицеридов) для теплопродукции, в то же время, избегая чрезмерного запасания липидов в белой жировой ткани и вне ее (в других органах). Вечернее введение мелатонина (группа ВКД ZT11) демонстрирует более выраженное состояние активации бурой жировой ткани и снижение относительной массы висцеральной жировой ткани по сравнению с утренними приемами (группа ВКД ZT01). Итак, мелатонин влияет и изменяет морфо-функциональное состояние бурой жировой ткани у крыс с ВКД, причем, вечернее введение может применяться для терапии ожирения из-за его сильного воздействия на активацию бурых адипоцитов (в отличие от утреннего).

Ключевые слова: мелатонин, ожирение, хронотерапия, адипоциты, высококалорийная диета, бурая жировая ткань.

УДК 57.012.4:581.43:582.683.2:537.533.35

С. Романчук, мол. наук. співроб.
Інститут ботаніки імені М.Г. Холодного НАН України, Київ, Україна

УЛЬТРАСТРУКТУРА ЕР-ТІЛЕЦЬ У СТАТОЦИТАХ І КЛІТИНАХ ДИСТАЛЬНОЇ ЗОНИ РОЗТЯГУ КОРЕНЕВИХ АПЕКСІВ *ARABIDOPSIS THALIANA* (L.) НЕУНН. ПІД ДІЄЮ Х-ОПРОМІНЕННЯ

Серед видів рослин, які використовувались в космічних і наземних експериментах, найбільш стійкими до радіаційного випромінювання вважаються представники родини Brassicaceae. Передбачається, що ЕР-тілець, які є похідними гранулярного ендоплазматичного ретикулула і селективно накопичують фермент β-глюкозидазу (РҮК 10), відповідають за цю стійкість. Мета дослідження – вивчити ультраструктуру статоцитів і клітин дистальної зони розтягу кореневих апексів проростків *A.thaliana* в контролі та під дією Х-опромінення, зважаючи на топографію гранулярного ендоплазматичного ретикулула та ЕР-тілець. Проростки вирощували на живильному агаризованому середовищі. Опромінення проростків здійснювали рентгенівськими променями на приладі РҮМ-17 (Росія) (потужність дози 0,43 сГр/с) у дозах 0,5 Гр, 1 Гр, 2 Гр, 4 Гр, 6 Гр, 8 Гр, 10 Гр та 12 Гр. Апекси коренів фіксували в суміші смол епон-аралдит. Ультратонкі поздовжні зрізи досліджували на трансмісійному електронному мікроскопі JEM-1230 EX (Jeol, Японія). Показано подібність до контролю й відмінність ультраструктури статоцитів і клітин дистальної зони розтягу кореневих апексів проростків *A.thaliana* при дії Х-опромінення. Встановлено збільшення кількості профілей гранулярного ендоплазматичного ретикулула та загальної площі ЕР-тілець на зріз клітини через 2 год і через 10 діб після Х-опромінення більш ніж у 2 рази щодо контролю. Виявлено варіабельність ЕР-тілець за формою і розмірами, що залежала від дози рентгенівських променів. Характер таких перебудов у клітині може свідчити про певні зміни метаболізму, що здійснюються в діапазоні фізіологічної відповіді клітини. Уперше вивчено вплив Х-опромінення на динаміку утворення ЕР-тілець, похідних гранулярного ендоплазматичного ретикулула, у статоцитах та клітинах дистальної зони розтягу кореневих апексів проростків *A.thaliana*. Збільшення обсягу ЕР-тілець, які містять фермент β-глюкозидазу (РҮК 10), розглядається як адаптивна реакція клітини на дію іонізуючої радіації.

Ключові слова: ЕР-тілець, гранулярний ендоплазматичний ретикулум, ультраструктура, електронна мікроскопія, Х-опромінення, *Arabidopsis thaliana*.

Вступ. Рослини виступають головним компонентом автотрофної ланки біореєнеративних систем життєзабезпечення космонавтів [22], тому актуальними є дос-

лідження впливу на рослини двох основних факторів космічного польоту – мікрогравітації та іонізуючої радіації. Біологічні ефекти впливу космічної радіації на ріст

та розвиток рослин досліджуються як у космічному польоті, так і в наземних експериментах [5, 7]. Космічне випромінювання за рахунок високої енергії глибоко проникає у матерію. У залежності від зовнішньої та внутрішньої обшивки космічного корабля, а також обладнання, яке встановлено на борту, товщина захисного шару від радіаційних променів становить 1–30 см [8]. Згідно з даними НАСА (США) дози в кабіні космічного корабля, які впливають на живі організми, коливаються в діапазоні від 5 до 12 мГр за годину [9]. Відповідь різних видів рослин на іонізуюче випромінювання залежить від його природи, дози та тривалості дії, а також видової належності рослини та її фізіологічного стану [3]. Серед видів рослин, які використовувались у космічних і наземних експериментах, найбільш стійкими до радіаційного випромінювання вважаються представники родини Brassicaceae, до якої належить *Arabidopsis thaliana* [4, 7].

Види Brassicaceae характеризуються наявністю в клітинах похідних гранулярного ендоплазматичного ретикулуму (ГЕР) – ЕР-тілець, які вперше були описані в клітинах коренів *Raphanus sativus* [2] і пізніше названі "бонетками" на честь науковця, який їх відкрив. Надалі більш детально ЕР-тілець, які звичайно мали розміри менше 1 мкм та були оточені рибосомами, описані у клітинах коренів *Arabis alpina*, *Brassica oleracea*, *Capparis spinosa* та *Cleome spinosa*, їх називали "таємничими органелами", тому що їхня функція залишалася невідомою. На сьогодні відомо, що ЕР-тілець в клітинах *A. thaliana* [6] вибірково накопичують фермент β -глюкозидазу (РНК 10) з сигналом утримання в компартментах ЕР [14]. β -глюкозидаза (глюкозидглюкогідролаза, КФ 3.2.1.21) належить до класу глікозилгідролаз та гідролізує арил- та алкіл- β -D-глюкозиди, а також такі глюкозиди, як целюлоза та інші β -зв'язані олігосахариди [11]. Показано, що ЕР-тілець в клітинах *A. thaliana* характеризуються високою лабільністю і чутливістю до таких зовнішніх впливів, як симульована мікрогравітація (кліностатування) [20], механічне пошкодження поверхневих тканин рослини [15, 18], дія гормонів [15, 16], колонізація коренів рослини ендоефітними грибами та бактеріями [17, 21]. Внаслідок дії вказаних чинників кількість та розмір ЕР-тілець у клітинах збільшувалися порівняно з контролем.

У дослідженнях структурно-функціонального стану клітин кореня в умовах реальної мікрогравітації в космічному польоті та кліностатування основна увага приділялася клітинам кореневого чохла як гравірецепторному апарату кореня [24]. Встановлено, що клітини дистальної зони розтягу (ДЗР), які є неспеціалізованими до сприйняття гравітації, реагують на зміни сили тяжіння змінами ультраструктури і метаболізму [12]. Також показано чутливість клітин ДЗР до зовнішніх стимулів, таких як механічний вплив, дія іонів металів, кисню і ауксину [10, 13]. Оскільки раніше нами показано чутливість ЕР-тілець до кліностатування [20], метою даної роботи було дослідити ультраструктуру та топографію ГЕР і ЕР-тілець у статочитах і клітинах ДЗР кореневих апексів проростків *A. thaliana* в контролі та при X-опроміненні.

Матеріали і методи. Проростки *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., екотип Columbia (Col-0) вирощували з насіння у стерильних умовах. Стерилізацію насіння здійснювали 70 % розчином етилового спирту та 12 % розчином гіпохлориту натрію з п'ятиразовим промиванням стерильною дистильованою водою. Перед посівом на живильне середовище Мурасіге та Скуга насіння стратифікували при температурі +4 °C протягом 3 діб. Після чого висівали у чашки Петрі діаметром 120 мм по 100–120 насінин у кожну. Проростки росли за освітлення 93 мкмоль·м⁻²·с⁻¹ із фотоперіодом 16/8 год (світло/темрява) при температурі 22–24 °C та вологості 67±1 % протягом трьох та 13-ти діб з моменту проростання насіння. Тридобові проростки, що росли в окремих чашках Петрі, опромінювали рентгенівськими променями на приладі РУМ-17 (потужність дози 0,43 сГр/с) у дозах 0,5 Гр, 1 Гр, 2 Гр, 4 Гр, 6 Гр, 8 Гр, 10 Гр та 12 Гр. У експериментах досліджували проростки через 2 год та 10 діб після X-опромінення. Для контролю використовували тридобові та 13-тидобові проростки, які не були опромінені.

Апекси коренів довжиною 3–10 мм фіксували в 2,5 % розчині глутарового альдегіду на 0,1 М кокодилатному буфері (рН=7,2) при кімнатній температурі протягом 3 год, двічі промивали тим самим буфером для видалення надлишку фіксатора. Постфіксацію проводили 1 % розчином OsO₄ на кокодилатному буфері (рН=7,2) при температурі 4 °C протягом 4 год. Після цього апекси коренів промивали дистильованою водою та зневоднювали у серії спиртів висхідної концентрації та ацетоні, заливали в суміш смол епон-аралдит за стандартним методом [23]. Тонкі поздовжні зрізи корневих апексів завтовшки 50–70 нм отримували на ультрамикротомі MT-XL (RMR Instruments, США), поміщали на бленди з підкладкою із формвара та контрастували уранієм ацетатом і цитратом свинцю [19]. Зрізи досліджували на трансмісійному електронному мікроскопі JEM-1230 EX (Jeol, Японія) та фотографували на фототехнічну плівку Agfa (Agfa, Бельгія). Отримані негативи мікрофотографій зі збільшенням 3000–25000 сканували за допомогою програми HP Precisionscan Pro 3.1 (HewlettPackard, США). Отримані цифрові зображення аналізували за допомогою програмного забезпечення UTHSCSA ImageTool v. 3.0.

Всі дослідження проводили не менше ніж у трьох біологічних і трьох аналітичних повторях. Обробку даних було проведено за допомогою програми Excel пакету MicrosoftOffice 2010. Всі отримані числові значення тестували на нормальність розподілу значень у вибірці. Визначення достовірності різниці отриманих даних здійснювали за критерієм Стюдента (T-test) (p≤5 %) для незалежних вибірок з нормальним розподілом і критерієм Манна-Уїтні (U-test) (p≤5 %) для незалежних вибірок з розподілом, що відрізнявся від нормального [1].

Результати та обговорення. У контролі в апексах коренів три- та 13-тидобових проростків *A. thaliana* морфологічно виділялися кореневий чохлак, зона меристеми, ДЗР, центральна зона розтягу (ЦЗР) (рис. 1) та зона корневих волосків.

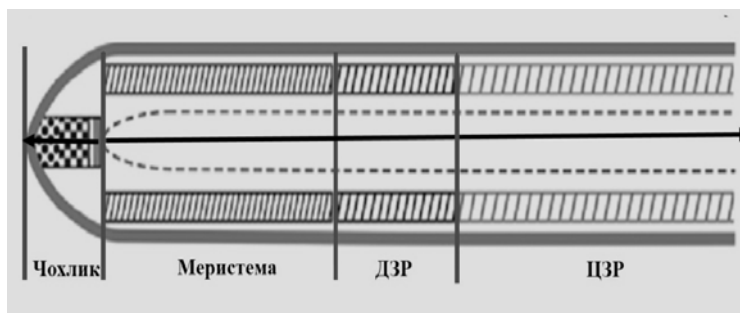


Рис. 1. Схема будови кореневого апекса *A. thaliana*.
ДЗР – дистальна зона розтягу, ЦЗР – центральна зона розтягу.
Стрілками вказано напрями диференціювання клітин

Диференціювання меристематичних клітин відбувалося в двох протилежних напрямках: до апікальної частини кореня (кореневого чохла) та до його базальної частини (ростових зон власне кореня). Колумела кореневого чохла зазвичай складалася із шести рядів клітин: перші два ряди від центра спокою в апікальному напрямі – меристематичні клітини, третій ряд – статоцити, які диференціюються, четвертий ряд – зрілі статоцити, п'ятий та шостий ряди – секреторні клітини. Зона розтягу власне кореня до центрального циліндра складалася з трьох шарів клітин – епідермісу, одного шару кори та ендодерми. У тридобових проростків ДЗР починалася приблизно на відстані $145,18 \pm 1,66$ мкм від верхівки кореня. У шарі кори ДЗР до центральної зони розтягу налічувалося чотири клітини. Кореневі апекси 13-тидобових проростків контролю морфологічно були подібні до таких у тридобових. Звичайно з ростом проростків збільшувалася довжина корневих апексів, при цьому ДЗР починалася приблизно на відстані $214,26 \pm 4,38$ мкм від верхівки кореня. У корневих апексах тридобових проростків статоцити мали середню довжину $13,98 \pm 5,06$ мкм та середню ширину $34,69 \pm 8,43$ мкм, у 13-тидобових проростків – $19,18 \pm 4,87$ мкм і $43,05 \pm 6,74$ мкм, відповідно. Середня довжина та середня ширина клітин ДЗР була такою: у тридобових проростків – $13,53 \pm 1,05$ мкм і $14,02 \pm 0,98$ мкм у 13-тидобових проростків – $16,98 \pm 2,43$ мкм і $17,56 \pm 2,57$ мкм, відповідно.

Морфологія апексів коренів проростків *A. thaliana* через 2 год та через 10 діб після Х-опромінення в дозах 0,5 Гр, 1 Гр, 2 Гр, 4 Гр, 6 Гр, 8 Гр, 10 Гр та 12 Гр достовірно не відрізнялася від такої контрольних проростків. Порушень у диференціюванні клітин корневих апексів не відмічали. У тридобових проростків ДЗР починалася приблизно на відстані $143,78 \pm 3,16$ мкм від верхівки кореня, у 13-тидобових – на відстані $214,32 \pm 5,17$ мкм. Через 2 год та через 10 діб після Х-опромінення достовірної різниці в розмірах статоцитів та клітин ДЗР не спостерігали. Середні розміри статоцитів у корневих апексах тридобових проростків були такими: довжина – $14,27 \pm 4,43$ мкм, ширина – $34,17 \pm 8,85$ мкм, у 13-тидобових проростків – $19,54 \pm 4,62$ мкм і $42,68 \pm 6,12$ мкм, відповідно. Клітини ДЗР корневих апексів тридобових проростків мали такі середні розміри: дов-

жина – $13,97 \pm 0,72$ мкм, ширина – $14,06 \pm 1,04$ мкм, 13-тидобових проростків – $16,95 \pm 2,47$ мкм і $17,52 \pm 2,61$ мкм відповідно.

У три- та 13-тидобових проростків *A. thaliana* в контролі статоцити кореневого чохла мали видовжену форму та характеризувалися полярністю: ядро, яке мало лопатоподібну форму, рідше округлу або овальну, знаходилося в проксимальній частині клітини, а амілопласти із щільно упакованими крохмальними зернами – в дистальній. Кількість крохмальних зерен округлої, овальної або неправильної форми варіювала в амілопластах у залежності від їхнього розміру. Гіалоплазма відрізнялася високою електронною щільністю за рахунок великої кількості вільних рибосом, місцями спостерігалися невеликі електронно прозорі ділянки. Дрібні вакуолі переважно округлої форми з електронно прозорим або гранулярним вмістом середньої електронної щільності у незначній кількості переважно локалізувалися біля ядра. Мітохондрії мали здебільшого овальну, округлу або видовжену форму, розвинену систему крист та електронно щільний матрикс, у якому спостерігалися електронно прозорі ділянки. Поодинокі диктіосоми складалися із 4-5 цистерн. Мітохондрії та диктіосоми розміщувалися відносно рівномірно по всій цитоплазмі. Агранулярний ЕР (АЕР) був слабо розвинений та представлений на зрізах статоцитів поодинокими профілями. Невеликі канали ГЕР головним чином розміщувалися вздовж клітинної стінки та біля амілопластів-статолітів, найбільші його скупчення містилися в дистальній та проксимальній частинах статоцитів. Вміст каналців та цистерн ГЕР був заповнений електронно щільною тонкофібрилярною речовиною. Візуально на рахували 1–3 профілей ГЕР на зріз статоцита кореневого апекса тридобових проростків та 3–5 профілей ГЕР на зріз статоцита 13-тидобових проростків. У тридобових проростків у зоні профілей ГЕР розміщувалися ЕР-тілця, округлі за формою, з електронно щільним тонкофібрилярним вмістом, мембрана яких була вкрита рибосомами (рис. 2). Кількість ЕР-тілець на зріз статоцита була 1-2 у тридобових проростків, при цьому середні розміри органел становили $0,0098 \pm 0,007$ мкм². У 13-ти добових проростків на зрізах статоцитів ЕР-тілець не спостерігали.

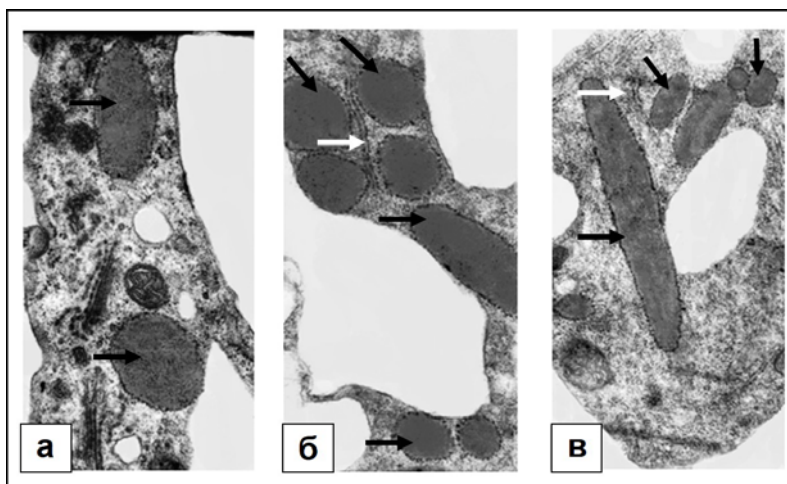


Рис. 1. Фрагменти клітин дистальної зони розтягу кореневого апекса *A. thaliana* в контрольних рослинах і через 10 діб після Х-опромінення:

а – контроль, б – доза 0,5 Гр, в – доза 8 Гр.

Стрілками білого кольору вказано гранулярний ендоплазматичний ретикулум, стрілками чорного кольору вказано ЕР-тілця.

Трансмісійна електронна мікроскопія. Масштаб – 200 нм

У контролі перші від меристеми дві клітини ДЗР у три- та 13-тидобових проростків *A. thaliana* містили по одному ядру округлої форми, яке було розташоване в центрі клітини, у третій та четвертій клітинах ядро набувало лопатоподібної форми та поступово зміщувалося до периферії клітини. Діаметр ядерця становив більше половини ядра. Іноді в ядрі спостерігалася "вакуоль". Щільність гіалоплазми знижувалася за рахунок зменшення кількості вільних рибосом. Нечисленні та гетерогенні за формою пластиди розташовувалися навколо ядра, деякі з них містили крохмальні зерна. Апарат Гольджі (АГ) перебував в активному стані, про що свідчило продукування диктіосомами численних везикул. Диктіосоми характеризувалися полярністю. Дрібні вакуолі, похідні АГ та ЕР, поступово збільшувалися в об'ємі та зливалися, утворюючи центральну вакуоль. Мітохондрії варіювали за формою та розмірами, а також за кількістю та топографією крист. АЕР на зрізах клітин ДЗР був представлений різними за формою та розмірами розширеними цистернами і везикулами. Значно розгалужені та видовжені цистерни ГЕР простягалися вздовж клітинної стінки та тонопласта. Вміст цистерн та каналів ГЕР був заповнений електронно щільною тонкофібрилярною речовиною. Між клітинною стінкою та тонопластом також знаходилися ЕР-тілця (рис. 2). Візуально на зріз клітини ДЗР тридобових проростків спостерігали 9–12 профілей ГЕР, на зріз клітини ДЗР 13-тидобових проростків 13–19 профілей ГЕР.

ЕР-тілця розміщувалися в безпосередній близькості біля профілей ГЕР. На поверхні ЕР-тілць звичайно були наявні рибосоми, їх вміст був заповнений електронно щільною тонкофібрилярною речовиною. ЕР-тілця на зрізах клітин ДЗР тридобових та 13-тидобових проростків мали округлу та овальну форму. На зріз клітини ДЗР тридобових проростків спостерігали від 8 до 11 ЕР-тілць, розміри яких становили в середньому від $0,011 \pm 0,002$ мкм² до $0,021 \pm 0,005$ мкм². На зрізах клітин ДЗР 13-тидобових проростків спостерігали від 15 до 20 ЕР-тілць середніми розмірами від $0,009 \pm 0,001$ мкм² до $0,028 \pm 0,007$ мкм².

Через 2 год після Х-опромінення в дозах 0,5 Гр, 1 Гр, 2 Гр, 4 Гр, 6 Гр, 8 Гр, 10 Гр та 12 Гр ультраструктура статочитів кореневого чохла тридобових проростків *A. thaliana* у загальних рисах залишалася такою, як у контролі, проте нами виявлено і певні відмінності, особливо в кількості профілей ГЕР та кількості і розмірах ЕР-тілць. Невеликі цистерни та канали ГЕР розміщувалися у дистальній та проксимальній частинах статочита вздовж клітинної стінки та амілопластів-статолітів. Візуально спостерігали збільшення кількості профілей ГЕР на зріз статочита через 2 год після Х-опромінення в різних дозах щодо неопроміненого контролю в середньому в два рази (табл. 1), тобто за різних доз Х-опромінення збільшення профілей ГЕР на зріз статочита було майже однаковим.

Таблиця 1. Кількість профілей гранулярного ендоплазматичного ретикулула на зріз статочита кореневого чохла *A. thaliana* в контролі та при Х-опроміненні в різних дозах, шт

Вік проростків / доба	Параметри	Контроль	Період після Х-опромінення	Доза Х-опромінення							
				0,5 Гр	1 Гр	2 Гр	4 Гр	6 Гр	8 Гр	10 Гр	12 Гр
3	Кількість профілей	2,13 $\pm 0,78^*$	2 год	3,98 $\pm 1,48^*$	4,12 $\pm 1,34^*$	4,06 $\pm 1,41^*$	3,99 $\pm 1,47^*$	4,02 $\pm 1,44^*$	4,23 $\pm 1,23^*$	3,99 $\pm 1,57^*$	4,07 $\pm 1,39^*$
13		4,63 $\pm 0,52^*$	10 діб	10,11 $\pm 2,16^*$	10,32 $\pm 1,95^*$	9,99 $\pm 2,28^*$	10,27 $\pm 2,0^*$	10,23 $\pm 1,24^*$	10,31 $\pm 1,96^*$	10,05 $\pm 2,23^*$	10,18 $\pm 2,10^*$

$M \pm m$; $n=95$; $P=0,05$; t-критерій

Примітка: * – позначено статистично достовірні відмінності між відповідними значеннями.

Поряд з профілями ГЕР спостерігали ЕР-тілця. Як і в контролі, на мембранах ЕР-тілць розміщувалися рибосоми, а їх вміст був заповнений електронно щільною тонкофібрилярною речовиною. Характеристики ЕР-тілць у статочитах корневих апексів тридобових проростків через 2 год після Х-опромінення в різних дозах були однаковими. ЕР-тілця в кількості 3-4 на зріз

статочита були округлої та овальної форми. Середні розміри ЕР-тілць на зріз статочита не відрізнялися при різних дозах Х-опромінення та становили в середньому $0,0099 \pm 0,006$ мкм². Площа ЕР-тілць на зріз статочита через 2 год після Х-опромінення в різних дозах щодо контролю зростала, за рахунок збільшення їхньої кількості (табл. 2).

Таблиця 2. Параметри ЕР-тілць на зріз статочита кореневого чохла *A. thaliana* в контролі та при Х-опроміненні в різних дозах

Вік проростків / доба	Параметри	Контроль	Період після Х-опромінення	Доза Х-опромінення							
				0,5 Гр	1 Гр	2 Гр	4 Гр	6 Гр	8 Гр	10 Гр	12 Гр
3	Площа, мкм ²	0,015 $\pm 0,007^*$	2 год	0,041 $\pm 0,003^*$	0,041 $\pm 0,002^*$	0,040 $\pm 0,004^*$	0,040 $\pm 0,003^*$	0,039 $\pm 0,004^*$	0,038 $\pm 0,006^*$	0,039 $\pm 0,003^*$	0,038 $\pm 0,005^*$
	К-ість, шт	1,52 $\pm 0,38^*$		3,11 $\pm 0,68^*$	3,09 $\pm 0,72^*$	2,99 $\pm 0,78^*$	2,98 $\pm 0,56^*$	2,47 $\pm 0,61^*$	1,92 $\pm 0,57^*$	1,84 $\pm 0,73^*$	1,84 $\pm 0,77^*$
13	Площа, мкм ²	-	10 діб	0,032 $\pm 0,006^*$	0,032 $\pm 0,005^*$	0,032 $\pm 0,005^*$	0,032 $\pm 0,003^*$	0,031 $\pm 0,004^*$	0,031 $\pm 0,003^*$	0,031 $\pm 0,003^*$	0,031 $\pm 0,002^*$
	К-ість, шт	-		2,31 $\pm 0,72^*$	2,28 $\pm 0,64^*$	2,24 $\pm 0,43^*$	2,25 $\pm 0,57^*$	2,23 $\pm 0,52^*$	2,23 $\pm 0,44^*$	2,18 $\pm 0,75^*$	2,19 $\pm 0,78^*$

$M \pm m$; $n=95$; $P=0,05$; t-критерій

Примітка: * – позначено статистично достовірні відмінності між відповідними значеннями.

Через 10 діб після Х-опромінення тридобових проростків *A. thaliana* в дозах 0,5 Гр, 1 Гр, 2 Гр, 4 Гр, 6 Гр, 8 Гр, 10 Гр та 12 Гр ультраструктура статочитів кореневого чохла у загальних рисах була подібною до такої у тридобових проростків через 2 год після Х-опромінення в таких самих дозах. Так само було виявлено певні відмінності щодо контролю в кількості профілей ГЕР та кількості і розмірах ЕР-тілець. Візуально спостерігали збільшення кількості профілей ГЕР на зріз клітини від 4-5 у контролі до 8–13 через 10 діб після Х-опромінення. Середня кількість профілей ГЕР на зріз статочита за різних доз Х-опромінення була подібною (табл. 1). Профілі ГЕР були більш довгими та ширшими порівняно з контролем. Поряд із зростанням кількості профілей ГЕР відмічали появу значної кількості ЕР-тілець (табл. 2), здебільшого округлої, рідше овальної форми. Середні розміри ЕР-тілець на зрізі статочита становили в середньому $0,013 \pm 0,04$ мкм² та дос-

товірно не відрізнялися при різних дозах Х-опромінення.

Через 2 год після Х-опромінення в дозах 0,5 Гр, 1 Гр, 2 Гр, 4 Гр, 6 Гр, 8 Гр, 10 Гр та 12 Гр ультраструктура клітин ДЗР корневих апексів тридобових проростків *A. thaliana* була близько подібною до контролю. Поряд з цим спостерігали значне збільшення кількості профілей ГЕР та площі ЕР-тілець на зріз клітини ДЗР порівняно з контролем, які не залежали від дози Х-опромінення (табл. 3, 4). ГЕР на зрізах клітин ДЗР був представлений довгими каналами, які мали здатність до галуження. Вміст ЕР-тілець та каналів ГЕР, як і в контролі, був заповнений електронно щільною тонкофібрилярною речовиною. На зовнішній поверхні мембран ГЕР та ЕР-тілець щільно розміщувалися рибосоми (рис. 2). На зрізах клітин ДЗР ЕР-тіляця мали округлу, овальну та видовжену форму, розміри яких варіювали в середньому від $0,008 \pm 0,002$ мкм² до $0,032 \pm 0,006$ мкм².

Таблиця 3. Кількість профілей гранулярного ендоплазматичного ретикулула на зріз клітини дистальної зони розтягу кореневого апекса *A. thaliana* в контролі та при Х-опроміненні, шт

Вік проростків / доба	Параметри	Контроль	Період після Х-опромінення	Доза Х-опромінення							
				0,5 Гр	1 Гр	2 Гр	4 Гр	6 Гр	8 Гр	10 Гр	12 Гр
3	Кількість профілей	11,58 ±2,45*	2 год	23,32 ±3,18*	23,29 ±3,24*	23,47 ±3,26*	23,34 ±3,32*	23,58 ±3,21*	23,72 ±2,98*	23,69 ±3,23*	23,68 ±3,31*
13		15,35 ±3,48*	10 діб	20,17 ±3,27*	20,23 ±3,31*	20,19 ±2,43*	20,18 ±2,56*	20,32 ±2,25*	20,35 ±2,33*	20,33 ±2,42*	20,36 ±2,38*
M±m; n=95; P=0,05; t-критерій											

Примітка: * – позначено статистично достовірні відмінності між відповідними значеннями.

Таблиця 4. Параметри ЕР тілець на зріз клітини дистальної зони розтягу кореневого апекса *A. thaliana* в контролі та при Х-опроміненні в різних дозах

Вік проростків / доба	Параметри	Контроль	Період після Х-опромінення	Доза Х-опромінення							
				0,5 Гр	1 Гр	2 Гр	4 Гр	6 Гр	8 Гр	10 Гр	12 Гр
3	Площа, мкм ²	0,061 ±0,015*	2 год	0,153 ±0,069*	0,151 ±0,032*	0,150 ±0,038*	0,150 ±0,041*	0,152 ±0,053*	0,154 ±0,044*	0,152 ±0,026*	0,153 ±0,037*
	К-ість, шт	8,09 ±3,17*		24,18 ±4,14*	23,49 ±3,24*	23,72 ±3,09*	22,15 ±2,79*	20,43 ±3,12*	16,22 ±3,88*	17,48 ±4,01*	18,19 ±2,99*
13	Площа, мкм ²	0,098 ±0,013*	10 діб	0,171 ±0,024*	0,168 ±0,041*	0,168 ±0,044*	0,168 ±0,035*	0,169 ±0,028*	0,171 ±0,043*	0,170 ±0,033*	0,169 ±0,051*
	К-ість, шт	15,19 ±5,89*		28,17 ±6,12*	27,56 ±6,19*	27,43 ±6,13*	24,24 ±5,88*	23,06 ±4,98*	21,17 ±6,16*	21,34 ±6,05*	21,05 ±5,78*
M±m; n=95; P=0,05; t-критерій											

Примітка: * – позначено статистично достовірні відмінності між відповідними значеннями.

Через 10 діб після Х-опромінення тридобових проростків *A. thaliana* в дозах 0,5 Гр, 1 Гр, 2 Гр, 4 Гр, 6 Гр, 8 Гр, 10 Гр та 12 Гр ультраструктура клітин ДЗР кореневого апекса була подібною до такої у проростків через 2 год після Х-опромінення. Так само відмічали зміни в кількості профілей ГЕР та кількості і розмірах ЕР-тілець (табл. 3, 4). ЕР-тіляця на зрізах ДЗР варіювали за формою та розміром (рис. 2). Найменші ЕР-тіляця на зрізі клітини ДЗР мали розмір від 0,004 мкм² до 0,015 мкм². Форма таких ЕР-тілець була округлою та овальною. Окремі ЕР-тіляця досягали ~0,048 мкм², на зрізах клітин ДЗР вони мали видовжену форму.

Отже встановлено, що при Х-опроміненні в дозах 0,5 Гр, 1 Гр, 2 Гр, 4 Гр, 6 Гр, 8 Гр, 10 Гр та 12 Гр ріст і диференціювання статочитів та клітин ДЗР корневих апексів три- і 13-тидобових проростків *A. thaliana* відбуваються подібно до контрольних проростків. Водночас відмінності ультраструктурної організації клітин свідчать про певні зміни метаболізму та функціонального навантаження органел під впливом Х-опромінення. Вперше детально описані нами зміни у кількості профілей ГЕР, а також кількості та розмірах ЕР-тілець в статочитах та клітинах ДЗР при дії Х-опромінення демонструють їх чутливість до дії іонізуючої радіації. Суттєве збільшення профілей ГЕР може свідчити про по-

силення функціональної активності цих органел, зокрема секрецію білків. Збільшення майже в 2 рази середньої площі ЕР-тілець на зріз клітини та їх варіабельності за формою і розмірами в клітинах кореня при Х-опроміненні можна розглядати як прояв адаптивної реакції клітин на дію несприятливого чинника, що забезпечує ріст рослин в цих умовах. Характер таких перебудов у клітині може свідчити, як ми вже відмічали, про певні зміни метаболізму, що здійснюються в діапазоні фізіологічної відповіді клітини.

Висновки. Уперше вивчено вплив Х-опромінення на динаміку утворення ЕР-тілець, похідних гранулярного ендоплазматичного ретикула, в статочитах та клітинах дистальної зони розтягу кореневих апексів проростків *A. thaliana*. Збільшення обсягу ЕР-тілець, які містять фермент β -глюкозидазу (PYK10), розглядається як адаптивна реакція клітини на дію іонізуючої радіації.

Список використаних джерел:

1. Baran E. Simple data analysis forbiologists / E. Baran, F. Warry. – Phnom Penh: World Fish Center and the Fisheries Administration, 2008. – 67 p. Available from: http://aquaticcommons.org/1800/1/WF_1817.pdf
2. Bonnett H.T.J. Polyribosomes and cisternal accumulations in root cells of radish / H.T.J. Bonnett, E.H. Newcomb // *Cell Biol.*, 1965. – Vol. 27. – P. 423–432. doi: 10.1083/jcb.27.2.423.
3. Effects of sparsely and densely ionizing radiation on plants / V. de Micco, C. Arena, D. Pignalosa, M. Durante // *Radiation and Environmental Biophysics*, 2011. – Vol. 50, N 1. – P. 1–19. doi: 10.1007/s00411-010-0343-8.
4. The Relative Biological Efficiency of Gamma Rays and Fission Neutrons in Plant Species with Different Nuclear and Chromosome Volumes / B. Donini, A.H. Sparrow, L.A. Schairer, R.C. Sparrow // *Rad. Research.*, 1967. – Vol. 32. – P. 692–705. doi: 10.2307/3572281.
5. Esnault M.-A. Ionizing radiation: Advances in plant response / M.-A. Esnault, F. Legue, C. Chenal // *Environmental and Experimental Botany*, 2010. – Vol. 68, N 3. – P. 231–237. doi: 10.1016/j.envexpbot.2010.01.007.
6. A proteinase storing body that prepares for cell death or stresses in the epidermal cells of Arabidopsis / Y. Hayashi, K. Yamada, T. Shimada et al. // *Plant Cell Physiol.*, 2001. – Vol. 42. – P. 894–899. doi: 10.1093/pcp/pce144.
7. Holst R. W. Radiation effects on plants. / R.W. Holst, D.J. Nagel. In: W. Wang, J.W. Gorsuch, J.S. Hughes (Eds.) // *Plants for environmental studies*. Boca Raton, FL: Lewis Publishers, 1997. – P. 37–81.
8. Huston S.L. Space environments and effects: trapped proton model (NASA/CR-2002-211784) / S.L. Huston. – 2002. Available from: <https://ntrs.nasa.gov/archive/nasa/casi.ntrs.nasa.gov/20020063597.pdf>.
9. International Space Station Internal Radiation Monitoring (ISS Internal Radiation Monitoring) – 05.04.2017. Available from: https://www.nasa.gov/mission_pages/station/research/experiments/1043.html.
10. Ishikawa H. Specialized zones of development in roots / H. Ishikawa, M.L. Evans // *Plant Physiol.*, 1995. – Vol. 109, N 3. – P. 725–727.
11. Ketudat Cairns J.R. β -glucosidases / J.R. Ketudat Cairns, A. Esen // *Cell Mol Life Sci.*, 2010. Vol. 67, N 20. – P. 3389–3405. doi: 10.1007/s00018-010-0399-2.
12. Kordyum E.L. Biology of plant cell microgravity and under clinostating / E.L. Kordyum // *Int. Rev. Cytol.*, 1997. – Vol. 171. – P. 1–72. doi: 10.1016/S0074-7696(08)62585-1.
13. Noninvasive and continuous recordings of auxin fluxes in intact root apex with a carbon nanotube-modified and self-referencing microelectrode / S. Mancuso, A.M. Marras, V. Magnus, F. Baluška // *Analytical Biochemistry*, 2005. – Vol. 341. – P. 344–351. doi: 10.1016/j.ab.2005.03.054.
14. A novel ER-derived compartment, the ER body, selectively accumulates a β -glucosidase with an ER retention signal in Arabidopsis. / R. Matsushima, M. Kondo, M. Nishimura et al. // *Plant J.*, 2003. – Vol. 33. – P. 493–502. doi: 10.1046/j.1365-313X.2003.01636.x.
15. An endoplasmic reticulum derived structure that is induced under stress conditions in Arabidopsis / R. Matsushima, Y. Hayashi, M. Kondo et al. // *Plant Physiol.*, 2002. – Vol. 130. – P. 1807–1814. doi: 10.1104/pp.009464.
16. NAI1 gene that encodes a basic-helix-loop-helix-type putative transcription factor that regulates the formation of a novel ER-derived structure, the ER body / R. Matsushima, Y. Fukao, M. Nishimura, I. Hara-Nishimura // *Plant Cell.*, 2004. – Vol. 16. – P. 1536–1549. doi: 10.1105/tpc.021154.
17. Pyk10, a seed lingandroot specific gene and promoter from *Arabidopsis thaliana* / I. Nitz, H. Berkefeld, P.S. Puzio et al. // *Plant. Sci.*, 2001. – Vol. 161. – P. 337–346. doi: 10.1016/S0168-9452(01)00412-5.
18. Constitutive and inducible ER bodies of *Arabidopsis thaliana* accumulate distinct β -glucosidases / K. Ogasawara, K. Yamada, J.T. Christeller et al. // *Plant Cell Physiol.*, 2009. – Vol. 50, N3. – P. 480–488. doi: 10.1093/pcp/pcp007.
19. Reynolds E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy / E.S. Reynolds // *J. Cell Biol.*, 1963. – Vol. 17, N 1. – P. 208–212. doi: 10.1083/jcb.17.1.208.
20. Romanchuk S.M. Ultrastructure of the statocytes and cells of the distal elongation zone of *Arabidopsis thaliana* under the conditions of clinorotation / S.M. Romanchuk // *Cytology and Genetics*, 2010. – Vol. 44, N 6. – P. 329–333. doi: 10.3103/S0095452710060010.
21. Sherameti I. PYK10, a β -glucosidase located in the endoplasmic reticulum, is crucial for the beneficial interaction between *Arabidopsis thaliana* and the endophytic fungus *Piriformospora indica* / I. Sherameti, Y. Venus, C. Drzewiecki // *Plant J.*, 2008. – Vol. 54. – P. 428–439. doi: 10.1111/j.1365-313X.2008.03424.x.
22. Sychev V.N. Biological component of life support systems for a crew in long-duration space expeditions / V.N. Sychev, M.A. Levinskikh; I.G. Podolsky // *Acta Astronaut.*, 2008. – Vol. 63. – P. 1119–1125. doi: 10.1016/j.actastro.2008.01.001.
23. Weigel D. Arabidopsis: a laboratory manual / D. Weigel, J. Glazebrook // New York Gold Spring Harbor Laboratory Press, 2002. – P. 354.
24. Wendt M. The polarity of statocytes and the gravisensitivity of roots are dependent on the concentration of calcium in statocytes / M. Wendt, A. Sievers // *Plant Cell Physiol.*, 1989. – Vol. 30. – P. 929–932. doi: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a077827.

References (Scopus):

1. Baran E, Warry F. Simple data analysis forbiologists. Phnom Penh: World Fish Center and the Fisheries Administration. 2008; 67 p. Available from: http://aquaticcommons.org/1800/1/WF_1817.pdf
2. Bonnett HTJ, Newcomb EH. Polyribosomes and cisternal accumulations in root cells of radish. *J Cell Biol* 1965; 27:423–432. doi: 10.1083/jcb.27.2.423.
3. De Micco, V, Arena C, Pignalosa D, Durante M. Effects of sparsely and densely ionizing radiation on plants. *Radiation and Environmental Biophysics*. 2011; 50(1):1–19. doi: 10.1007/s00411-010-0343-8.
4. Donini B, Sparrow AH, Schairer LA, Sparrow RC. The Relative Biological Efficiency of Gamma Rays and Fission Neutrons in Plant Species with Different Nuclear and Chromosome Volumes. *Rad. Research*. 1967; 32:692–705. doi:10.2307/3572281.
5. Esnault M-A, Legue F, Chenal C. Ionizing radiation: Advances in plant response. *Environmental and Experimental Botany*. 2010; 68(3):231–237. doi: 10.1016/j.envexpbot.2010.01.007.
6. Hayashi Y, Yamada K, Shimada T, Matsushima R, Nishizawa NK, Nishimura M, et al. A proteinase-storing body that prepares for cell death or stresses in the epidermal cells of Arabidopsis. *Plant Cell Physiol*. 2001; 42:894–899. doi: 10.1093/pcp/pce144.
7. Holst R.W, Nagel DJ. Radiation effects on plants. In: Wang W, Gorsuch J. W., Hughes J.S. (Eds.). *Plants for environmental studies*. Boca Raton, FL: Lewis Publishers. 1997: 37–81.
8. Huston SL. Space environments and effects: trapped proton model (NASA/CR-2002-211784). 2002. Available from: <https://ntrs.nasa.gov/archive/nasa/casi.ntrs.nasa.gov/20020063597.pdf>
9. International Space Station Internal Radiation Monitoring (ISS Internal Radiation Monitoring). 05.04.2017. Available from: https://www.nasa.gov/mission_pages/station/research/experiments/1043.html
10. Ishikawa H, Evans ML. Specialized zones of development in roots. *Plant Physiol*. 1995 Nov; 109(3):725–727. PMID: 11539165.
11. Ketudat Cairns JR, Esen A. β -glucosidases. *Cell Mol Life Sci*. 2010; 67(20): 3389–3405. doi: 10.1007/s00018-010-0399-2.
12. Kordyum EL. Biology of plant cell microgravity and under clinostating. *Int. Rev. Cytol*. 1997; 171:1–72. doi:10.1016/S0074-7696(08)62585-1.
13. Mancuso S, Marras A M, Magnus V, Baluška F. Noninvasive and continuous recordings of auxin fluxes in intact root apex with a carbon nanotube-modified and self-referencing microelectrode. *Analytical Biochemistry*. 2005; 341:344–351. doi: 10.1016/j.ab.2005.03.054.
14. Matsushima R, Kondo M, Nishimura M, Hara-Nishimura I. A novel ER-derived compartment, the ER body, selectively accumulates a β -glucosidase with an ER retention signal in Arabidopsis. *Plant J*. 2003; 33:493–502. doi: 10.1046/j.1365-313X.2003.01636.x.
15. Matsushima R, Hayashi Y, Kondo M, Shimada T, Nishimura M, Hara-Nishimura I. An endoplasmic reticulum derived structure that is induced under stress conditions in Arabidopsis. *Plant Physiol*. 2002; 130:1807–1814. doi: 10.1104/pp.009464.
16. Matsushima R, Fukao Y, Nishimura M, Hara-Nishimura I. NAI1 gene that encodes a basic-helix-loop-helix-type putative transcription factor that regulates the formation of a novel ER-derived structure, the ER body. *Plant Cell*. 2004; 16:1536–1549. doi:10.1105/tpc.021154.
17. Nitz I, Berkefeld H, Puzio PS, Grundler FMW. Pyk10, a seedling and root specific gene and promoter from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci*. 2001; 161:337–346. doi: 10.1016/S0168-9452(01)00412-5.
18. Ogasawara K, Yamada K, Christeller JT, Kondo M, Hatsugai N, Hara-Nishimura I, et al. Constitutive and inducible ER bodies of *Arabidopsis*

thaliana accumulate distinct β -glucosidases. Plant Cell Physiol. 2009;50(3): 480–488. doi:10.1093/pcp/pcp007.

19. Reynolds ES. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. J. Cell Biol. 1963 Apr; 17(1):208–212. PMID: 13986422; PMCID:PMC2106263.

20. Romanchuk SM. Ultrastructure of the statocytes and cells of the distal elongation zone of *Arabidopsis thaliana* under the conditions of clinorotation. Cytology and Genetics. 2010; 44(6):329–333. doi: 10.3103/S0095452710060010

21. Sherametil, VenusY, DrzewieckiC, TripathiS, DanVM, Nitzl, et al. PYK10, a β -glucosidase located in the endoplasmic reticulum, is crucial for the beneficial interaction between *Arabidopsis thaliana* and the endophytic fungus *Piriformospora indica*. Plant J. 2008;54:428–439. doi: 10.1111/j.1365-3113.2008.03424.x.

22. SychevVN, LevinskikhMA, Podolsky, IG. Biological component of life support systems for a crew in long-duration space expeditions. Acta Astronaut. 2008; 63:1119–1125. doi: 10.1016/j.actaastro.2008.01.001.

23. Weigel D, Glazebrook J. *Arabidopsis: a laboratory manual*. New York Gold Spring Harbor Laboratory Press, 2002: 354.

24. Wendt M, Sievers A. The polarity of statocytes and the gravisensitivity of roots are dependant on the concentration of calcium in statocytes. Plant Cell Physiol. 1989; 30: 929–932. doi: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a077827.

Надійшла до редколегії 07.02.2019

Отримано виправлений варіант 06.03.2019

Підписано до друку 06.03.2019

Received in the editorial 07.02.2019

Received a revised version on 06.03.2019

Signed in the press on 06.03.2019

С. Романчук, млад. науч. сотр.

Институт ботаники имени Н.Г. Холодного НАН Украины, Киев, Украина

УЛЬТРАСТРУКТУРА ЭР-ТЕЛЕЦ В СТАТОЦИТАХ И КЛЕТКАХ ДИСТАЛЬНОЙ ЗОНЫ РАСТЯЖЕНИЯ КОРНЕВЫХ АПЕКСОВ *ARABIDOPSIS THALIANA* (L.) HEYNH. ПОД ДЕЙСТВИЕМ Х-ОБЛУЧЕНИЯ

Среди видов растений, которые использовались в космических и наземных экспериментах, наиболее устойчивыми к радиационно-му излучению считаются представители семейства Brassicaceae. Предполагается, что ЭР-тельца, которые являются производными гранулярного эндоплазматического ретикулума и селективно накапливают фермент β -глюкозидазу (РНК 10), могут быть ответственными за эту устойчивость. Цель исследования – изучить ультраструктуру статочитов и клеток дистальной зоны растяжения корневых апексов проростков *A. thaliana* в контроле и под действием Х-облучения, с учетом топографии гранулярного эндоплазматического ретикулума и ЭР-телец. Проростки выращивали на питательной агаризованной среде. Облучение проростков осуществляли рентгеновскими лучами на приборе РУМ-17 (мощность дозы 0,43 сГр/с) в дозах 0,5 Гр, 1 Гр, 2 Гр, 4 Гр, 6 Гр, 8 Гр, 10 Гр и 12 Гр. Апексы корней фиксировали в смеси смол эпон-аралдит. Ультратонкие продольные срезы исследовали на трансмиссионном электронном микроскопе JEM-1230 EX (Jeol, Япония). Показано сходство с контролем и различия ультраструктуры статочитов и клеток дистальной зоны растяжения корневых апексов проростков *A. thaliana* под действием Х-излучения. Установлено увеличение количества профилей гранулярного эндоплазматического ретикулума и общей площади ЭР-телец на срез клетки через 2 ч и 10 суток после Х-облучения более чем в два раза по отношению к контролю. Выявлено вариабельность ЭР-телец по форме и размерам, что зависело от дозы рентгеновских лучей. Характер таких перестроек в клетке может свидетельствовать об определенных изменениях метаболизма, осуществляемых в диапазоне физиологического ответа клетки. Впервые изучено влияние Х-облучения на динамику образования ЭР-телец, производных гранулярного эндоплазматического ретикулума, в статочитах и клетках дистальной зоны растяжения корневых апексов проростков *A. thaliana*. Увеличение объема ЭР-телец, которые содержат фермент β -глюкозидазу (РНК 10), рассматривается как адаптивная реакция клетки на действие ионизирующей радиации.

Ключевые слова: ЭР-тельца, гранулярный эндоплазматический ретикулум, ультраструктура, электронная микроскопия, Х-облучение, *Arabidopsis thaliana*.

S. Romanchuk, Junior Res.

M. G. Kholodny Institute of Botany, NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

ULTRASTRUCTURE OF ER-BODIES IN STATOCYTES AND CELLS OF THE DISTAL ELONGATION ZONE OF *ARABIDOPSIS THALIANA* (L.) HEYNH. ROOT APICES UNDER X-RADIATION

Among plants used in spaceflight experiments, species of family Brassicaceae are considered as the most resistant to radiation exposure. It is supposed that ER-bodies, which are derivative of granular endoplasmic reticulum and selectively accumulate an enzyme β -glucosidase, may be responsible for this resistance. The aim of the study was to investigate the ultrastructure and topography of ER-bodies in statocytes and cells of the distal elongation zone in root apices of *A. thaliana* seedlings in the control and under X-radiation. Methods. Seedlings grown on agar nutrient medium were treated with X-rays of doses 0.5 Gy, 1 Gy, 2 Gy, 4 Gy, 6 Gy, 8 Gy, 10 Gy, and 12 Gy on the unit RUM-17 (dose rate 0.43 cGr/s). The root apices were fixed with a mixture of epoxide resins. Ultra-thin longitudinal sections were investigated with a transmission electron microscope JEM-1230 EX. Results. It was shown the similarity in the root apex cell ultrastructure in control and under X-radiation. At the same time there were some differences in the ultrastructure of statocytes and cells of the distal elongation zone under X-radiation. An increase in the number of profiles of granular endoplasmic reticulum and the total area of ER-bodies per cell in two hours and ten days after X-radiation more than twice in comparison to control was established. It was revealed the variability of ER-bodies in shape and size depending on the dose of X-rays. The nature of such alterations in the cell may indicate certain changes in metabolism, carried out within the range of cell physiological responses. Conclusions. For the first time, the influence of X-radiation on dynamics of the formation of ER-bodies, which are derivative of granular endoplasmic reticulum, in statocytes and cells of the distal elongation zone in root apices of *A. thaliana* seedlings has been studied. Increased area of ER-bodies, which contain β -glucosidase (PYK 10), is considered as an adaptive cell response to ionizing radiation.

Keywords: ER-bodies, granular endoplasmic reticulum, ultrastructure, electron microscopy, X-radiation, *Arabidopsis thaliana*.

УДК 712.03

Д. Терлецька, студ., В. Шпагин, канд. фіз.-мат. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

ІДЕНТИФІКАЦІЯ АРХІТЕКТУРНОГО СТИЛЮ ЧЕРВОНОГО КОРПУСУ КИЇВСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОГО УНІВЕРСИТЕТУ ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА В ЦІЛЯХ ЛАНДШАФТНОГО ДИЗАЙНУ

Здійснено ідентифікацію термінів, якими визначають стиль головного корпусу КНУ імені Тараса Шевченка у вітчизняній та зарубіжній науковій літературі, з метою їхнього подальшого застосування у пошуку архітектурних аналогів у цілях ландшафтного дизайну. Оскільки розвитку класици в архітектурі характерна неоднорідність у різних країнах та у різні часи, то в основу дослідження покладено аналіз систем періодизації розвитку класичного стилю, упроваджених у вітчизняній та зарубіжних наукових школах. Проаналізовано вітчизняну наукову систему періодизації і показано, що просте хронологічне визначення стилю Червоного корпусу не дає коректних результатів. Тому виконано зіставлення архітектурного образу головного будинку Університету та інших класичних споруд, для яких стиль чітко ідентифікований. Такий підхід дозволить встановити приналежність Червоного корпусу до тих архітектурних об'єктів, стиль яких відповідає строгому класицизму. Виконано порівняння вітчизняної системи періодизації із західними аналогами, що дозволило виділити групу термінів, якими в зарубіжних наукових школах, зокрема в Німеччині та Англії, ідентифікують споруди зі стильовими ознаками строгого класицизму. Проаналізовано схожість і принципи розбіжності в зарубіжних назвах класичної архітектури, які відповідають строгому класицизму у вітчизняній архітектурі. Продемонстровано близькість термінів вітчизняної школи з термінами, які застосовують для позначення строгого класицизму в Німеччині. Розкрито термінологічні розбіжності у вітчизняній та англійській літературі. Наведено також окремі зарубіжні аналоги терміну "строгий класицизм", які набули значного наукового обігу, але не увійшли до загальноприйнятих систем періодизації розвитку класичної архітектури.

Ключові слова: класицизм, неокласицизм, строгий класицизм, палладіанство, неопалладіанство, Червоний корпус КНУ імені Тараса Шевченка.

Вступ. Швидкі зміни у містобудівній ситуації центру Києва актуалізують благоустрій територій навколо знакових архітектурних об'єктів Києва, зокрема навколо Червоного корпусу Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Наразі постає питання про розробку проекту благоустрою простору між західним фасадом Червоного корпусу і Ботанічним садом. Процес проектування пов'язаний з вирішенням ряду задач, однією з яких є вивчення світового досвіду організації архітектурного простору перед будинками, аналогічними до Червоного корпусу. Пошук таких аналогів на сьогодні ускладнений, оскільки у вітчизняній науковій літературі відсутній огляд як українських, так і зарубіжних термінів, якими визначають стиль аналогів Червоного корпусу в країнах найбільшого поширення класичного стилю в архітектурі, зокрема, в Англії, Німеччині та Росії.

Мета даного дослідження – ідентифікація термінів, якими визначають стиль головного корпусу КНУ імені Тараса Шевченка у вітчизняній та зарубіжній науковій літературі, для їхнього подальшого застосування у пошуку архітектурних аналогів у цілях ландшафтного дизайну. Завдання – аналіз вітчизняної та зарубіжної періодизації класичного стилю.

Основна частина. Класицизм зародився в Італії, звідти був перенесений у Францію, де набув значної популярності, а вже потім поширився в інших країнах.

В Україні найбільшого розквіту класицизм в архітектурі набув у період з 1760-х до 1840-х років. Взагалі класицизм тут не був однорідним ані в часі, ані на її

території, що не могло не позначитися на періодизації класичного стилю. Менш з тим, у 80-х роках в активний науковий обіг була впроваджена Пілявським періодизація [10], підтримана іншими дослідниками, зокрема, Бартеневим [1]. Ця система представлена у таблиці 1. Частина дослідників підтримують її і в наші дні [6, 5]. У ХХІ ст. В.В. Вечерський запропонував ще одну періодизацію [3] (табл. 2). Перша згадана система складається із трьох періодів: ранній класицизм, строгий класицизм і високий класицизм. Згідно з характеристикою даних періодів Червоний корпус, побудований у 1843 р. В.І. Беретті, належить до високого класицизму. Але, як було показав Зимін [6], головний будинок університету слід віднести до строгого класицизму. У правомірності такого висновку можна пересвідчитися, якщо порівняти, наприклад, фасад Червоного корпусу (рис. 1) та Будинку Академії наук у Петербурзі (1789 р. – архітектор Джакомо Кваренгі), який належить до строгого класицизму [6] (рис. 2). Що стосується терміну "високий класицизм" у даній системі, то він застосовується до архітектури з принципово новими рисами, такими як використання значної кількості скульптур на військову тематику або давньоєгипетських мотивів, присутність певної здрібнілості деталей, притаманних ампіру. Тому для пошуку архітектурних аналогів Червоного корпусу університету на пострадянському просторі на основі даної періодизації класицизму доцільним буде використання терміну "строгий класицизм".



Рис. 1. Східний фасад Червоного корпусу Університету (архітектор В. І. Беретті)



Рис. 2. Будинок Академії наук у Петербурзі (архітектор Д. Кваренгі)

Таблиця 1. Періодизація класицизму у вітчизняній архітектурі (опис В.І. Пілявського) [10]

Стиль	Часові межі
Ранній класицизм	1760-1780
Строгий класицизм	1780-1800
Високий класицизм (ампір)	1800-1840

Таблиця 2. Періодизація класицизму у вітчизняній архітектурі (запропонував В.В. Вечерський) [3]

Стиль	Часові межі
Ранній класицизм	1760-1780
Високий класицизм	1780-1800
Ампір	1800-1830
Пізній/ "Миколаївський" класицизм	1830-1850

Таблиця 3. Періодизація класицизму в архітектурі Європейських країн (опис В. Коха) [7]

Стиль	Часові межі
В Німеччині: класицизм (нім. Klassizismus) В інших країнах Європи (англ. Neoclassicism)	1770-1830

Система періодизації, представлена в табл. 2, дещо відрізняється від попередньої. Особливо привертає до себе увагу термін "миколаївський класицизм". Проте Вечерський не розкриває характерні особливості такого класицизму. З порівняння таблиць 1 та 2 випливає, що творчість митців, яку автор [3] вважав пізнім або "миколаївським" класицизмом, можна ідентифікувати як високий класицизм. Дійсно, з наведеного нижче фото Будинку Сенату і Синоду (рис. 3, 1829-1834 рр., архітектор К. Россі) стає очевидним, що зазначеному періоду відповідає російський ампір, який за періодизацією Пілявського [10] віднесено до високого класицизму. Таким чином, попри те, що Червоний корпус був побудований саме у добу правління Миколи I, щодо нього не може бути застосовано термін "миколаївський".

**Рис. 3.** Будинок Сенату і Синоду архітектор К. Россі

Інші терміни, які можна зустріти в науковій літературі і які можуть мати пряме відношення до Червоного корпусу – палладіанство (або осучаснений термін – неопалладіанство). Походження розглянемо нижче, а наразі лише зазначимо, що за словами мистецтвознавця А. К. Дежурка: "У Росії архітектура класицизму визначена впливом Дж. Кваренгі і Ч. Камерона, які принесли в Росію англійські та італійські традиції палладіанства" [4]. Важливо, що в дослідженнях [10, 6] творчий доробок Дж. Кваренгі і Ч. Камерона віднесено до строгого класицизму, і ототожнення цих понять дає всі підстави використовувати терміни "палладіанство" і "неопалладіанство" для пошуків архітектурних аналогів Червоного корпусу.

Періодизація класичного стилю в Західній Європі була досліджена німецьким вченим В. Кохом [7] у 2005 р.

У цікавий для нас період кінця XVIII – поч. XIX ст., коли в Україні домінував строгий класицизм, у більшості європейських країн користувався популярністю "Neoclassicism" неокласицизм. В основі цього терміну – архітектура класичної античності, вітрувіанські принципи і здобутки італійського архітектора Андреа Палладіо. Слід зазначити різницю в ужитку терміну "неокласицизм" щодо архітектури європейських країн і Німеччини, Росії та України: в Німеччині ним визначають лише архітектуру початку XX ст., а до архітектури попереднього періоду (кінець XVIII – поч. XX ст.) застосовують термін "Klassizismus" (класицизм). Трактують стиль "неокласицизм" у Росії та в Україні не відрізняється від німецького. Тиме для пошуку відповідної європейської архітектури доцільно використовувати термін "Neoclassicism", але при тому звертати увагу й на країну знаходження аналогу.

На додаток до наведених у таблиці 3 термінів, для визначення стилю європейської архітектури періоду кінця XVIII – початку XIX ст. значного поширення набув термін Neo-Palladian / Palladian style (неопалладіанство / палладіанство). Уперше він зустрічається як English Palladian (англійське палладіанство) у роботах Ініго Джонса [2] у XVII ст. На думку Ruhl [9], цьому терміну відповідає інший – раннє палладіанство. Після певного забуття цей стиль набув справжньої популярності в Англії, Шотландії та Ірландії в період 1770 – 1830 рр., тобто у добу існування в Україні строгого класицизму. До середини XIX ст. палладіанський / неопалладіанський стиль розповсюдився в усій Європі. Ототожнення строгого класицизму і палладіанства / неопалладіанства є правомірним, і це стає очевидним, якщо порівняти, наприклад, західний фасад Червоного корпусу (рис. 4) з палацом Марбл Хілл Хаус (рис. 5, 1724–1729 рр., архітектор Г. Говард), а також палацу Розумовського (рис. 6, 1799–1803 рр., архітектор Ч. Камерон). Тож термін Neo-Palladian / Palladian style також доцільно застосовувати для пошуку європейських аналогів до Червоного корпусу КНУ. У вітчизняній літературі, зокрема, у Лінда [8], можна зустріти й такі синоніми неокласицизму в архітектурі Європи, як "другий класицизм" та "романтичний класицизм". Але ці терміни не набули широкого вжитку, тому в даній статті не будуть розглянуті.

**Рис. 4.** Західний фасад Червоного корпусу Університету (архітектор В. І. Беретті)**Рис. 5.** Марбл Хілл Хаус (Marble Hill House, архітектор Г. Говард)**Рис. 6.** Палац Розумовського (архітектор Ч. Камерон)

Висновки. Для визначення архітектурного стилю об'єктів, ідентичних до Червоного корпусу КНУ, у вітчизняній та російській науковій літературі використовують такі терміни, як "строгий классицизм", "палладіанство", "неопалладіанство", а в країнах Західної Європи – "Neoclassicism" (за винятком Німеччини), "Klassizismus" (Німеччина), "Neo-Palladian", "Palladian". Ці терміни доцільно вживати у ході ландшафтного дизайну на стадії пошуку архітектурних аналогів Червоного корпусу.

Список використаних джерел:

1. Бартенев И. А. Очерки истории архитектурных стилей : учеб. пособие / И. А. Бартенев, В. Н. Батажкова. – М.: Изобразительное искусство, 1983. – 384 с.
2. Беломесяцев А. Б. Філософські основи архітектури / Інститут проблем сучасного мистецтва Академії мистецтв України // А. Б. Беломесяцев. – К.: ІПСМ АМУ, 2005. – 488 с.
3. Вечерський В.В. Курс історії архітектури країн Східної Європи : метод. посіб. / В. В. Вечерський. – К.: Вид-во "АртЕк", 2007. – 270 с.
4. Дежурко А. К. Большая российская энциклопедия. Электронный ресурс : Веб-сайт. – Электронные данные / Гл. ред. С. Л. Кравец. – М.: БРЭ, 2005-2019. – https://bigenc.ru/fine_art/text/2705123. – Название с экрана.
5. Єрошкіна О.О. Епоха класицизму : навч. посіб. / О.О. Єрошкіна. – Харків : ХНУМГ ім. О.М. Бекетова, 2019. – 186 с.
6. Зими́на С.Б. Зарубіжна архітектура. Історія російської архітектури : підручник / С.Б. Зими́на. – К.: КНУБА, 2015. – 120 с.
7. Кох Вильфрид. Энциклопедия архитектурных стилей : классический труд по европейскому зодчеству от античности до современности ; пер. с нем. / Вильфрид Кох. – М.: БММ АО, 2005. – 528 с.
8. Лінда С. М. Тенденції історизму в архітектурі Одеси першої третини XIX століття / С.М. Лінда // Сучасні проблеми архітектури та містобудування, 2011. – Вип. 26. – С. 42–47.
9. Ruhl C. Palladianism: from the Italian Villa to International Architecture: European History Online (EGO) / C. Ruhl // published by the Institute of European History (IEG), Mainz 2011-04-07. URL: <http://www.ieg-ego.eu/ruhlc-2010-en> URN: urn:nbn:de:0159-2011020199.
10. Тиц А. А. История русской архитектуры: [учебник для вузов] / А. А. Тиц, В. И. Пилиянский, Ю. С. Ушаков. – Л.: Стройиздат, Ленингр. отд-ние, 1984. – 512 с.

References:

1. Bartenev Y. A. Ocherky ystoryy arkhitekturykh styley: [uchebnoe posobie] / Y. A. Bartenev, V. N. Batazhkova. – M.: Yzobrazitel'noe yskustvo, 1983. – 384s.
2. Byelomyesyatsev A. B. Filosofs'ki osnovy arkhitektury / Instytut problem suchasnoho mystetstva Akademiyi mystetstv Ukrainy // A. B. Byelomyesyatsev – K.: IPSM AMU, 2005. – 488 s.
3. Vechers'kyy V. Kurs istoriyi arkhitektury krayin Skhidnoyi Yevropy: [metodychnyy posibnyk] / V. V. Vechers'kyy. – K.: Vydavnytstvo "ArtEk", 2007. – 270 s.
4. Dezhurko A. K. Bol'shaya rossyskaya éntsiklopedyya [Élektronnyy resurs] : [Veb-sayt]. – élektronnyye dannye/ Hlavnyy redaktor: Kravets S. L. – M.: BRÉ, 2005-2019. – https://bigenc.ru/fine_art/text/2705123 – Nazvanye s ekrana.
5. Yeroshkina O.O. Epokha klasytsyzmu: [navchal'nyy posibnyk] / O.O. Yeroshkina. – Kharkiv: KHNUMH im. O.M. Beketova, 2019. –186 s.
6. Zymina S. B. Zarubizhna arkhitektura. Istoriya rosiys'koyi arkhitektury: [pidruchnyk] / C. B. Zymina. – K.: KNUBA, 2015. – 120 s.
7. Kokh Vyl'fryd. Éntseklpedyya arkhitekturykh styley: [klassycheskyy trud po evropeyskomu zotchestvu ot antychnosti do sovremennosti, per. s nem.] / Kokh Vyl'fryd. – M.:BMM AO, 2005. – 528s.
8. Linda S. M. Tendentsiyi istorizmu v arkhitekturi Odesy pershoi tretyni KHIKH stolittya / S. M. Linda // Suchasni problemy arkhitektury ta mistobuduvannya. – 2011. – Vyp. 26. – S. 42-47.
9. Ruhl S. Palladianism: From the Italian Villa to International Architecture: European History Online (EGO), published by the Institute of European History (IEG), Mainz 2011-04-07. URL: <http://www.ieg-ego.eu/ruhlc-2010-en> URN: urn:nbn:de:0159-2011020199.
10. Tyts A. A. Ystoryya russkoy arkhitektury: [uchebnyk dlya vuzov] / A. A. Tyts, V. I. Pilyavskyy, YU. S. Ushakov. – L.: Stroyizdat, Leninghr. otd-nye, 1984. – 512s.

Надійшла до редколегії 04.02.2019

Отримано виправлений варіант 04.03.2019

Підписано до друку 04.03.2019

Received in the editorial 04.02.2019

Received a revised version on 04.03.2019

Signed in the press on 04.03.2019

Д. Терлецкая, студ., В. Шпагин, канд. физ.-мат. наук
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

ИДЕНТИФИКАЦИЯ АРХИТЕКТУРНОГО СТИЛЯ КРАСНОГО КОРПУСА КИЕВСКОГО НАЦИОНАЛЬНОГО УНИВЕРСИТЕТА ИМЕНИ ТАРАСА ШЕВЧЕНКО В ЦЕЛЯХ ЛАНДШАФТНОГО ДИЗАЙНА

Исследование посвящено идентификации терминов, определяющих стиль главного корпуса КНУ имени Тараса Шевченко в отечественной и зарубежной научной литературе, для их дальнейшего применения в поиске архитектурных аналогов в целях ландшафтного дизайна. Поскольку развитию классики в архитектуре характерна неоднородность в разных странах и в разные времена, то в основу исследования положен анализ систем периодизации развития классического стиля, принятых в отечественной и зарубежных научных школах. Описана отечественная научная система периодизации и показано, что простое хронологическое определение стиля Красного корпуса не дает правильного результата. Поэтому был выполнен анализ с сопоставлением архитектурного образа главного здания Университета и других классических сооружений, для которых стиль точно идентифицирован. Такой подход позволил установить принадлежность Красного корпуса к числу архитектурных объектов, стиль которых соответствует строгому классицизму. Также сопоставлена отечественная система периодизации с западными аналогами. Это позволило выделить группу терминов, используемых в зарубежных научных школах, в частности в Германии и Англии, для идентификации сооружений со стилевыми признаками строгого классицизма. Проанализированы сходство и принципиальные различия в зарубежных названиях классической архитектуры, соответствующие строгому классицизму в отечественной архитектуре. Продемонстрирована близость терминов отечественной школы с терминами, применяемыми для обозначения строгого классицизма в Германии. Раскрыто терминологические различия в отечественной и англоязычной литературе. Приведены также отдельные зарубежные аналоги термина "строгий классицизм", получившие широкое научное распространение, но не вошедшие в общепринятые системы периодизации развития классической архитектуры.

Ключевые слова: классицизм, неоклассицизм, строгий классицизм, палладіанство, неопалладіанство, Красный корпус КНУ имени Тараса Шевченко.

D. Terletska, stud., V. Shpagin, Cand. Phys.-Math. Sci.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

IDENTIFICATION OF THE ARCHITECTURAL STYLE OF THE RED BUILDING OF THE TARAS SHEVCHENKO NATIONAL UNIVERSITY OF KYIV FOR LANDSCAPE DESIGN AIMS

The article deals with the identification of terms that define the style of the Main Building of the Taras Shevchenko National University of Kyiv in domestic and foreign scientific literature, for their further use in the search for architectural analogues for the purposes of landscape design. Since the development of classics in architecture is characterized by heterogeneity in different countries and at different times, the study is based on an analysis of the periodization systems of development of the classical style adopted within domestic and foreign scientific schools. At the first stage, the article describes the domestic scientific system of periodization and shows that a simple chronological definition of the style of the Red Building does not provide the correct result. Therefore, an analysis was made with a comparison of the architectural image of the main building of the University and other classical buildings for which the style is precisely identified. Such an approach made it possible to establish the belonging of the Red Building to the number of architectural objects, the style of which corresponds to strict classicism. At the second stage, the domestic periodization system is compared with its Western counterparts. This allowed us to identify a group of terms used in foreign scientific schools, in particular in Germany and England, for identifying structures with stylistic signs of strict classicism. Thereafter it was analyzed the similarities and

fundamental differences in the names of the period of development of foreign classical architecture, corresponding to strict classicism in the domestic architecture. There was demonstrated both the similarity of the terms of the national school with the terms used to refer to strict classicism in Germany and terminological differences in the domestic and English-language literature. In addition it was considered several foreign analogs of the term "strict classicism", which have received wide scientific scattering, but not included in the generally accepted periodization systems of the development of classical architecture.

Key words: Classicism, Neoclassicism, Strict Classicism, Palladian, Neo-Palladian Style, the Red Building of the Taras Shevchenko National University of Kyiv.

УДК 15.322:582.52

Г. Мегалінська, канд. біол. наук,
Національний педагогічний університет імені М. П. Драгоманова, Україна, Київ,
М. Сокульська, студ.
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна, Київ

ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ ЦИТОСТАТИЧНОЇ ТА АНТИБАКТЕРІАЛЬНОЇ АКТИВНОСТІ ЕКСТРАКТІВ АМБРОЗІЇ ПОЛИНОЛИСТНОЇ Й ІНШИХ ЛІКАРСЬКИХ РОСЛИН ТА ВИЗНАЧЕННЯ ЛІТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ ЕКСТРАКТІВ АМБРОЗІЇ ПОЛИНОЛИСТНОЇ

Присвячено важливій проблемі пошуку рослинних препаратів з високою антибактеріальною, цитостатичною та літичною активністю. Перспективними в цьому напрямі є такі адвентивні рослини, як *Ambrosia artemisiifolia*, яка належить до родини Айстрові. Мета роботи – дослідження антибактеріальної, цитостатичної і літичної активності водних витяжок Амброзії полинолистої та проведення порівняльного аналізу цих властивостей з іншими лікарськими рослинами. Визначення того, що лектинова витяжка із зелених пагонів (до цвітіння) *Ambrosia artemisiifolia* не аглютинує еритроцити крові, дає змогу розглядати цю сировину як потенційний лікарський засіб у фармакології. Дослідження цитостатичної активності методом Іванова, Бистрової дало можливість встановити місце Амброзії полинолистої серед вже добре відомих інших лікарських рослин. Цитостатичну активність досліджуваних рослин можна представити таким рядом в порядку зменшення: чистотіл великий (*Chelidonium majus*), Амброзія полинолиста (*Ambrosia artemisiifolia*), Барвінок малий (*Vincetoxicum minor*), Омела біла (*Viscum album*). Встановлення антибактеріальної активності дозволило стверджувати про наявність протистафілококової активності водного екстракту амброзії та його значний вплив на кишкову паличку. Протистафілококова активність водного екстракту амброзії близька до омели білої та чистотілу великого. Антибактеріальний ефект відносно *Proteus vulgaris* був найвищим у екстракті з пагонів амброзії порівняно з іншими досліджуваними лікарськими рослинами. Ураховуючи філогенетичний метод, можна очікувати, що рослини родини Айстрові можуть мати літичну активність щодо конкрементів, які утворюються у нирках людини. Отже, проведено дослідження літичної активності амброзії полинолистої та виявлено, що амброзія полинолиста має високу літичну активність щодо уратних та оксалатних конкрементів.

Ключові слова: *Ambrosia artemisiifolia*, цитостатична активність, антибактеріальна активність, літична активність.

Вступ. Актуальною проблемою XXI ст. є пошук рослинних препаратів, які мають антибактеріальні, цитостатичні та літичні властивості. На відміну від синтетичних сполук препарати рослинного походження не викликають ефекту резистентності, мають менше протипоказань [1]. Перспективними в даному напрямку є бур'яни та адвентивні рослини, поширені в різноманітних біоценозах. Альтернативним способом боротьби з бур'янами є переведення їх із рангу небезпечних синантропів у ранг лікарських рослин, сировина яких може використовуватися у фармакології. Однією з таких рослин є Амброзія полинолиста (*Ambrosia artemisiifolia* L.). Висока швидкість поширення амброзії пов'язана з тим, що рослина утворює велику кількість насіння, на деяких ділянках його кількість може досягати 200 млн шт. на 1 га, дозрівають насіння у серпні-листопаді. Свіжозібране насіння перебуває в стані первинного спокою і не здатне до проростання. Насіння, яке навесні не проросло, впадає в стан вторинного спокою й може зберігати життєздатність 5–14 років, а деякі екземпляри – до 40 років. Насіння проростають у ґрунті на глибині до 8 см [2].

Центр походження амброзії – Північна Америка, де рослина походила як злісний бур'ян. До колонізації Америки європейцями у себе на батьківщині амброзія була досить рідкісною рослиною. У штаті Мічиган амброзію виявили тільки в 1838 р., в Канаді – в 1860 р. Швидке поширення амброзії у США було пов'язано з поширенням площ сільськогосподарських культур. На початку XX ст. вона була завезена в Україну і поступово захопила аналогічні ніші та екологію. У Європу (Німеччину) амброзію завезли з насінням конюшини і жита у 1873 р. Зараз вона поширена на території Австрії,

Бельгії, Великої Британії, Італії, Німеччини, Польщі, Португалії, Чехії, Франції, Угорщини, Швеції, Швейцарії, Російської Федерації, навіть у країнах Африки (Алжир, Мадейра, Мадагаскар), Південної Америки (Аргентина, Болівія, Парагвай, Уругвай, Перу, Чилі), Азії (Корея, Казахстан, Японія) [2].

На думку деяких авторів, негативний вплив амброзії можна звести до таких аспектів [2]:

- пригнічення культурних рослин (ячмін, пшениць, кукурудз, буряків, овочевих культур);
- різке зниження кормових якостей сіна і випасів, амброзія викликає отруєння свійської худоби;
- знижує якість молока – воно набуває неприємного запаху та присмаку;
- зниження продуктивності сільськогосподарської техніки через надмірне використання пального: грубі стебла бур'яну заплутуються в робочих органах.

Згідно з оцінками вчених, амброзія полинолиста віднесена до небезпечних рослин-алергенів. Її пилок спричиняє масові алергічні захворювання. Це так звана "осіння пропасниця" – поліноз, що проявляється у формі риніту, кон'юнктивіту, мігрені, кропивниці, бронхоспазму, бронхіальної астми, гострого бронхіту. Для захворювання сінною пропасницею досить 40–50, а інколи навіть 3–5 зерен пилку. У хворого набрякають слизові оболонки верхніх дихальних шляхів і очей, болить голова, посилюється виділення мокрот, настає задишка, сльозотеча, погіршується зір, підвищується температура, виникає слабкість, загалом втрачається працездатність. Лікування алергії, викликані пилом амброзії, тривале і важке, а часом і безрезультатне.

Амброзія – надзвичайно поширена рослина та території України, яка з кожним роком збільшує площу розповсюдження. Цей рудеральний бур'ян заселяє сади, городи, узбіччя доріг, луки, пасовища, пустирі тощо, приносячи вагому шкоду сільському господарству та загалом здоров'ю людини. Отже, постало питання, чи можна таку надзвичайно отруйну та шкідливу рослину як амброзія використовувати у медицині, промисловості на благо людини? Саме цьому актуальному питанню присвячена ця стаття.

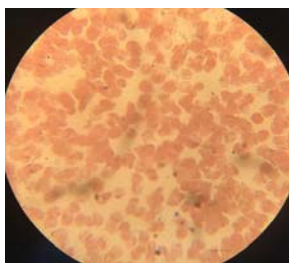
Метою представленого дослідження є вивчення цитостатичної та антибактеріальної активності водного екстракту та вивчення літичної активності лектинової витяжки пагона Амброзії полинолістої і проведення порівняльного аналізу цитостатичної та антибактеріальної активності даних показників з аналогічними показниками деяких інших лікарських рослин.

Матеріали та методи. У роботі було використано такі методи: "дифузійно-паперовий" метод [3] (дослідження антибактеріальної активності впливу водного екстракту амброзії полинолістої на певні умовно-патогенні бактерії: *Escherichiacoli*, *Staphyloocccusaureus*, *Proteusvulgaris*, *Candida albicans*), метод Іванова, Бистрової [4] (дослідження цитостатичної активності водної витяжки амброзії полинолістої), метод Н.І. Желтовської [3] (літична активність витяжки с пагонів амброзії полинолістої). Матеріалами слугували суха сировина досліджуваних рослин, водні та лектинові витяжки. Лектинову витяжку було приготовано за методикою [6].

Під час вибору рослин порівняльного ряду нами було застосовано метод "сита" – дослідження деяких рослин з протипухлинною активністю. Вивчення антибактеріальної активності та літичної активності амброзії було підтримано філогенетичним підходом, – більшість

рослин родини Айстрові володіють антисептичними властивостями (календула, полин, пижма). З метою пошуку лікарських рослин, які мають цитостатичну, протипухлинну активність, був використаний біотест з інгібування проростання насіння водним екстрактом досліджуваної рослини – Амброзії полинолістої методом Іванова, Бистрової [4]. Водний екстракт ми готували за методикою [7]. Цей метод зручний тим, що швидкий поділ клітин у точках росту досліджуваної рослини є моделлю пухлинного процесу. Суть методики полягає в тому, що при вибіркового гальмуванні мітозу на головних корінцях паростків рослин, бічні корінці не утворюються та ріст головних коренів припиняється. Як об'єкт для таких досліджень зручно використовувати паростки огірка. Характерною особливістю огірка та інших гарбузових є ранній розвиток на головному корені паростка бічних корінців. Це обумовлено тим, що вже в корені зародка насінини закладені примордії бічних коренів [3].

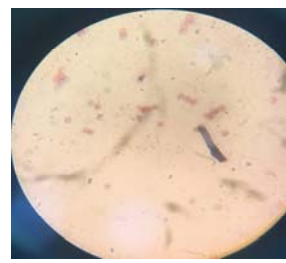
Результати та їх обговорення. По-перше, було досліджено, як лектинова витяжка амброзії впливає на клітини крові – еритроцити. Виявлено, що агрегація клітин крові відбувається лише у випадку, коли витяжка була виготовлена з пагонів Амброзії полинолістої після цвітіння, тоді як лектинова витяжка з зелених пагонів (до цвітіння) Амброзії полинолістої не склеює еритроцити і є цілком безпечною для людини. Результати дослідження дії лектинової витяжки на еритроцити крові людини (рис. 1). Окрім того, не менш важливим фактом є те, що надземна частина рослини містить камфору, а насіння – до 20 % ефірних олій. Джерела стверджують, що траву застосовують при гіпертонічних кризах, як протилихоманковий засіб, при діареї, дизентерії, гельмінтозах, як антисептичний засіб.



Контроль пагонів
Амброзії полинолістої



Дія лектинової витяжки
зелених пагонів Амброзії



Дія лектинової витяжки
полинолістої після цвітіння

Рис. 1. Фото еритроцитів крові в іммерсійному мікроскопі при збільшенні 15×100 (1500 разів)

Наступним дослідом було визначення цитостатичної активності екстракту амброзії. Цитостатики – речовини різної хімічної природи, які винятково пригнічують проліферацію клітин. Цитостатики широко використовуються у хіміотерапії злоякісних новоутворень. Цитостатики блокують мітотичний поділ клітин. Вони вирізняються механізмом дії, здатністю проникати через клітинні мембрани та накопичуватися у клітині. Рослинні цитостатики вдало використовуються у медичній практиці: колхамін, вінбластин, вінкрисин, подофілін. В онкології також застосовують препарати рослинного походження, які не мають протиракових властивостей, але мають знеболювальні та тонізуючі якості, покращують роботу шлунково-кишкового тракту, печінки, нирок

Для вивчення протипухлинної активності досліджуваних рослин було використано метод В.Б. Іванова [4]. Суть метода базується на інгібуванні мітозу при утворенні бічних коренів, при цьому ріст головного кореня зменшується, а диференціація клітин продовжується. У методі Іванова використовують паростки огірка та інших рослин родини гарбузових, для яких характерний ранній розвиток бічних коренів, а головний корінь може деякий час рости за рахунок поділу клітин кореня зародка. Вплив водних витяжок рослин оцінювали вимірюючи інтенсивності мітотичного поділу, який проявляється у розвитку бічних коренів паростків.

Результати дослідження цитостатичної активності представлені на (рис. 2):

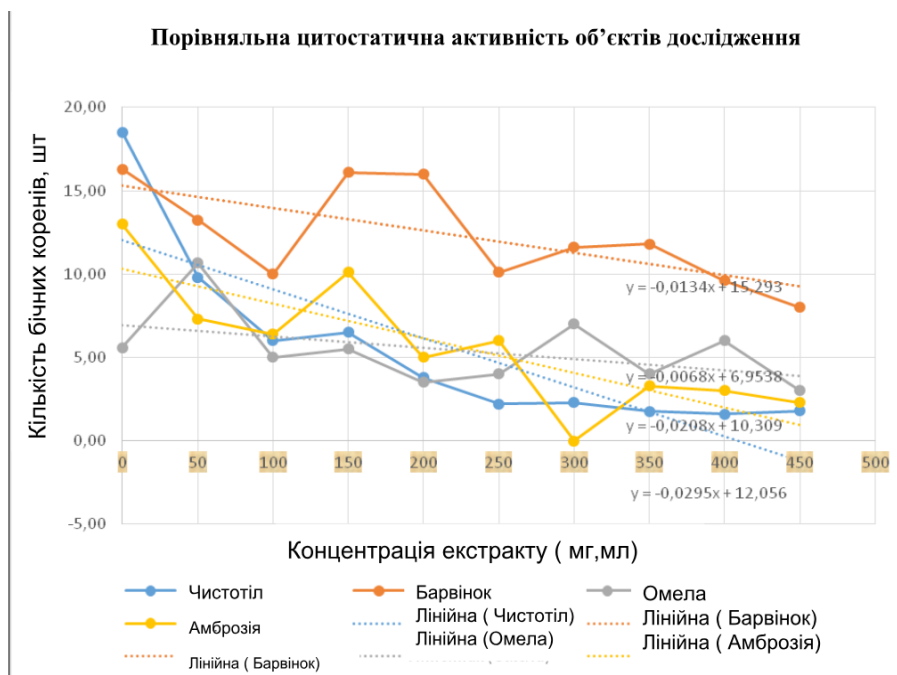


Рис. 2. Результати дослідження цитостатичної активності

Числові дані представлено у формі середньої величини із стандартною похибкою $m \pm M$. Достовірність різниці двох середніх величин оцінювали за t -критерієм Стьюдента. Контролем вважали дистильовану воду. Інтенсивність інгібування мітотичної активності можна оцінювати за кількістю бічних коренів паростків огірка при різних концентраціях відносно контролю. За такого способу оцінки цитостатичної активності можна констатувати, що ефект чистотілу великого значно перевищує протипухлинну активність омели білої та барвінка малого. Під дією водної витяжки чистотілу великого утворення бічних коренів зупиняється при концентрації 250 мг/мл, під дією водного екстракту амброзії такий ефект досягається при концентрації 300 мг/мл.

Ми запропонували оцінювати інтенсивність інгібування проліферації водними екстрактами досліджуваних лікарських рослин залежно від концентрації цього екстракту за допомогою значень тангенса кута нахилу тренду до осі абсцис. Для барвінку малого тангенс кута – 0,0134, для омели білої – 0,0068, для амброзії полинолістої – 0,0208, а для чистотілу великого – 0,0295.

Таким чином, цитостатична активність досліджуваних рослин може бути представлена наступним рядом у порядку зменшення: чистотіл великий > амброзія полиноліста > барвінок малий > омела біла.

Антибактеріальну активність водних екстрактів вивчали за допомогою метода паперових дисків (діаметр 5 мм) [5]. Тест-мікроорганізмами були: *Escherichia coli* (Migula 1985) Castellani and Chalmers 1919 ATCC 25922 (кишкова паличка), *Proteus vulgaris* Hauser, 1885 ATCC 6896 (протей вульгарний), *Pseudomonas aeruginosa* Schroeter 1872, Migula 1900 ATCC 9027 (синьогнійна паличка) і дріжджі *Candida albicans* (C.P. Robin) Berkhout 1923 ATCC 885-653 (кандіда біла). Всі мікроорганізми були отримані з Української колекції мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України. Результати дослідження антибактеріальної активності водних екстрактів амброзії полинолістої, чистотілу великого, барвінка малого та омели білої представлені в табл. 1. Усі значення достовірно відрізняються від контролю $p < 0,005$.

Таблиця 1. Порівняння антибактеріальної активності водних екстрактів амброзії полинолістої, чистотілу великого, барвінка малого та омели білої

Тест-мікроорганізм	Зона інгібування (середнє значення, мм)			
	Чистотіл великий (<i>Chelidonium majus</i>)	Барвінок малий (<i>Vinca minor</i>)	Омела біла (<i>Viscum album</i>)	Амброзія полиноліста (<i>Ambrosia artemisiifolia</i>)
<i>Escherichia coli</i>	13 $\pm$ 0,2	9 $\pm$ 0,1	-	11,34 $\pm$ 1,1
<i>Staphylococcus aureus</i>	11 $\pm$ 0,6	-	15 $\pm$ 0,3	12,5 $\pm$ 1
<i>Proteus vulgaris</i>	6 $\pm$ 0,8	7 $\pm$ 0,2	7,2 $\pm$ 0,1	11,4 $\pm$ 1,2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6 $\pm$ 0,8	-	11 $\pm$ 0,2	9,1 $\pm$ 0,5

Водний екстракт пагонів амброзії полинолістої має антибактеріальну активність відносно *Escherichia coli* незначно меншу, ніж екстракт чистотілу великого, але значно більшу, ніж екстракти барвінку малого та омели білої. Показники протистафілокової активності водного екстракту амброзії наближуються до аналогічних показників омели білої та чистотілу великого. Антибактеріальний ефект відносно протей вульгарного виявився

найбільшим у екстракту пагонів амброзії. Незначним виявився ефект амброзії полинолістої відносно *Pseudomonas aeruginosa*. Отримані дані співпадають з даними А.М. Гродзінського про антисептичний ефект трави *Ambrosia artemisiifolia* [1].

Також ми можемо припустити, що рослини родини Айстрові можуть мати літичну активність відносно конкрементів, які утворюються в нирках людини внаслідок

порушення обміну речовин [6]. Літична активність витяжки з пагонів амброзії полинолістої вивчалася методом Желтовської Н. І. відносно конкрементів, видалених з

нирок людини хірургічним шляхом. Результати експерименту представлені в табл. 2.

Таблиця 2. Літична активність лектинової витяжки з пагонів *Ambrosia artemisiifolia*

	Вага, г		Ступінь розчинності, % зміни ваги
Вид конкременту	Час експозиції		
	До обробки	Через 14 діб після обробки	
Вевеліт CaC ₂ O ₄ *2H ₂ O (оксалат)	0,32±0,002	0,284±0,002	11,25 %
Сечова кислота C ₅ H ₄ N ₄ O ₃ (урати)	0,65±0,003	0,567±0,003	12,77 %
Струвіт MgNH ₄ PO ₄ *6H ₂ O (фосфат)	0,396±0,001	0,366±0,001	7,56 %

Значення достовірно відрізняються від контролю $p < 0,05$. Достовірно ($p < 0,05$) екстракт Амброзії полинолістої зменшує масу каменів урату і оксалату.

За отриманими результатами даного експерименту, можна зробити висновок щодо літичної активності амброзії полинолістої, показники якої є досить значними. Найкращий літичний ефект лектинової витяжки амброзії спостерігався відносно уратів – розчинення на 12, 77 % за 14 діб експерименту, менші показники відносно вевеліту – 11,25 %. Майже не виявлено літичної активності досліджуваної речовини відносно фосфатів – всього 7, 56 %.

Висновки проведеного експерименту дозволяють розглядати біомасу трави амброзії як сировину для препаратів з високою цитостатичною, антибактеріальною та літичною активністю, а також для профілактики протейних та стафілококових інфекцій.

Список використаних джерел:

1. Лікарські рослини : енциклопедичний довідник / під ред. А. М. Гродзінського. – К. : Українська Енциклопедія, 1992. – 544 с.
2. Есипенко Л.П. Инвазивный сорняк Амброзия полыннолистная в биоценозах России / Л.П. Есипенко. – Краснодар : Кубанский государственный аграрный университет, 2013.
3. Мегалінська Г. П. Літична, антибактеріальна та цитостатична активність лектинів деяких лікарських рослин / Г. П. Мегалінська, К. П. Ільєнко, Н. У. Желтовська // Природничі науки на межі століть : мат-ли наук.-практ. конф., 23–25 бер. 2004. – Ніжин, 2004. – С. 64–65.
4. Иванов В. Б. Использование корней как тест-объектов для оценки биологического действия химических соединений / В. Б. Иванов // Физиология растений, 2011. – Т. 58, № 6. – С. 944–952.

5. Valgas C. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products / C. Valgas, S.M. de Souza, E. F.A. Smania, A. Smania // Brazilian Journal of Microbiology, 2007. – Vol. 38. – P. 369–380.

6. Антонюк В. О. Лектини та їх сировинні джерела / В.О. Антонюк. – Львів : ПП "Кварт", 2005. – С. 554.

7. Гарник Т. П. Основи фармакогнозії і фітотерапії : навч. посіб. / Т.П. Гарник, В.М. Князевич, В.А. Туманов. – Житомир : Рута, 2015. – С. 432.

References (Scopus):

1. Likarski roslyny: [entsyklopedychnyi dovidnyk] / pid. red. A. M. Grodzinskoho. – K.: Ukrayinska Entsiklopediya, 1992. – S. 544.
2. Esipenko L.P. Invazivnyi sorniak Ambrosiya polynolistnaya v biotsenoticheskikh vzaimodeystviyah s introdutsirovannymi fitofagami v biotsenozah Rossiyi. – Kubanskyi gosudarstvennyi agrarnyi universitet, Krasnodar, 2013.
3. Megalinska H. P. Litychna, antybakterialna ta tsytostatychna aktyvnist lektyniv deyakyh likarskyh roslyn / H. P. Megalinska, K. P. Ilyenko, N. U. Zheltovska // Pryrodnychi nauky na mezhi stolit; materialy nauk.-prakt. konph., 23–25 ber. 2004. – Nizhyn, 2004. – S. 64–65.
4. Ivanov V. B. Ispolzovaniye korney kak test-obyektov dlia otsenki biolodicheskogo deystviya himicheskikh soyedineniy / V. B. Ivanov // Phiziologiya rasteniy. – 2011. – T. 58, № 6. – S. 944–952.
5. Valgas C. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products / C. Valgas, S. M. de Souza, E. F. A. Smania, A. Smania // Brazilian Journal of Microbiology. – 2007. – Vol. 38. – P. 369–380.
6. Antonyuk V. O. Lektyny ta yikh syrovynni dzhherela. – Lviv PP "Kvart". – 2005. – S. 554.
7. Harnyk T. P., Knyazevych V. M., Tumanov V. A. Navchalnyy posibnyk "Osnovy farmakohnoziyi i fitoterapiyi". – Zhytomyr: Ruta, 2015. – S.432.

Надійшла до редколегії 04.02.2019

Отримано виправлений варіант 04.03.2019

Підписано до друку 04.03.2019

Received in the editorial 04.02.2019

Received a revised version on 04.03.2019

Signed in the press on 04.03.2019

А. Мегалінська, канд. биол. наук
Національний педагогічний університет імені М.П. Драгоманова, Київ, Україна,
М. Сокульська, студ.
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЦИТОСТАТИЧЕСКОЙ И АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ЭКСТРАКТОВ АМБРОЗИИ ПОЛЫННОЛИСТНОЙ И ДРУГИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЭКСТРАКТА АМБРОЗИИ ПОЛЫННОЛИСТНОЙ

Посвящено поиску растительных препаратов с высокой антибактериальной, цитостатической и литической активностью. Перспективными являются такие адаптогенные растения, как *Ambrosia artemisiifolia*, принадлежащая к семейству Астровых. Цель работы – исследование антибактериальной, цитостатической и литической активности водных вытяжек Амброзии и проведение сравнительного анализа этих свойств с другими лекарственными растениями. Определение того, что лектиновая вытяжка из зеленых побегов (до цветения) *Ambrosia artemisiifolia* не агглютинирует эритроциты крови, дает возможность рассматривать это сырье в качестве потенциального лекарственного средства в фармакологии. Исследование цитостатической активности методом Иванова, Быстровой позволило установить место Амброзии полыннолистной среди уже хорошо известных лекарственных растений. Цитостатическую активность исследуемых растений можно представить следующим рядом в порядке убывания: Чистотел большой (*Chelidonium majus*), Амброзия полыннолистная (*Ambrosia artemisiifolia*), Барвинок малый (*Vincetoxicum*), Омела белая (*Viscum album*). Определение антибактериальной активности позволяет утверждать о наличии противостафилококковой активности водного экстракта амброзии и значительном влиянии на кишечную палочку. Противостафилококковая активность водного экстракта амброзии приближается к Омеле белой и Чистотелу большому. Антибактериальный эффект относительно *Proteus vulgaris* был самым высоким у экстракта из побегов амброзии по сравнению с другими исследуемыми лекарственными растениями. Учитывая филогенетический метод, стало вероятным предположение о наличии у представителей семейства Астровых литической активности относительно конкрементов, образующихся в почках человека. Таким образом, проведено исследование литической активности амброзии, в результате которого установлено, что амброзия полыннолистная имеет высокую литическую активность относительно уратных и оксалатных конкрементов.

Ключевые слова: *Ambrosia artemisiifolia*, антибактериальная активность, цитостатическая активность, литическая активность.

A. Megalinska, Ph. D.
National Pedagogical Dragomanov University, Kyiv, Ukraine,
M. Sokulska, stud.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

COMPARATIVE ANALYSIS OF CYTOSTATIC AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF EXTRACTS OF AMBROSIA ARTEMISIIFOLIA AND OTHER MEDICINAL PLANTS AND DETERMINATION OF LITHIC ACTIVITY OF EXTRACTS OF AMBROSIA ARTEMISIIFOLIA

The article is devoted to the important problem of the search of herbal preparations with high antibacterial, cytostatic and lithic activity. The plants such as *Ambrosia artemisiifolia*, which belongs to the family of *Aystrou*, are promising in this direction. The aim of the presented work is to study the antibacterial, cytostatic and lithic activity of water extracts of *Ambrosia polynolitic* and conduct a comparative analysis of these properties with other medicinal plants. Determining that the lectin extract from the green shoots (until flowering) of *Ambrosia artemisiifolia* does not agglutinate red blood cells, makes it possible to consider this raw material as a potential drug in pharmacology. Investigation of cytostatic activity by the method of Ivanov and Bystrova enabled to establish a place of ambrosia among already well-known medicinal plants. The cytostatic activity of the investigated plants can be represented by the following series in the order of reduction: *Chelidonium majus*, *Ambrosia artemisiifolia*, *Vinca minor*, *Viscum album*. The establishment of antibacterial activity allowed to confirm the presence of anti-staphylococcal activity of the water extract of ambrosia and its significant effect on the colon. Anti-staphylococcus activity of the water extract of *Ambrosia artemisiifolia* is close to *Viscum album* and *Chelidonium majus*. The antibacterial effect against *Proteus vulgaris* was the highest in the extract of ambrosia shoots, compared with other medicinal plants studied. Taking into account the phylogenetic method, it could be expected that the plants of the *Aystrae* family may have a lithic activity with respect to the concrements that are formed in the kidneys of man. So, a study was conducted on the lithic activity of polystyrene embryos and it was found that *Ambrosia artemisiifolia* has a high lithic activity in relation to urate and oxalate concretions.

Key words: *Ambrosia artemisiifolia*, cytostatic activity, antibacterial activity, lithic activity.

УДК 597.08:612.017

В. Гандзюра, д-р біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна,
Н. Корево, асп.
Житомирський державний університет імені Івана Франка, Житомир, Україна

ОСОБЛИВОСТІ ФОСФОРНОГО БАЛАНСУ РИБ ЗА ПІДВИЩЕНОГО ВМІСТУ Cu^{2+} У ВОДІ

Встановлено суттєве порушення фосфорного балансу риб в умовах підвищених концентрацій Cu^{2+} у воді – різке зростання інтенсивності екскреції фосфору, що в підсумку призводить до істотного зниження його вмісту в тілі риб. Встановлені особливості фосфорного балансу риб різних трофічних груп: зоопланктонофагів, бентофагів та іхтіофагів. З'ясовано, як впливають трофічні умови на складові фосфорного балансу. Бентофаги та зоопланктонофаги за підвищеного вмісту міді мають найбільш виражені порушення фосфорного балансу, водночас хижаки-іхтіофаги, навіть при зростанні інтенсивності екскреції фосфору за підвищеного вмісту міді у водному середовищі, відзначалися мінімальними змінами його вмісту в тілі, що пояснюється хімічним складом їжі цих трофічних груп. Показано, що за вмісту Cu^{2+} у воді 10 мг / л використання корму з підвищеним вмістом фосфору (3,0%) дозволяє компенсувати його втрати внаслідок зрослої екскреції, нормалізувати природний його вміст в тілі та збільшити темп росту риб і ефективність використання ними корму. Запропоновано використовувати інтенсивність екскреції фосфору для діагностики токсичного забруднення водного середовища важкими металами. При цьому варто використовувати риб різних трофічних груп, за винятком хижаків.

Ключові слова: риба, фосфорний баланс, мідь, темп росту, раціон.

Вступ. Глобальне токсичне забруднення гідросфери призводить до формування якісно нових умов існування живих організмів, роблячи значний вплив на весь хід їх метаболічних процесів. Серед токсикантів особливе місце займають сполуки важких металів (Мур, Раммурти, 1987), рівень яких постійно зростає практично в усіх водоймах (Перевозников, Богданова, 1999; Гандзюра, 2002). Особливу роль у регуляції метаболічних процесів і енергетичному забезпеченні риб грає фосфор (Арсан і ін., 1984; Романенко та ін., 1982). Встановлено тісну співзв'язаність енергетичного і фосфорного обміну (Романенко та ін., 1982), показано, що елементи фосфорного балансу риб дуже чутливі до зміни параметрів середовища (Гандзюра, 2003). Однак відомості про баланс фосфору у риб в умовах підвищеного вмісту важких металів в літературі поодинокі (Гандзюра, 2003), а вплив міді на складові фосфорного балансу риб і зовсім не вивчено. У зв'язку з цим метою наших досліджень було встановлення змін фосфорного балансу риб в умовах підвищеного вмісту міді у воді.

Матеріали та методи. Експерименти проводили на рибках різних трофічних груп: Бентофагах – золотій рибці *Carassius auratus auratus* (L.), плітці *Rutilus rutilus* (L.), лині *Tinca tinca* (L.), бичку пісочнику *Neogobius fluviatilis* L.; зоопланктонофагах – гупії *Poecilia reticulata* Peters, окуні *Perca fluviatilis* L.; як іхтіофагів досліджували щуку *Esox lucius* L. і сома *Silurus glanis* L. Гупії і золотих рибок для експериментів відбирали з лаборатор-

ної культури – брали однорозмірних особин з одного посліду. Плітку, линя, окуня, щуку і сома відловлювали в Канівському водосховищі. Риб аклімували до умов експерименту протягом 14 діб. Використовували методику балансових дослідів (Карзинкін, Кривобок 1962). Кількість екскретованого за добу фосфору розраховували за різницею його вмісту в акваріумах з рибами і в контрольному (без риб) після добової експозиції. Вміст у воді фосфору визначали колориметричним молібдатно-сурмяновим методом з аскорбіновою кислотою (Golterman, 1969), для підвищення чутливості методу використовували екстракцію молібдатного комплексу гексанолом (Stephens, 1963). Інтенсивність дихання визначали методом замкнутих респірометрів (Лук'яненко, Карпович, 1989), вміст кисню визначали за методом Вінклера (Golterman, 1969). У всіх акваріумах контролювали вміст кисню (знаходилося в межах 6,7-8,8 мг O_2 / л), вільної вуглекислоти (близько 0,1 ммоль / л), гідрокарбонатів (287-317 мг/л), і рН (7,1-7,9). Зміну води проводили щодоби – використовували відстояну водопровідну; вміст у ній $\text{Cu}^{2+} \leq 0,25$ мг / л; Р фосфатів – 0,08 мг/л. В експерименті певні концентрації Cu^{2+} підтримували шляхом щодобового внесення відповідної кількості розчину $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ після зміни води. Кормом були личинки хірономід *Chironomidae* larvae (вміст фосфору в їх тілі становив 0,19 % у сирій і 1,19 % у сушій речовині); *Ceriodaphnia pulchella* (вміст фосфору –

0,2 % в сирій і 1,8 % – в сухій речовині); для хижаків (щуки і сома) – плітка *Rutilus rutilus* (вміст фосфору 0,5 % у сирій і 2,5 % у сухій речовині). У кінці дослідів риб висушували, гомогенізували, брали по три наважки з кожної проби, які спалювали в сульфатній кислоті з перекисом водню, після чого визначали вміст загального фосфору (Golterman, 1969). Питому швидкість росту розраховували за формулою: $g = (\ln m_2 - \ln m_1) / (t_2 - t_1) = \ln (m_2/m_1) / \Delta t$; де m_1 – маса тіла на початку періоду, m_2 – в кінці за час $t_2 - t_1 = (\Delta t)$; валову ефективність використання корму на ріст (ефективність використання раціону) – (K_1) – визначали за відношенням приросту маси тіла риб до маси спожитого корму (Рікер, 1983). Статистична обробка результатів проведена за загальноприйнятими методами (Лакин, 1990) з використанням стандартного пакета програм (додаток Statistica і Microsoft Excel 2003), з використанням t-тесту при рівні значущості 0,05.

Результати та їх обговорення. У 1-й серії дослідів досліджували інтенсивність екскреції фосфору (Ер) та інтенсивність дихання (q) у риб різних трофічних груп. Встановлено, що при голодуванні у іхтіофагів (щуки і сома) інтенсивність екскреції фосфору більше за поря-

док перевищувала цей показник для бентофагів – лина і бичка пісочника, а мінімальні значення інтенсивності екскреції фосфору характерно для окуня (3,1 мкг Р/г сирової маси тіла на добу). Ставлення q/Ер було максимальним у окуня, перевищуючи цей показник у щуки і сома майже в 18 разів. Ер у щуки і сома в 16 разів перевищує цей показник в окуня, в 11,7 раза у лина і в 9 разів – у бичка пісочника (табл. 1). Це можна пояснити тим, що вміст фосфору в тілі окуня приблизно в 1,6 раза вище, ніж інших досліджених нами видів риб, а в його кормових об'єктах – личинках хірономід – вміст фосфору в 4,7 раза нижче, ніж в його тілі. Тому окунь відчуває максимальний дефіцит фосфору і має найнижчі показники його екскреції. У кормових об'єктах іхтіофагів вміст фосфору близький до його вмісту в тілі, тому вони мають максимальний рівень екскреції фосфору, не відчуваючи в ньому дефіциту.

Таким чином, ми встановили, що інтенсивність екскреції фосфору при голодуванні і ставлення q/Ер у риб істотно залежить від відсоткового вмісту фосфору в тілі риб і їх природних кормових об'єктах. у щуки і сома в 16 разів перевищує цей показник у окуня, в 11,7 раза у лина і в 9 разів – у бичка пісочника (табл. 1).

Таблиця 1. Вміст фосфору в тілі риб, інтенсивність його екскреції (Ер) і відношення інтенсивності дихання (q) до Ер при голодуванні

Види риб	Маса тіла, г	n	Вміст фосфору в сирій речовині, %		Ер, мкг Р/г маси тіла на добу	q/Ер
			У тілі риб	У кормі		
Щука	25,34±2,21	8	0,57±0,02	0,52±0,04	48,3±4,1	142
Сом	34,59±2,01	8	0,54±0,03	0,52±0,04	52,5±4,9	139
Лин	19,91±1,49	9	0,57±0,02	0,19±0,01	4,3±0,3	398
Бичок пісочник	19,11±1,52	8	0,53±0,01	0,19±0,01	5,6±0,4	465
Окунь	20,42±2,20	9	0,90±0,05	0,19±0,01	3,1±0,4	2467

У 2-й серії експериментів з'ясовували вплив підвищеного вмісту Cu^{2+} у воді на інтенсивність екскреції фосфору за різної величини добового раціону. У контролі при харчуванні до насичення золоті рибки абсорбували фосфор з води, водночас при голодуванні та

за раціону, величина якого становила половину від максимального, мала місце його екскреція. За підвищеного вмісту Cu^{2+} у воді інтенсивність екскреції фосфору різко зростала як при голодуванні, так і при живленні (табл. 2).

Таблиця 2. Інтенсивність екскреції фосфору у двомісячної золотої рибки (маса тіла 832±23 мг) у контролі та за різної концентрації Cu^{2+} у воді (n=15 в кожному акваріумі)

Величина раціону, частки від максимального	Екскреція фосфору, мкг Р/г маси тіла на добу за різної концентрації Cu^{2+} у воді			
	Контроль	1мкг Cu^{2+} /л	10 мкг Cu^{2+} /л	100 мкг Cu^{2+} /л
0	1,67±0,09	2,18±0,11*	3,43±0,17*	3,76±0,21*
0,5	0,17±0,04	0,66±0,12*	0,92±0,07*	0,89±0,11*
1,0	-0,64±0,11	0,17±0,01*	0,52±0,08*	0,64±0,06*

Примітка: * – відмінність з контролем вірогідна ($P \leq 0,5$).

Таким чином, величина добового раціону має суттєвий вплив на інтенсивність екскреції фосфору: при харчуванні до насичення молодь золотої рибки лише поглинала фосфор з води, в той час як при голодуванні і при раціоні, що становить 0,5 від величини максимального, має місце його екскреція. Це обумовлено тим, що переважна більшість риб (за винятком іхтіофагів) відчуває дефіцит в цьому елементі: вміст фосфору в тілі риб в середньому в 2-3 рази вище, ніж в кормових об'єктах (за винятком іхтіофагів) (Гандзюра, 2005). Тому у молоді риб, яка живиться і росте, дефіцит фосфору компен-

сується шляхом абсорбції розчинених у воді фосфатів. За вмісту у воді від 1 мкг Cu^{2+} / л і вище спостерігалася лише екскреція фосфору рибами.

У 3-й серії дослідів досліджували інтенсивність екскреції фосфору, питому швидкість росту риб і ефективність використання ними раціону (живлення до насичення) як у контролі, так і за різної концентрації Cu^{2+} у воді. Встановлено, що підвищений вміст міді у воді призводить не тільки до зростання інтенсивності екскреції фосфору, а й до зниження темпів росту та ефективності використання раціону (табл. 3).

Таблиця 3. Ріст і ефективність використання раціону в групі (вік 1-2 міс.) за різної концентрації Cu^{2+} у воді ($n = 13$ в кожному акваріумі)

Концентрація міді, мкг Cu^{2+} /л	Інтенсивність екскреції, мкг Р/г маси тіла на добу	Питому швидкість росту		Ефективність використання раціону	
		% на добу	% від контролю	%	% від контролю
Контроль	-1,31±0,09	7,7±0,2	100	21,2±1,4	100
1	1,96±0,11	5,9±0,1	77	17,5±1,1	83
10	2,32±0,16	5,2±0,2	67	11,9±1,0	56
100	2,83±0,18	2,5±0,2	32	7,8±0,9	37
1000	2,47±0,21	1,0±0,1	13	1,9±0,7	9

Таким чином, в 30-ти добових експериментах з групи встановлено, що чим вище концентрація Cu^{2+} у воді, тим вища інтенсивність екскреції рибами фосфору і тим нижче питома швидкість росту і ефективність використання раціону.

У 4-ї серії дослідів досліджували вплив підвищеної екскреції фосфору (в умовах 1 мкг Cu^{2+} / л) на його вміст у тілі риб різних трофічних груп (табл. 4).

Таблиця 4. Вміст фосфору в тілі риб на початку та в кінці 40-ка добового експерименту за концентрації 10 мкг Cu^{2+} /л ($n = 10$ у кожному акваріумі)

Кормові об'єкти	% Р в кормі (сира /суха речовина)	Маса тіла риб, мг		% сухої речовини в кінці експерименту	Вміст фосфору в сухій речовині, %	
		На початку експе-рименту	В кінці експерименту		Контроль	Експеримент
Золота рибка						
C. pulchella	0,2/1,8	28±2	697±19	17,6±0,5	2,4±0,2	1,6±0,1*
Ch. larvae	0,2/1,2	789±17	1871±69	19,8±0,5	2,5±0,2	2,0±0,1*
Плітка						
Ch. larvae	0,2/1,2	743±14	2087±83	21,3±0,5	2,5±0,2	1,9±0,1*
Окунь						
C. pulchella	0,2/1,8	42±4	1435±89	19,7±0,5	2,8±0,2	1,9±0,1*
Ch. larvae	0,2/1,2	2076±64	4195±81	20,9±0.7	3,0±0,2	2,2±0,2*
Щука						
Плітка	0,5/2,5	689±34	2376±97	18,2±0,5	2,9±0,2	2,8±0,2

Примітка: * – відмінність з контролем вірогідна ($P \leq 0,5$).

У золотої рибки, плітки та окуня, що харчувалися *Ceriodaphnia pulchella* і Chironomidae larvae при 1 мкг Cu^{2+} / л, вміст фосфору в кінці експерименту був нижчим, ніж у контролі. Чим дрібніша молодь, тим істотніше зниження вмісту фосфору в тілі (при 1 мкг Cu^{2+} / л). Це пов'язано з тим, що найбільш інтенсивно фосфор накопичується в тілі риб на ранніх етапах розвитку (Гандзюра, 1985), тому порушення екскреторно-абсорбційних процесів у цей період особливо небезпечний для риб, викликаючи істотні порушення фосфорного балансу. У молоді щуки, яка, харчувалася мальками плітки, вміст фосфору в тілі не відрізнявся від контролю (табл. 4).

Таким чином, за підвищеного вмісту у воді Cu^{2+} відбувається істотне порушення фосфорного балансу у риб: різко зростає інтенсивність екскреції фосфору, що в більшості випадків призводить до зниження його вмісту в тілі. При цьому відбувається зниження темпу росту і ефективності використання раціону.

5-та серія дослідів – з'ясовували можливість компенсації втрат фосфору рибами при токсичному впливі підвищених концентрацій Cu^{2+} шляхом використання корму з підвищеним вмістом фосфору. Золотих рибок і групи годували *Ceriodaphnia pulchella*; як корм з підвищеним вмістом фосфору (3,0 % в сухій речовині) використовували збагачений фосфором корм фірми Tetra (Німеччина) (табл. 5).

Таблиця 5. Маса тіла та вміст фосфору в тілі риб на початку та наприкінці 40-ка добового експерименту в контролі та за концентрації 10 мкг Cu^{2+} /л

% фосфору в кормі	Маса тіла, мг				Вміст фосфору в тілі риб, % в сухій речовині	
	На початку експерименту		40-а доба			
	Контроль	10 мкг Cu ²⁺ /л	Контроль	10 мкг Cu ²⁺ /л	Контроль	10 мкг Cu ²⁺ /л
Золота рибка (n = 10 в кожному акваріумі)						
1,8	31±4	34±3	879±23	688±20*	2,4±0,2	1,7±0,1*
3,0	34±3	33±2	1009±69	1087±83	2,6±0,1	2,6±0,1
Гуппі (n = 20 в кожному акваріумі)						
1,8	28±4	26±3	459±19	348±23*	2,3±0,2	1,9±0,1*
3.0	29±3	33±4	511±21	497±18	2,7±0.2	2,7±0.2

Примітка: * – різниця з контролем вірогідна ($P \leq 0,5$).

Встановлено, що використання корму з вмістом фосфору 3,0 % в умовах підвищеного вмісту Cu^{2+} у воді призводить до відновлення природного вмісту фосфору

в тілі риб. При цьому збільшується темп росту риб, підвищується ефективність використання раціону і зростає вміст сухої речовини в тілі риб (табл. 6).

Таблиця 6. Прирости маси тіла, ефективність використання раціону у риб і вміст сухої речовини на початку та наприкінці 40-ка добового експерименту за різного вмісту Cu^{2+} у воді

% фосфору в кормі	Маса тіла на початку експерименту	Прирости маси тіла за 40 діб, мг		Ефективність використання раціону, %		Вміст сухої речовини в тілі риб у кінці експерименту, %	
		Контроль	1мкг Cu ²⁺ /л	Контроль	1 мкг Cu ²⁺ /л	Контроль	1 мкг Cu ²⁺ /л
Золота рибка (n = 10 в кожному акваріумі)							
1,8	31±4	848	655	22,8	16,5	18,5±0,4	17,6±0,5
3,0	34±3	975	1055	28,7	27,9	18,2±0,2	18,1±0,3
Гуппі (n = 20 в кожному акваріумі)							
1,8	28±4	431	315	18,2	14,1	17,2±0,3	16,0±0,4
3,0	29±3	482	464	21,8	22,1	19,0±0,3	19,2±0,4

Таким чином, нами встановлено, що використання корму з підвищеним вмістом фосфору дозволяє вирішити проблему порушення фосфорного балансу риб в умовах підвищеного вмісту Cu^{2+} в воді, що призводить до відновлення природного вмісту фосфору в тілі риб, компенсуючи його втрати внаслідок посиленої екскреції. В результаті збільшується темп росту риб і ефективність використання ними корму.

Отримані нами дані узгоджуються з наявними в літературі даними (Бриченкова, 1989; Ogino, Takeda, 1976) про позитивний вплив на темп росту риб підвищеного вмісту фосфору в кормах, проте ці дані наведені для не забруднених водойм і без дослідження фосфорного балансу риб. Для умов ж токсичного впливу важких металів і порушення фосфорного балансу риб аналогічних даних в літературі немає.

Висновки. В умовах підвищеного вмісту у воді Cu^{2+} від 1 мкг / л і вище порушується структура фосфорного балансу риб: значно зростає інтенсивність екскреції фосфору, що в підсумку призводить до зменшення його вмісту в тілі. При цьому знижується темп зростання і ефективність використання раціону. Істотний вплив на інтенсивність екскреції фосфору надає величина добового раціону: у всіх випадках (і в контролі, і при підвищеному вмісті кадмію у воді) вона максимальна у голодуючих риб. При харчуванні інтенсивність екскреції значно знижується, а при харчуванні до насичення має місце його абсорбція з розчинених у воді фосфатів. В умовах високого (1 мкг Cu^{2+} / л) вмісту кадмію використання кормів з підвищеним вмістом фосфору (3,0 % на суху речовину) призводить до нормалізації його вмісту в тілі риб, при цьому збільшується темп зростання і ефективність використання корму.

Список використаних джерел:

1. Арсан О. М. Роль фосфора водной среды в регуляции биоэнергетических процессов у рыб / О.М. Арсан, В.Д. Соломатина, В.Д. Романенко // Гидробиол. журн., 1984. – Т. 20, № 1. – С. 53–57.
2. Бриченкова И.В. Влияние обогащения кормов фосфором на обмен веществ и рост молоди радужной форели в условиях замкнутых систем : тез. докл. / И.В. Бриченкова // Экологическая физиология и биохимия рыб. VII Всесоюз. конф. (Ярославль, май, 1989 г.), 1989. – Ярославль. – Т. 1. – С. 57–58.
3. Гандзюра В.П. Содержание фосфора в теле рыб днепровских водохранилищ / В.П. Гандзюра // Гидробиол. журн., 1985. – Т. 21, № 6. – С. 84–87.
4. Гандзюра В.П. Фосфорный баланс рыб при действии тяжелых металлов (Cr^{6+} , Ni^{2+}) водной среды / В.П. Гандзюра // Гидробиол. журн., 2003. – Т. 39, № 5. – С. 92–100.
5. Карзинкин Г.С. Методика постановки балансовых опытов по изучению обмена азота у рыб / Г.С. Карзинкин, М.Н. Кривобок // Руководство по методике исследования физиологии рыб, 1962. – М. – С. 108–126.
6. Лакин Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин. – М. : Высш. шк., 1990. – 352 с.
7. Линник П.Н. Кадмий в поверхностных водах: содержание, формы нахождения, токсическое действие / П.Н. Линник, И.В. Искра // Гидробиол. журн., 1997. – Т. 33, № 6. – С. 72–85.
8. Лукьяненко В.И., Карпович Т.А. Биотестирование на рыбах : метод. рекомендации / В.И. Лукьяненко, Т.А. Карпович // АН СССР, 1989. – 96 с.

9. Мур Дж. В. Тяжелые металлы в природных водах: Контроль и оценка влияния / Дж.В. Мур, С. Рамамурти. – М. : Мир, 1987. – 288 с.

10. Перевозников М.А. Тяжелые металлы в пресноводных экосистемах / М.А. Перевозников, Е.А. Богданова. – С.-Пб., 1999. – 228 с.

11. Рикер У.Е. Количественные показатели и модели роста рыб / У.Е. Рикер ; пер. с англ. ; под ред. У. Хоара, Д. Рендолла, Дж. Бретта // Биоэнергетика и рост рыб. – М. : Легкая и пищ. пром-сть, 1983. – С. 346–402.

12. Романенко В.Д. Кальций и фосфор в жизнедеятельности гидробионтов / В.Д. Романенко, О.М. Арсан, В.Д. Соломатина. – Киев : Наук. думка, 1982. – 152 с.

13. Golterman H.L. Methods for Chemical Analysis of Fresh Waters / H.L. Golterman. – IBP, Oxford and Edinburg, Handbook №8. – 1969. – 172 p.

14. Ogino Ch., Takeda. Mineral requirements in fish. III. Calcium and phosphorus requirements in carp / Ch. Ogino, Takeda // Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 1976. – Vol. 42, № 7. – P. 793–799.

15. Stephens K. Determination of low phosphate concentration in lake and marine water / K. Stephens // Limnol. Oceanogr., 1963. – Vol. 8. – P. 361–362.

Reference (Scopus):

1. Arsan O.M., Solomatina V.D., Romanenko V.D. 1984. The role of phosphorus of aquatic environment in the regulation of bioenergetic processes in fish // Hydrobiol. Journal/ V. 20. № 1. P. 53-57. Russian.
2. Brychenkova I.V. 1989. The effect of phosphorus feed enrichment on the metabolism and growth of rainbow trout fry in closed systems // Ecological physiology and biochemistry of fish. VII All-Union. conf. (Yaroslavl, May, 1989): Tez.dokl. – Yaroslavl. V. 1. P. 57-58. Russian.
3. Gandziura V.P. 1985. Phosphorus content in the body of fish of the Dnieper reservoirs // Hydrobiol. Journ. V. T. 21. № 6. P. 84-87. Russian.
4. Gandziura V.P. 2003. Phosphorus balance of fish under the action of heavy metals (Cr^{6+} , Ni^{2+}) of the aquatic environment // Hydrobiol. Journ. V. 39. 21. № 5. P. 92-100. Russian.
5. Karzinkin G.S., Krivobok M.N. 1962. Methods of carrying out balance experiments on the study of nitrogen metabolism in fish // Guidelines for the methods of studying the physiology of fish. P. 108-126. Russian.
6. Lakin G.F. 1990. Biometriya. M: Vysshaya shkola. 352 p. Russian.
7. Linnik P.N., Iskra I.V. 1997. Cadmium in surface waters: content, location, toxic effect // Hydrobiol. Journ 1997. V. 33. № 6. P. 72-85. Russian.
8. Lukianenko V.I., Karpovich T.A. 1989. Biotesting on fish / Guidelines / Academy of Sciences of the USSR. Russian.
9. Mur J.V., Ramamurti S. 1987. Heavy metals in natural waters: Monitoring and impact assessment. M : Mir. 288 p.
10. Perevoznikov M.A., Bogdanova E.A. 1999. Heavy metals in freshwater ecosystems. St. Petersburg, 1999. 228 p. Russian.
11. Riker U. Ye. 1983. Quantitative indicators and models of fish growth // Bioenergy and fish growth: Trans. from English / Ed. W. Hoara, D. Rendoll, J. Brett. M.: Light and food. prom-st. Pp. 346-402
12. Romanenko V.D., Arsan O.M., Solomatina V.D. 1982. Calcium and phosphorus in the life of hydrobionts. Kiev: Sciences. dumka 152 s. Russian.
13. Golterman H.L. 1969. Methods for Chemical Analysis of Fresh Waters. IBP, Handbook №8. Oxford and Edinburg. 172 p.
14. Ogino Ch., Takeda. 1976. Mineral requirements in fish. III. Calcium and phosphorus requirements in carp // Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. Vol. 42. №7. P. 793-799.
15. Stephens K. 1963. Determination of low phosphate concentration in lake and marine water // Limnol. Oceanogr. V. 8. P. 361-362.

Надійшла до редколегії 04.02.2019

Отримано виправлений варіант 04.03.2019

Підписано до друку 04.03.2019

Received in the editorial 04.02.2019

Received a revised version on 04.03.2019

Signed in the press on 04.03.2019

В. Гандзюра, д-р біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна,
Н. Корево, асп.
Житомирський державний університет імені Івана Франка, Житомир, Україна

ОСОБЕННОСТИ ФОСФОРНОГО БАЛАНСА РЫБ В УСЛОВИЯХ ПОВЫШЕННОГО СОДЕРЖАНИЯ Cu^{2+} В ВОДЕ

Установлено существенное нарушение фосфорного баланса рыб в условиях повышенных концентраций Cu^{2+} в воде – резкое увеличение интенсивности экскреции фосфора, что в итоге приводит к существенному снижению его содержания в теле рыб. Установлены особенности фосфорного баланса рыб различных трофических групп: зоопланктонофагов, бентофагов и ихтиофагов. Выяснено, как влияют трофические условия на составляющие фосфорного баланса. Бентофаги и зоопланктонофаги в условиях повышенного содержания меди в воде имеют более выраженные нарушения фосфорного баланса, в то время как хищники-ихтиофаги, даже при увеличении интенсивности экскреции фосфора в условиях повышенного содержания меди в водной среде, отличались минимальными изменениями его содержания в теле, что объясняется химическим составом пищи этих трофических групп. Показано, что при содержании Cu^{2+} в воде 10 мкг/л, использование корма с повышенным содержанием фосфора (3,0 %) позволяет компенсировать его потери вследствие возросшей экскреции, нормализовать естественное его содержание в теле и увеличить темп роста рыб, а также эффективность использования ими корма. Предложено использовать интенсивность экскреции фосфора для диагностики токсического загрязнения водной среды тяжелыми металлами. При этом следует использовать рыб различных трофических групп, за исключением хищников.

Ключевые слова: рыба, фосфорный баланс, медь, темп роста, рацион.

V. Gandziura, Dr. Sci.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine,
N. Korevo, Ph. D. stud.
Zhytomyr Ivan Franko State University, Zhytomyr, Ukraine

PECULIARITIES OF FISH PHOSPHORUS BALANCE AT A HIGH Cu^{2+} CONTENT IN WATER

The essential infringements of fish phosphorus balance at elevated concentrations of Cu^{2+} in water was established – a sharp increase of intensity of phosphorus excretion, which ultimately leads to a significant decrease in its content in the body of fish. The peculiarities of the phosphorus balance of fish of various trophic groups: zooplankton phage, benthophages and ichthyophages have been established. It was found out how trophic conditions effect on the components of the phosphorus balance. It was found out how trophic conditions affect the components of the phosphorus balance. Benthofages and zooplankton- phages at the conditions of higher copper content have more pronounced disorders the phosphorus balance then ichthyophages- predators at the same time, even with an increase in the intensity of phosphorus excretion due to the increased copper content in the aquatic environment, was noted by minimal changes in its content in the body, due to the chemical composition of the food of these trophic groups. It was shown that when the content of Cu^{2+} in water is 10 $\mu\text{g} / \text{l}$ of feed use with a high phosphorus content (3.0 %), it can compensate for its loss due to increased excretion, normalize its natural content in the body and increase the growth rate of fish and their feed efficiency. It is proposed to use the intensity of phosphorus excretion for the diagnosis of toxic pollution of the aquatic environment by heavy metals. At the same time, fish of various trophic groups should be used, with the exception of predators.

Key words: fish, phosphorus balance, copper, growth rate, diet.

УДК: 616.62-006.6-073

В. Дмитрик, асп., О. Савчук, д-р біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна,
Ю. Зінкова, студ.
ТОВ "Фармацевтичний завод "Біофарма", Київ, Україна

ВМІСТ БІЛКІВ ТЕПЛООВОГО ШОКУ HSP60 ТА HSP70 У ТКАНИНАХ ПУХЛИН ХВОРИХ НА РАК СЕЧОВОГО МІХУРА

Рак сечового міхура (PCM) залишається захворюванням з високим показником смертності. PCM є 9-м за частотою онкологічним захворюванням в світі. Згідно з даними статистики найбільша кількість хворих на PCM пацієнтів у розвинених країнах. Близько 75 % хворих – чоловіки. Різноманітні молекули були ідентифіковані як потенційні прогностичні індикатори та/або мішені для даного захворювання. Однак пошук мішеней для лікування і попередження PCM залишається актуальним. Останнім часом проводяться дослідження участі білків теплового шоку (БТШ) у патогенезі злоякісних новоутворень. Високий рівень експресії шаперонів пов'язують із захистом трансформованих клітин та блокуванням апоптозу. Дані про надмірну експресію БТШ опубліковано для різних онкологічних захворювань, серед яких рак молочної залози, шийки матки, товстої кишки, легень та простати. Останні дослідження тісно пов'язують значення вмісту шаперонів із подальшим прогнозом хвороби. Мета роботи – виявити динаміку вмісту БТШ HSP70 та HSP60 у пухлинах і стінках здорового міхура у хворих на PCM залежно від стадії раку за TNM класифікацією, а також залежно від ступеня гістопатологічної градації. При дослідженні встановлено збільшення вмісту БТШ у гомогенатах пухлин порівняно зі зразками здорових стінок сечового міхура, тобто підвищений вміст БТШ може бути асоційований із PCM. Помічено збільшення вмісту БТШ родини HSP60 та HSP70 залежно від стадії PCM, а також від ступеня диференціації клітин. Високий рівень експресії БТШ може забезпечувати правильне згортання і мембранний транспорт продуктів онкогенів та антионкогенів. З іншого боку, високий біосинтез БТШ може регулювати деградацію гіпсованих білків та швидко нормалізувати білковий метаболізм у трансформованих клітинах, забезпечуючи швидкий ріст злоякісних пухлин.

Ключові слова: рак сечового міхура, білки теплового шоку, шаперони, імуноферментний аналіз.

Вступ. Рак сечового міхура (PCM) продовжує бути захворюванням з високим показником смертності. PCM є 9-тим по частоті онкологічним захворюванням в світі [11]. Згідно з даними статистики, найбільша кількість хворих на PCM пацієнтів в розвинених країнах. Близько 75 % хворих – чоловіки [11]. Білки теплового шоку (БТШ, від англ. HSP-heat shock proteins) є гетерогенною групою еволюційно висококонсервативних білків, які можуть бути синтезовані в усіх клітинах організму та

забезпечують захист від внутрішньоклітинних та позаклітинних факторів [13]. БТШ виконують функцію молекулярних шаперонів, які відповідають за підтримання внутрішньоклітинного гомеостазу, забезпечуючи правильну збірку, згортання, збереження конформації білків [10] та їх трансфер у відповідні внутрішньоклітинні компартменти, а також беруть участь у регуляції транскрипції генів та процесах клітинного росту, розвитку, диференціації. [2,3,5,8]. Окрім вищеописаного, БТШ за-

безпечують нативне згорання розгорнутих білків, та беруть участь в утилізації шляхом деградації необоротно розгорнутих білків [6,15]. БТШ є медіаторами клітинної відповіді, включаючи як інгібування шляхів апоптозу, так і посилення імунної відповіді [3]. БТШ відіграють важливу роль в утворенні антитіл і презентації антигенів [12, 14], розпізнаються як Т-клітинами так і натуральними кілерами (НК) [9]. На основі наближених значень молекулярної маси (кДа) БТШ розподіляють на окремі родини HSP90a, HSP70, HSP60 та маленькі білки теплового шоку [3].

Різноманітні молекули були ідентифіковані як потенційні прогностичні індикатори та/або мішеней для РСМ. Однак пошук мішеней для лікування та попередження РСМ залишається актуальним [16]. Останнім часом проводяться дослідження участі білків теплового шоку в патогенезі злоякісних новоутворень, в яких пов'язують високу експресію шаперонів з захистом трансформованих клітин та блокуванням апоптозу. Дані про надмірну експресію шаперонів були опубліковані для різних онкологічних захворювань, серед яких рак молочної залози, шийки матки, товстої кишки, легень та простати. Останні дослідження тісно пов'язують рівень експресії шаперонів з подальшим прогнозом хвороби [7].

Метою роботи було виявити динаміку вмісту БТШ родини HSP70 та HSP60 в пухлинах та стінках здорового міхура у хворих на РСМ залежно від стадії раку за TNM класифікацією, а також залежно від ступеня гістопатологічної градації.

Матеріали та методи. Зразки здорових та патологічних тканин отримані у хворих на РСМ. Заключний діагноз ставився після рентгенологічних, ендоскопічних, клінічних методів дослідження з обов'язковою морфологічною верифікацією. У досліді брали участь 22 пацієнти. Групу T1-2 становили 12 чоловіків, групу T3-4 становили 10 чоловіків. За ступенем клітинної диференціації – 11 чоловіків були включені в групу G1-2, а також 11 чоловіків в групу G3-4.

Гомогенати пухлин сечового міхура були отримані під час операційного втручання. Здорові тканини стінок стравоходу були отримані за допомогою біопсії. Всі зразки гомогенатів здорових стінок та пухлин були нормалізовані за концентрацією білка 10 мкг/мл, використовуючи метод за Бредфорд [1]. Вміст БТШ HSP60 та HSP70 в гомогенатах тканин пухлин визначали за використанням методу імуноферментного аналізу в модифікації ELISA [11]. Використовували набір первинних та вторинних антитіл виробника Santa Cruz Biotechnology,

CA, USA. В плашки для імуноферментного аналізу наносили попередньо нормалізовані за концентрацією білка гомогенати тканин здорових стінок та пухлин та залишали на ніч при температурі 4°C. Після промивки, на плашки наносили 5 % обезжирене сухе молоко та інкубували протягом 1 год при температурі 37°C, після чого знову промивали. Після інкубації протягом 1 год при 37°C з відповідними первинними антитілами проти відповідних БТШ плашки промивали та інкубувалися протягом 1 год при 37°C з відповідними вторинними антитілами конюгованими з пероксидазою хрому. Після чергової промивки були додані субстрати до пероксидази хрому. Реакцію зупиняли додаванням 2.5 Н H₂SO₄. Показники оптичної щільності отримували за допомогою відповідного рідера для мікроплашок (μQuant™, BioTek Instruments, Inc) при довжині хвилі – 492 нм. Статистичну обробку отриманих результатів проводили за допомогою методів варіаційної статистики з використанням комп'ютерної програми Excel.

Результати та обговорення. В невеликій кількості БТШ синтезуються в клітинах за нормальних фізіологічних умов, беруть участь в рості та метаболізмі клітин. Однак за умов клітинного стресу, біосинтез БТШ значно зростає, так як вони беруть участь у коректному відновленні денатурованих внаслідок клітинного стресу білків. Такий, клітинний шок може бути викликаний гіпотермією, іонами важких металів, гіпоксією, гіпероксією та цитотоксичними агентами [3,17]. Клітини злоякісних новоутворень перебувають у стані протеотоксичного стресу внаслідок біосинтезу онкобілків, нестабільності геному, локальної гіпоксії та ацидозу. Більше того, виживаність трансформованих клітин залежить від участі БТШ в захисті онкобілків від агрегації, що в нормі привело б до апоптозу та клітинної гибелі [19].

БТШ людини родини HSP60 є продуктом гена **HSPD1** та вважається мітохондріальним шапероном. Дослідження останніх десятиліть вказують на присутність HSP60 поза внутрішньомітохондріальним простором, більш того, при онкозахворюваннях відмічена циркуляція HSP60 поза клітинним простором та в кровотоці [4]. Незважаючи на численні експериментальні докази наявності HSP60 в позаклітинному просторі, механізм такої транслокації ще не з'ясований. Нами було досліджено вміст HSP60 в гомогенатах пухлин та здорових стінках сечового міхура залежно від стадії захворювання (табл. 1) та залежно від ступеня диференціації клітин (табл. 2).

Таблиця 1. Вміст БТШ родини HSP60 у тканинах пухлин РСМ порівняно з тканинами здорових стінок сечового міхура згідно з TNM класифікації захворювання

Група	Вміст HSP60 (y.o./мл)
Здорові стінки міхура	42.97±3.44
T1-2	56.1±6.18
T3-4	75.28±14.45*

Для контролю (здорові стінки міхура) M±m, n=13; для T1-2 M±m, n=12; для T3-4 M±m, n=10; * – p < 0.05 достовірно відносно значень контролю.

Нами було відмічене підвищення вмісту БТШ родини HSP60 залежно від стадії РСМ. Для першої та другої стадії (табл. 1) вміст HSP60 (y.o./мл) був вищим в 1.3

раза, тоді як для третьої та четвертої стадії вміст був вищим в 1.75 раза відносно вмісту в здорових стінках сечового міхура.

Таблиця 2. Вміст БТШ родини HSP60 у тканинах пухлин РСМ порівняно з тканинами здорових стінок сечового міхура відповідно до ступеня диференціації клітин

Група	Вміст HSP60 (y.o./мл)
Здорові стінки міхура	39.7±4.5
G1-2	70.35±8.4*
G3-4	79.03±17.1*

Для контролю (здорові стінки міхура) M±m, n=13; для T1-2 M±m, n=11; для T3-4 M±m, n=11; * – p < 0.05 достовірно відносно значень контролю.

Відмічене збільшення вмісту HSP60 (у.о./мл) залежно від ступеня диференціації клітин. Для G1-2 вмісту був вищим в 1,77 раза (табл. 2), тоді як для G3-4 вмісту був вищим майже вдвічі. Дещо більше інформації відомо щодо родини БТШ HSP70, ці шаперони класично відносять до внутрішньоклітинних білків, проте відзначають їх позаклітинну присутність [18]. Посилення біосинтезу БТШ родини HSP70 було досліджено для декількох типів злоякісних пухлин, а інгібування експресії HSP70 у тран-

сформованих клітинах призводить до супресії їх клітинного росту [18]. При злоякісних новоутвореннях позаклітинні HSP70 беруть участь в регуляції аспектів імунної відповіді, росту та поширення пухлин [18]. Ми дослідили вміст HSP70 у гомогенатах пухлин та здорових стінок сечового міхура залежно від стадії захворювання (табл. 3) і залежно від ступеня диференціації клітин (табл. 4).

Таблиця 3. Вміст БТШ родини HSP70 у тканинах пухлин РСМ порівняно з тканинами здорових стінок сечового міхура згідно з TNM класифікації захворювання

Група	Вміст HSP70 (у.о./мл)
Здорові стінки міхура	33.7±2.37
T1-2	41.9±3.74*
T3-4	68.55±11.65*

Для контролю (здорові стінки міхура) $M \pm m$, $n=13$; для T1-2 $M \pm m$, $n=12$; для T3-4 $M \pm m$, $n=10$; * – $p < 0.05$ достовірно відносно значень контролю.

Вміст БТШ родини HSP70 в тканинах пухлин групи T1-2 був в 1,24 раза вищим, ніж в здорових стінках мі-

хура. У групі T3-4 вміст БТШ родини HSP70 був у 2,03 раза вищим ніж у здорових стінках сечового міхура.

Таблиця 4. Вміст БТШ родини HSP70 в тканинах пухлин РСМ порівняно з тканинами здорових стінок сечового міхура відповідно до ступеня диференціації клітин

Група	Вміст HSP70 (у.о./мл)
Здорові стінки міхура	34.5±4.14
G1-2	37.03±4.44
G3-4	52.37±9.86*

Для контролю (здорові стінки міхура) $M \pm m$, $n=13$; для T1-2 $M \pm m$, $n=11$; для T3-4 $M \pm m$, $n=11$; * – $p < 0.05$ достовірно відносно значень контролю.

Вміст HSP70 у групі G1-2 був вищим у 1,07 раза, ніж в здорових стінках сечового міхура. У групі G3-4 вміст HSP70 був в 1,51 раза вищим, ніж в здорових стінках стравоходу.

Отже, вміст БТШ в гомогенатах пухлин був достовірно вищим ніж в зразках здорових стінок сечового міхура, тобто збільшений вміст БТШ може бути асоційований з РСМ. Відмічено підвищення вмісту БТШ родини HSP60 та HSP70 залежно від стадії РСМ, а також від ступеня диференціації клітин. Високий рівень експресії БТШ може забезпечувати правильне згорання та мембранний транспорт продуктів онкогенів та антионкогенів. З іншого боку, високий ступінь біосинтезу БТШ може регулювати деградацію зіпсованих білків та швидко нормалізувати білковий метаболізм в трансформованих клітинах, забезпечуючи ріст злоякісних пухлин. Дані нашого дослідження узгоджуються з даними попередніх досліджень, проведених при вивченні інших новоутворень, які вказують про взаємозв'язок підвищеного рівня БТШ з розвитком злоякісних захворювань. Наші дослідження можуть свідчити про участь БТШ в онкогенезі при РСМ.

Список використаних джерел:

- Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. / M. M. Bradford. – 1976. – №72. – С. 248–254.
- Calderwood S.K. Heat shock proteins: stress proteins with Janus-like properties in cancer / S.K. Calderwood, D.R. Ciocca // Int. J. Hyperthermia, 2008. – №24. – С. 31–39.
- Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis. / S.K. Calderwood, D.B. Sawyer, M.A. Khaleque, D.R. Ciocca // Trends Biochem. Sci., 2006. – №31. – С. 164–172.
- Hsp60 expression, new locations, functions and perspectives for cancer diagnosis and therapy / F. Cappello, E. Conway de Macario, L. Marasa et al. // Cancer Biol Ther., 2008. – №7. – С. 801–809.
- Ciocca D.R. Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications / D. R. Ciocca, S.K. Calderwood // Cell Stress Chaperones, 2005. – №10. – С. 86–103.
- Doyle S.M. Asymmetric deceleration of ClpB or Hsp104 ATPase activity unleashes protein-remodeling activity / S.M. Doyle // Nat. Struct. Mol. Biol., 2007. – №14. – С. 114–122.

- Prognostic role of HSPs in human gastrointestinal cancer: a systematic review and meta-analysis / H. Ge, Y. Yan, L. Guo et al. // Onco Targets Ther., 2018. – №11. – С. 351–359.
- Gershenson A. Protein folding in the cell: challenges and progress / A. Gershenson, L. M. Gierasch // Curr Opin Struct Biol., 2010. – №21. – С. 32–41.
- Harada M. Heat shock proteins and the antitumor T cell response / M. Harada, G. Kimura, K. Nomoto // Biotherapy, 1998. – №10. – С. 229–235.
- Hartl F.U. Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo / F.U. Hartl, M. Hayer-Hartl. // Nat. Struct. Mol. Biol., 2009. – №16. – С. 574–581.
- Plasma levels of MMPs and TIMP-1 in urinary bladder cancer patients / T.V. Ishchuk, D. Glavachek, O.M. Savchuk et al. // Biomedical Research and Therapy, 2018. – №5. – С. 1931–1940.
- Kaufmann S. H. Heat shock proteins and the immune response / S. H. Kaufmann // Immunol. Today, 1990. – №11. – С. 129–136.
- Lee G. J. A small heat shock protein cooperates with heat shock protein 70 systems to reactivate a heat-denatured protein. / G.J. Lee, E. Vierling // Plant Physiol., 2002. – №122. – С. 189–197.
- Li Z. Roles of heatshock proteins in antigen presentation and cross-presentation. / Z. Li, A. Menoret, P. Srivastava // Curr. Opin. Immunol., 2002. – №14. – С. 45–51.
- Protein quality control: chaperones culling corrupt conformations. / A.J. McClellan, S. Tam, D. Kaganovich, J. Frydman // Nat. Cell. Biol., 2005. – №7. – С. 736–741.
- Molecular genetics of bladder cancer: Emerging mechanisms of tumor initiation and progression / D.J. McConkey, S. Lee, W. Choi et al. // Urol Oncol., 2010. – №28. – С. 429 – 440.
- Parsell D. A. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins / D.A. Parsell, S. Lindquist // Ann. Rev. Genet., 1993. – №27. – С. 437–496.
- Pockley A.G. The dual immunoregulatory roles of stress proteins / A.G. Pockley, M. Muthana, S.K. Calderwood // Trends Biochem. Sci., 2008. – №33. – С. 71–79.
- Taipale M. HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights / M. Taipale, D. Jarosz, S. Lindquist // Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 2010. – №11. – С. 515–528.

Reference (Scopus):

- Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976;72(1):248-254.
- Calderwood, S. K. & Ciocca, D. R. Heat shock proteins: stress proteins with Janus-like properties in cancer. Int. J. Hyperthermia 24, 31–39 (2008).
- Calderwood, S. K., Khaleque, M. A., Sawyer, D. B. & Ciocca, D. R. Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis. Trends Biochem. Sci. 31, 164–172 (2006).

4. Cappello F, Conway de Macario E, Marasa L, Zummo G, Macario AJL (2008) Hsp60 expression, new locations, functions and perspectives for cancer diagnosis and therapy. *Cancer Biol Ther* 7: 801–809.
5. Ciocca DR, Calderwood SK. Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress Chaperones* 2005;10:86–103.
6. Doyle, S. M. et al. Asymmetric deceleration of ClpB or Hsp104 ATPase activity unleashes protein-remodeling activity. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14, 114–122 (2007).
7. Ge H, Yan Y, Guo L, Tian F, Wu D. Prognostic role of HSPs in human gastrointestinal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Onco Targets Ther.* 2018;11:351–359. Published 2018 Jan 15. doi:10.2147/OTT.S155816
8. Gershenson A, Gierasch LM. Protein folding in the cell: challenges and progress. *Curr Opin Struct Biol.* 2010;21(1):32–41.
9. Harada, M., Kimura, G. & Nomoto, K. Heat shock proteins and the antitumor T cell response. *Biotherapy* 10, 229–235 (1998).
10. Hartl, F. U. & Hayer-Hartl, M. Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 574–581 (2009)
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. Kaufmann, S. H. Heat shock proteins and the immune response. *Immunol. Today* 11, 129–136 (1990).
13. Lee G.J., Vierling E. A small heat shock protein cooperates with heat shock protein 70 systems to reactivate a heat-denatured protein. *Plant Physiol.* 2002;122:189–197. doi: 10.1104/pp.122.1.189.

14. Li, Z., Menoret, A. & Srivastava, P. Roles of heatshock proteins in antigen presentation and cross-presentation. *Curr. Opin. Immunol.* 14, 45–51 (2002).
15. McClellan, A. J., Tam, S., Kaganovich, D. & Frydman, J. Protein quality control: chaperones culling corrupt conformations. *Nat. Cell. Biol.* 7, 736–741 (2005)
16. McConkey DJ, Lee S, Choi W, et al. Molecular genetics of bladder cancer: Emerging mechanisms of tumor initiation and progression. *Urol Oncol* 2010;28:429–40.
17. Parsell, D. A. & Lindquist, S. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Ann. Rev. Genet.* 27, 437–496 (1993)
18. Pockley AG, Muthana M, Calderwood SK (2008) The dual immunoregulatory roles of stress proteins. *Trends Biochem Sci* 33: 71–79.
19. Taipale, M., Jarosz, D. F. & Lindquist, S. HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 515–528 (2010)

Надійшла до редколегії 01.02.2019
Отримано виправлений варіант 01.03.2019
Підписано до друку 01.03.2019

Received in the editorial 01.02.2019
Received a revised version on 01.03.2019
Signed in the press on 01.03.2019

В. Дмитрик, асп., А. Савчук, д-р биол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна,
Ю. Зинькова, студ.
ООО "Фармацевтический завод "Биофарма", Киев, Украина

СОДЕРЖАНИЕ БЕЛКОВ ТЕПЛООВОГО ШОКА HSP60 И HSP70 В ТКАНЯХ ОПУХОЛЕЙ БОЛЬНЫХ НА РАК МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ

Рак мочевого пузыря (РМП) остается заболеванием с высоким показателем смертности. РМП является 9-м по частоте онкологическим заболеванием в мире. Согласно данным статистики, наибольшее количество больных РМП пациентов находятся в развитых странах. Около 75 % больных – мужчины. Различные молекулы были идентифицированы в качестве потенциальных прогностических индикаторов и/или мишеней для данного заболевания. Однако поиск мишеней для лечения и предупреждения РМП остается актуальным. В последнее время проводятся исследования участия белков теплового шока (БТШ) при злокачественных новообразованиях, в которых связывают высокую экспрессию БТШ с защитой трансформированных клеток и блокировкой апоптоза. Данные о чрезмерной экспрессии БТШ были опубликованы о ряде онкологических заболеваний, среди которых рак молочной железы, шейки матки, толстой кишки, легких и простаты. Последние исследования тесно связывают уровень экспрессии БТШ с последующим прогнозом болезни. Цель работы – выявить динамику содержания БТШ HSP70 и HSP60 в опухолях и стенках здорового пузыря у больных на РМП в зависимости от стадии заболевания согласно TNM классификации, а также в зависимости от степени клеточной дифференциации. В ходе нашего исследования было установлено увеличение содержания БТШ в гомогенатах опухолей в сравнении с образцами здоровых стенок мочевого пузыря, то есть увеличенное содержание БТШ может быть ассоциировано с развитием РМП. Отмечено увеличение содержания БТШ семьи HSP60 и HSP70 в зависимости от стадии РМП, а также от степени дифференциации клеток. Высокий уровень экспрессии БТШ может обеспечивать правильный фолдинг и мембранный транспорт продуктов онкогенов и противонкогенов. С другой стороны, высокий биосинтез БТШ может регулировать процесс деградации белков и быстро нормализовать белковый метаболизм в онкоклетках, обеспечивая быстрый рост злокачественных опухолей.

Ключевые слова: рак мочевого пузыря, белки теплового шока, шапероны, иммуноферментный анализ.

V. Dmytryk, Ph. D., O. Savchuck, Dr. Sci.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine
Y. Zinkova, stud.
"Biopharma" Limited, Kyiv, Ukraine

CONTENTS OF HSP60 AND HSP70 IN TUMOR TISSUES OF PATIENTS WITH BLADDER CANCER

Bladder cancer (BC) continues to be a disease with a high mortality rate. BC is the 9th most frequently diagnosed cancer in the world. According to statistics, the largest number of patients with BC patients in developed countries. About 75 % of patients are men. Various molecules have been identified as potential prognostic indicators and/or targets for a given disease. However, the search for targets for the treatment and prevention of BC remains relevant. Recently, studies have been conducted on the participation of heat shock proteins (HSPs) in malignant neoplasms. In which high expression of HSPs is associated with the protection of transformed cells and the blocking of apoptosis. Data on overexpression of HSPs have been published for a number of oncological diseases, including breast, cervical, colon, lung and prostate cancers. Recent studies have closely linked the level of HSPs expression with the subsequent prognosis of the disease. The aim of the work was to identify the dynamics of HSP70 and HSP60 in tumors and walls of a healthy bladder in BC patients, depending on the stage of cancer with the TNM classification, and also on the degree of cell differentiation. In our study, an increase in HSPs content in homogenates of tumors was found in comparison with samples of healthy bladder walls, that is, an increase in HSPs content may be associated with BC. An increase in the content HSP60 and HSP70 was noted, depending on the BC stage, as well as on the degree of cell differentiation. A high level of HSP expression can ensure the correct folding and membrane transport of products of oncogenes and anti-oncogenes. On the other hand, high synthesis of HSPs can regulate the process of protein degradation and quickly normalize protein metabolism in cancer cells, ensuring the rapid growth of malignant tumors.

Keywords: bladder cancer, heat shock proteins, chaperones, ELISA.

УДК 582.28

Т. Кондратюк, канд. біол. наук, Т. Акуленко, інж., Є. Торгалло, канд. біол. наук,
Т. Берегова, д-р біол. наук, Л. Остапченко, д-р біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

ЗАЛЕЖНІСТЬ НАКОПИЧЕННЯ БІОМАСИ ПРОДУЦЕНТОМ МЕЛАНІНУ *PSEDONADSONIELLA BRUNNEA* (MERIPILACEAE, AGARICOMYCOTINA) ВІД СКЛАДУ КУЛЬТУРАЛЬНОГО СЕРЕДОВИЩА

Метою роботи було встановлення залежності накопичення біомаси продуцентом меланіну *Pseudonadsoniella brunnea* від складу культурального середовища. У дослідженнях використовували 14 різних культуральних середовищ: стандартні рідкі живильні середовища (Malt extract broth (MEB), Сабу́ро, картопляно-глюкозний бульо́н), а також оригінальні (модифіковані) живильні середовища, основою яких слугували МЕБ, ячмінно-солодовий екстракт та Nutrient Broth. До складу модифікованих середовищ вводили різні складові, зокрема 0,9 % NaCl, моноцукри (D-глюкозу, фруктозу, D(+)-ксилозу), дисахариди (сахарозу, D(+)-мальтозу, D-лактозу) тощо. Культивування *Ps. brunnea* здійснювали за рН 3-4, температури $+24 \pm 2^\circ \text{C}$ упродовж 28 діб. Аналіз результатів проведених досліджень свідчить, що для накопичення біомаси продуцентом меланіну *Pseudonadsoniella brunnea* найоптимальнішими є рідкі живильні середовища МЕБ, Сабу́ро, ячмінно-солодовий екстракт (ЯСЕ) з додаванням до ЯСЕ пептону ферментативного (1 %), дріжджового екстракту (0,5 %) та суміш вказаних середовищ у різних співвідношеннях.

Ключові слова: меланін, чорні дріжджоподібні гриби, біомаса.

Вступ. Вектор розвитку сучасної біотехнології спрямований на використання потенціалу різних мікроорганізмів для отримання біологічно активних сполук (БАС). Мікроорганізми, які розвиваються за умов дії екстремальних факторів довкілля, визнані потужним джерелом синтезу метаболітів із широким спектром протимікробної, антифунгальної, протипухлинної та ін. властивостей, є об'єктами фармацевтичної індустрії, застосовуються в медицині, різнопланових біотехнологічних процесах тощо [1–3]. Окремим аспектом використання мікроорганізмів-продуцентів БАС постає їх здатність до синтезу та накопичення різноманітних пігментів, зокрема меланіну. Меланіни утворюють своєрідну групу пігментів, що синтезуються в живих організмах – як у про-, так і у еукаріотів. Відомо, що меланінам притаманний широкий спектр біологічної дії: антиоксидантний, цитопротекторний, фото- і радіопротекторний тощо, вони можуть використовуватися як сорбенти низки радіонуклідів та важких металів. З використанням сучасних методів молекулярно-генетичних досліджень описано значне видове різноманіття мікроскопічних темнопігментованих грибів, ізольованих з екстремальних місцевостей. Чорні дріжджоподібні гриби (ЧДГ), які здатні синтезувати меланін, посідають особливе місце серед мікроскопічних грибів, перспективних щодо використання в медицині [4–7]. Дані сучасних досліджень не тільки розширюють уявлення щодо багатofункціональності меланінів у екстремофілних грибів, але можуть також використовуватися в ефективних стратегіях використання їх властивостей для створення нового класу біологічно активних високотехнологічних матеріалів, протигрибкових препаратів тощо [7 – 14].

У попередніх дослідженнях нами було з'ясовано культурально-морфологічні, фізіолого-біохімічні та генетичні особливості штаму антарктичних чорних дріжджоподібних грибів *Pseudonadsoniella brunnea* Т.О. Kondratyuk et S.Y. Kondr., які здатні синтезувати та екскретувати у культуральне середовище меланін, який являє собою природний біополімер поліфенолкарбоновий комплекс. Отримані нами дані молекулярно-генетичних досліджень депозитовано у Всесвітньому Генетичному банку (№ KT456204) [15, 16]. Багаторічні дослідження, проведені щодо властивостей меланіну, продуцентом якого є *Ps. brunnea*, показали, що меланін проявляє цитопротекторну, стрес-протекторну, антибактеріальну, антифунгальну, антиоксидантну, дерматотропну, протипухлинну дію тощо. Це дозволяє розглядати його як перспективну субстанцію для ряду лікарських препаратів з численними позитивними властивостями [17, 18].

Як ми показали, ріст культури ЧДГ *Pseudonadsoniella brunnea* за рН 5-6 на стандартних щільних живильних середовищах (сусло-агар (МЕА), картопляно-глюкозний агар, агар Чапека–Докса) дуже обмежений (накопичення біомаси практично відсутнє), що ускладнює зберігання вказаних дріжджів у колекції та використання їхньої біомаси в процесі виробництва меланіну. Найсприятливішими середовищами для розвитку *Ps. brunnea* було визнано напіврідкі та рідкі культуральні середовища [15]. З урахуванням властивостей меланіну, що продукується чорними дріжджоподібними грибами *Ps. brunnea*, проведення подальших досліджень у напрямі з'ясування оптимальних умов культивування вказаного продуценту меланіну, актуальне та перспективне.

Метою роботи було встановлення залежності накопичення біомаси продуцентом меланіну *Pseudonadsoniella brunnea* від складу культурального середовища.

Матеріали та методи. Матеріалом для досліджень слугувала чиста культура антарктичних ЧДГ *Pseudonadsoniella brunnea* 470 FCKU (продуцент меланіну), що зберігається в Колекції мікроскопічних грибів ННЦ "Інститут біології та медицини" Київського національного університету імені Тараса Шевченка (міжнародний акронім колекції FCKU), реєстраційний номер *Ps. brunnea* у Депозитарії Державного науково-контрольного Інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів № 607 [19].

Для досліджень в роботі використовували 14 різних культуральних середовищ: як стандартні рідкі живильні середовища (Malt extract broth (MEB), рідке середовище Сабу́ро, картопляно-глюкозний бульо́н (PDB) виробництва "Фармактив", Україна; Merck KGaA, Німеччина; HiMedia Laboratories, Індія, Conda, Іспанія), так і оригінальні (модифіковані) живильні середовища основою яких слугували МЕБ, ячмінно-солодовий екстракт (ЯСЕ №3 виробництва "Крохмалепродукти України") та Nutrient Broth (NB) виробництва Biolife, Італія. Для приготування модифікованого середовища МЕБ (Conda, Іспанія) використовували його подвійну концентрацію (38 г/л) та 0,9 %-й розчин NaCl (MEB та NaCl брали у співвідношенні 1:1). У середовище із ЯСЕ (6,2 % за ареометром) додавали пептон ферментативний (1 %) та дріжджовий екстракт (0,5 %) (виробництва "Фармактив", Україна та HiMedia Laboratories, Індія, відповідно). З урахуванням складу Nutrient Broth (0,3 % м'ясний екстракт, 0,5 % пептону) в культуральне середовище додатково вносили 0,5 % дріжджового екстракту та додавали різні вуглеводні в концентрації 2 %: моноцукри –

D-глюкозу, фруктозу, D(+)-ксилозу та дисахариди – D(+)-мальтозу, D-лактозу (виробництва "Фармактив", Україна). З урахуванням раніше отриманих результатів щодо культурально-морфологічних особливостей *Ps. brunnea* [15] використовували також рідке оригінальне глюкозо-пептонно-дріжджове середовище (O-GPY), яке поєднувало у своєму складі Nutrient Broth, ЯСЕ, глюкозо-пептонно-дріжджове середовище (із вмістом 10 % глюкози, 1 % пептону, 1 % дріжджового екстракту) і середовище Сабуро (1:1:1:1), а також пептонну воду із сахарозою (3 %) та пептонну воду з глюкозою (2 %).

Ураховуючи здатність *Ps. brunnea* рости за низьких значень кислотності, регулювання pH культуральних середовищ здійснюється додаванням 1М соляної кислоти або стерильної 80 %-ї молочної кислоти. Культивування *Ps. brunnea* здійснювали за pH 3-4, температури +24±2 °C упродовж 28 діб. Біомасу *Ps. brunnea* від культурального середовища відділяли центрифугуванням (2800 об/хв.) упродовж 15 хв (Centrifuge CM-6M, ELMi).

Статистичну обробку результатів проводили за загальноприйнятими методами варіаційної статистики. Отримані результати перевіряли на нормальність за

допомогою W теста Шапіро-Уїлка. Так як одержані результати виявились нормально розподіленими, порівняння різниці між контрольними та дослідними варіантами проводили за допомогою Anova-аналізу для незалежних вибірок, рівень значущості $p < 0,05$. Отримані дані представлені у вигляді середнього значення (M) і стандартного відхилення (SD).

Результати та їх обговорення. Аналіз отриманих результатів щодо визначення оптимального складу культурального середовища з метою отримання біомаси продуценту меланіну *Ps. brunnea* свідчить, що найоптимальнішими середовищами для накопичення біомаси *Ps. brunnea* є рідкі середовища Сабуро; МЕВ; ячмінно-солодовий екстракт (ЯСЕ); оригінальне глюкозо-пептонно-дріжджове середовище (O-GPY); ячмінно-солодовий екстракт із додаванням пептону ферментативного та дріжджового екстракту (ЯСЕ+P+Y) (табл.). На вказаних середовищах за pH 3-4 констатували приріст біомаси *Ps. brunnea* від 2,45 до 2,69 г/л. Найменший приріст біомаси (0,47-0,65 г/л) *Ps. brunnea* спостерігали на живильних середовищах Nutrient Broth з дисахаридами мальтозою та лактозою.

Таблиця. Накопичення біомаси *Pseudonadsoniella brunnea* на різних живильних середовищах, M±SD

Назва культурального середовища	Показники біомаси <i>Ps. brunnea</i> , г/л			
	початкові	після 28 діб культивування	початкові	після 28 діб культивування
	pH=3		pH=4	
Сабуро	19,27 ± 0,14	21,72 ± 0,11*	20,17 ± 0,10	22,67 ± 0,14*
МЕВ	19,95 ± 0,21	22,47 ± 0,38*	20,62 ± 0,12	23,13 ± 0,35*
2МЕВ+NaCl	20,42 ± 0,09	22,51 ± 0,35*	21,38 ± 0,14	23,53 ± 0,24*
ЯСЕ	21,47 ± 0,16	23,84 ± 0,32*	19,64 ± 0,17	22,04 ± 0,38*
ЯСЕ+P+Y	18,76 ± 0,10	21,36 ± 0,24*	19,4 ± 0,12	22,0 ± 0,36*
O-GPY	20,33 ± 0,12	22,96 ± 0,32*	21,02 ± 0,12	23,71 ± 0,26*
PDB	19,64 ± 0,17	21,35 ± 0,15*	18,58 ± 0,17	20,22 ± 0,31*
NB+Y + глюкоза	18,73 ± 0,14	20,67 ± 0,37*	18,72 ± 0,44	20,5 ± 0,29*
NB+Y + фруктоза	19,04 ± 0,27	21,04 ± 0,13*	18,62 ± 0,11	20,67 ± 0,73*
NB+Y + ксилоза	20,78 ± 0,14	22,49 ± 0,33*	20,79 ± 0,19	22,4 ± 0,43*
NB+Y + мальтоза	21,93 ± 0,09	22,43 ± 0,08*	20,71 ± 0,11	21,17 ± 0,18*
NB+Y + лактоза	20,04 ± 0,08	20,69 ± 0,16*	20,22 ± 0,16	20,87 ± 0,25*
Пептонна вода +сахароза	21,38 ± 0,10	23,11 ± 0,33*	22,02 ± 0,07	23,73 ± 0,19*
Пептонна вода +глюкоза	19,69 ± 0,08	21,49 ± 0,41*	20,98 ± 0,10	22,8 ± 0,25*

Примітка: ± – стандартна похибка середнього; МЕВ – Malt extract broth; 2МЕВ+NaCl – МЕВ у подвійній концентрації (38 г/л) + 0,9 %-й розчин NaCl у співвідношенні 1:1; ЯСЕ – ячмінно-солодовий екстракт; ЯСЕ+P+Y – ячмінно-солодовий екстракт + пептон ферментативний (1 %) + дріжджовий екстракт (0,5 %); O-GPY – оригінальне глюкозо-пептонно-дріжджове середовище: Nutrient Broth + ЯСЕ + глюкозо-пептонно-дріжджове середовище (із вмістом глюкози 10 %, пептону 1 %, дріжджового екстракту 1 %) + середовище Сабуро у співвідношенні 1:1:1:1; PDB – картопляно-глюкозний бульон (potato-dextrose broth); NB+Y+вуглеводні (глюкоза, фруктоза, ксилоза, мальтоза, лактоза) – Nutrient Broth з додаванням 0,5 % дріжджового екстракту та вуглеводнів (2 %);

Необхідно зазначити, що застосовані нами в проведених дослідженнях ячмінно-солодовий екстракт (ЯСЕ) та МЕВ (основною складовою якого є також солодовий екстракт) містять вуглець, білок і поживні речовини, необхідні для виділення і вирощування дріжджів і плісневих грибів. МЕВ характеризується вмістом високої концентрації вуглеводнів. Приблизний відсоток редуруючих цукрів в екстракті солоду становить 60 – 63 % [20]. Згідно з ТУУ 15.8–32671885-001:2011 та відповідних публікацій [21, 22] у солоді міститься широкий набір інгредієнтів – білки, незамінні амінокислоти (лізин, лейцин, ізолейцин, тирозин, триптофан, фенілаланін, валін, метіонін, треонін), вуглеводи (декстрини, сахароза, мальтоза, глюкоза, фруктоза, ксилоза), інші низькомолекулярні продукти гідролізу крохмалю, клітковина, мінеральні речовини, вітаміни (аскорбінова кислота, тіамін, рибофлавін, пантотенова кислота, піридоксин, ніацин, біотин), поліфенольні сполуки, рослинні ферменти і гормони. Ячмінний і вівсяний солод посідають чільне місце серед солодів злакових культур за вмістом макро-

і мікроелементів. Ячмінно-солодовий екстракт характеризується високим вмістом мікроелементів (Ca, K, Fe, Zn, P, Mg), вітамінів групи В. За умов додавання до ЯСЕ пептону (1 %) та дріжджового екстракту (0,5 %) накопичення біомаси *Ps. brunnea* збільшується на 7,9 % порівняно із ЯСЕ. Використання багатокомпонентного культурального середовища (варіант оригінального глюкозо-пептонно-дріжджового середовища – O-GPY) з метою отримання біомаси *Ps. brunnea* визнано нами оптимальним та найдоцільнішим, оскільки поєднує в собі різноманітні складові та призводить до отримання максимального значення накопичення біомаси продуцентом меланіну (таблиця). Оптимальними для росту та накопичення біомаси *Ps. brunnea* є живильні середовища із pH 4.

З урахуванням складу використаних у даному дослідженні варіантів культуральних середовищ та результатів щодо накопичення біомаси продуцентом меланіну *Ps. brunnea* оптимальними нами визнані багаті на поживні речовини живильні середовища, які містять солодовий екстракт (ЯСЕ) із додаванням 2,5-3 % глюкози,

гідролізату казеїну (0,5 %, середовище Сабуру), 0,07 % м'ясного екстракту (Nutrient Broth у складі оригінального глюкозо-пептонно-дріжджового середовища О-ГРУ), 1 % пептону, 0,5 % дріжджового екстракту.

Проведення подальших досліджень в напрямку розширення пошуку різних живильних середовищ для оптимізації росту та накопичення біомаси продуцентом меланіну *Ps. brunnea* є актуальними та перспективними.

Висновки. Аналіз результатів проведених досліджень свідчить, що для накопичення біомаси продуцентом меланіну *Pseudonadsoniella brunnea* найпридатливішими є рідкі живильні середовища МЕН, Сабуру, ячмінно-солодовий екстракт (ЯСЕ) з додаванням до ЯСЕ пептону ферментативного (1 %), дріжджового екстракту (0,5 %) та суміш вказаних середовищ у різних співвідношеннях.

Список використаних джерел:

1. Anitori R. P. Extremophiles: Microbiology and Biotechnology / R. P. Anitori, 2012. – 300 p.
2. Kostadinova N. Isolation and Identification of Filamentous Fungi from Island Livingston, Antarctica / N. Kostadinova, E. Krumova, S. Tosi // Biotechnology and Biotechnological Equipment, Special Issue: XI Anniversary sci. conf., 2009. – Vol. 23, Supplement 1. – P. 267-270.
3. Svahn S.K. *Penicillium nalgiovense* Laxa isolated from Antarctica is a new source of the antifungal metabolite amphotericin B / S.K. Svahn, B. Olsen, L. Bohlin // Fungal Biology and Biotechnology, 2015. – 1. – P. 2-11.
4. Eisenman H.C. Synthesis and assembly of fungal melanin / H.C. Eisenman, A. Casadevall // Appl. Microbiol. Biotechnol., 2012. – 93(3). – P. 931-940.
5. The influence of melanin isolated from Antarctic yeasts on cortisol blood level of rats in conditions of stress action / T.M. Falalyeyeva, O.I. Tsyryuk, N.V. Chyzyhanska, V.P. Zharova // Ukr. Antarctic J., 2009. – 8. – 391-394.
6. Plonka P. Melanin synthesis in microorganisms – Biotechnological and medical aspects / P. Plonka, M. Grabacka // Acta biochimica Polonica, 2006. – 53(3). – P. 429-443.
7. Belozerskaya T.A. Melanin Pigments of Fungi / T.A. Belozerskaya, N.N. Gessler, A.A. Aver'yanov. – In book: Fungal Metabolites, 2018. – P. 263-291. DOI: 10.1007/978-3-319-19456-1_29-1.
8. Chyzyhanska N. Effect of melanin isolated from Antarctic yeasts on preservation of pig livestock after ablation / N. Chyzyhanska, T. Beregova // Ukr. Antarctic J., 2009. – 8. – P. 382-385.
9. Thermal stress responses in Antarctic yeast, *Glaciozyma Antarctica* P12, characterized by real-time quantitative PCR / S.Y. Boo, C.M.V.L. Wong, K.F. Rodrigues et al. // Polar Biol., 2013. – 36. – P. 381-389.
10. Influence of abiotic variables on culturable yeast diversity in two distinct Alpine glaciers / B. Turchetti, M. Goretti, E. Branda et al. // FEMS Microbiol. Ecol., 2013. Vol. – 86 (2). – P. 327-340.
11. Endolithic microbial habitats as refuges for life in polyextreme environment of the Atacama Desert / Jacek Wierzechos, M. Cristina Casero, Octavio Artieda and Carmen Ascaso // Current Opinion in Microbiology, 2018. – Vol. 43. – P. 124-131. – 10.1016/j.mib.2018.01.003.
12. Fungal diversity in the Atacama Desert / Iara F. Santiago, Vivian N. Gonçalves, Benito Gómez-Silva et al. // Antonie van Leeuwenhoek, 2018. – Vol. 111, N 8. – P. 1345-1360. – 10.1007/s10482-018-1060-6.
13. Raman microspectrometric study of pigments in melanized fungi from the hyperarid Atacama desert gypsum crust / Adam Culka, Jan Jehlička, Carmen Ascaso et al. // Journal of Raman Spectroscopy, 2017. – Vol. 48, N 11. – P. 1487-1493.
14. Taxonomy, phylogeny and ecology of cultivable fungi present in seawater gradients across the Northern Antarctica Peninsula / Vivian N. Gonçalves, Gislaine A. Vitoreli, Graciéle C.A. de Menezes et al. // Extremophiles, 2017. – Vol. 21, N 6. – P. 1005.
15. Кондратюк Т.О. Особливості росту темнопігментованого дріжджоподібного гриба *Pseudonadsoniella brunnea* (Meripilaceae, Basidiomycota) на різноманітних живильних середовищах / Т.О. Кондратюк // Укр. бот. журн., 2015. – Т. 72. – № 5. – С. 478-483.
16. *Pseudonadsoniella brunnea* (Meripilaceae, Agaricomycotina), a new brown yeast-like fungus producing melanin from the Antarctic; with notes on nomenclature and type confusion of *Nadsoniella nigra* / T.O. Kondratyuk, S.Y. Kondratyuk, O.O. Morgaienko et al. // Acta Botanica Hungarica, 2015. – 57(3-4). – P. 291-320.
17. Tgfb1, Ptg2 Genes Expression During Dynamics of Wound Healing and with the Treatment of Melanin / A.S. Dranitsina, O.V. Taburets, K.O. Dvorshchenko et al. // Res. J. of Pharmaceutical, Biol. and Chem. Sci. (RJPBCS), 2017 – Vol. 8(1). – P. 2014-2023.
18. Taburets O.V. The Effect of "Melanin-Gel" on the Wound Healing / O.V. Taburets, O.O. Morgaienko, T.O. Kondratyuk et al. // Res. J. of Pharmaceutical, Biol. and Chem. Sci. (RJPBCS), 2016. – 7(3). – P. 2031-2038.

19. Microorganisms, perspective for biotechnology, medicine, environmental technologies, in the collection of microscopic fungi ESC "Institute of biology and medicine", Taras Shevchenko national university of Kyiv / T. Kondratyuk, T. Akulenko, T. Beregova, L. Ostapchenko // Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv. Series : Biology, 2017. – Vol. 73. – P. 22-30. <http://biovestnik.com/index.php/biology/pages/view/indexing>.

20. https://foodsafety.neogen.com/pdf/acumedia_pi/7341_pi.pdf.

21. ТУ У 15.8-32671885-001:2011. Ячмінно-солодовий екстракт ЯСЕ-3.

22. Використання солодових екстрактів у продуктах ко-екструзії / Л.В. Махінко, В.М. Ковбаса, О.В. Герасименко та ін. // наук. пр. Нац. ун-ту харч. технологій, 2004. – № 15. – С. 68-70.

Reference (Scopus):

1. Anitori R.P. Extremophiles: Microbiology and Biotechnology / R.P. Anitori – 2012. – 300 p.
2. N. Kostadinova, E. Krumova S. Tosi Isolation and Identification of Filamentous Fungi from Island Livingston, Antarctica / Biotechnology and Biotechnological Equipment, Special Issue: XI Anniversary scientific conference. – 2009. – V. 23, Supplement 1. – P. 267-270.
3. Svahn S.K., B. Olsen, L. Bohlin *Penicillium nalgiovense* Laxa isolated from Antarctica is a new source of the antifungal metabolite amphotericin B / Fungal Biology and Biotechnology. – 2015. – 1. – P. 2-11.
4. Eisenman H.C. Synthesis and assembly of fungal melanin / H.C. Eisenman, A. Casadevall // Appl Microbiol Biotechnol. – 2012. – 93(3). – P. 931-940.
5. T.M. Falalyeyeva, O.I. Tsyryuk, N.V. Chyzyhanska, V.P. Zharova The influence of melanin isolated from Antarctic yeasts on cortisol blood level of rats in conditions of stress action / Ukr. Antarctic J. – 2009. – 8. – 391-394.
6. Przemyslaw Plonka Maja Grabacka Melanin synthesis in microorganisms – Biotechnological and medical aspects Acta biochimica Polonica 53(3):429-43 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16951740> PMID: 16951740
7. Belozerskaya T., Gessler N. Aver'yanov Andrey A. Melanin Pigments of Fungi In book: Fungal Metabolites 2018 P. 263-291 DOI: 10.1007/978-3-319-19456-1_29-1
8. Chyzyhanska N., Beregova T. Effect of melanin isolated from Antarctic yeasts on preservation of pig livestock after ablation / Effect // Ukr. Antarctic J. – 2009. – 8. – P. 382-385.
9. S.Y. Boo, C.M.V.L. Wong, K.F. Rodrigues, N. Najmudin, A.M.A. Murad, N.M. Mahadi. Thermal stress responses in Antarctic yeast, *Glaciozyma Antarctica* P12, characterized by real-time quantitative PCR / Polar Biol. – 2013. – 36. – P. 381-389.
10. B. Turchetti, M. Goretti, E. Branda, G. Diolaiuti, C. D'Agata, C. Smiraglia, A. Onofri, P. Buzzini Influence of abiotic variables on culturable yeast diversity in two distinct Alpine glaciers / FEMS Microbiol. Ecol. – 2013. Vol. – 86 (2). – P. 327-340.
11. Jacek Wierzechos, M. Cristina Casero, Octavio Artieda and Carmen Ascaso. Endolithic microbial habitats as refuges for life in polyextreme environment of the Atacama Desert, *Current Opinion in Microbiology*, 10.1016/j.mib.2018.01.003, 43, (124-131), (2018).
12. Iara F. Santiago, Vivian N. Gonçalves, Benito Gómez-Silva, Alexandra Galetovic and Luiz H. Rosa, Fungal diversity in the Atacama Desert, *Antonie van Leeuwenhoek*, 10.1007/s10482-018-1060-6, 111, 8, (1345-1360), (2018).
13. Adam Culka, Jan Jehlička, Carmen Ascaso, Octavio Artieda, Cristina M. Casero and Jacek Wierzechos, Raman microspectrometric study of pigments in melanized fungi from the hyperarid Atacama desert gypsum crust, *Journal of Raman Spectroscopy*, 48, 11, (1487-1493), (2017).
14. Vivian N. Gonçalves, Gislaine A. Vitoreli, Graciéle C. A. de Menezes, Carlos R. B. Mendes, Eduardo R. Secchi, Carlos A. Rosa and Luiz H. Rosa, Taxonomy, phylogeny and ecology of cultivable fungi present in seawater gradients across the Northern Antarctica Peninsula, *Extremophiles*, 21, 6, (1005), (2017).
15. Кондратюк Т.О. Особливості росту темнопігментованого дріжджоподібного гриба *Pseudonadsoniella brunnea* (Meripilaceae, Basidiomycota) на різноманітних живильних середовищах / Укр. бот. журн. – 2015. – Т. 72. – № 5. – С. 478-483.
16. T.O. Kondratyuk, S.Y. Kondratyuk, O.O. Morgaienko, M.V. Khimich, T.V. Beregova, L.I. Ostapchenko *Pseudonadsoniella brunnea* (Meripilaceae, Agaricomycotina), a new brown yeast-like fungus producing melanin from the Antarctic; with notes on nomenclature and type confusion of *Nadsoniella nigra* / Acta Botanica Hungarica – 2015. – 57(3-4). – P. 291-320.
17. A.S. Dranitsina, O.V. Taburets, K.O. Dvorshchenko, D.M. Grebinyk, T.V. Beregova, L.I. Ostapchenko. Tgfb1, Ptg2 Genes Expression During Dynamics of Wound Healing and with the Treatment of Melanin / Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences (RJPBCS). – 2017 – 8(1). – P. 2014-2023.
18. O.V. Taburets, O.O. Morgaienko, T.O. Kondratyuk, T.V. Beregova, L.I. Ostapchenko. The Effect of "Melanin-Gel" on the Wound Healing / Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences (RJPBCS). – 2016. – 7(3). – P. 2031-2038.
19. Kondratyuk T., Akulenko T., Beregova T., Ostapchenko L. Microorganisms, perspective for biotechnology, medicine, environmental technologies, in the collection of microscopic fungi ESC "Institute of biology

and medicine", Taras Shevchenko national university of Kyiv. // *Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv. Series: Biology*. 2017. 73. P. 22-30. <http://birovestnik.com/index.php/biology/pages/view/indexing>

20. https://foodsafety.neogen.com/pdf/acumedia_pi7341_pi.pdf

21. ТУ У 15.8-32671885-001:2011. Ячмінно-солодовий екстракт ЯСЕ-3

22. Л.В. Махінко, В.М. Ковбаса, О.В. Герасименко, Н.О. Ємельянова, Є.І. Ковалевська, В.А. Піддубний Використання солодових екст-

рактів у продуктах ко-екструзії / *Наук. пр. Нац. ун-ту харч. технологій*. – 2004. – № 15. – С. 68-70.

Надійшла до редколегії 05.02.2019

Отримано виправлений варіант 05.03.2019

Підписано до друку 05.03.2019

Received in the editorial 05.02.2019

Received a revised version on 05.03.2019

Signed in the press on 05.03.2019

Т. Кондратюк, канд. биол. наук, Т. Акуленко, инж., Е. Торгалло, канд. биол. наук,
Т. Береговая, д-р биол. наук, Л. Остапченко, д-р биол. наук
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

ЗАВИСИМОСТЬ НАКОПЛЕНИЯ БИОМАССЫ ПРОДУЦЕНТОМ МЕЛАНИНА PSEDONADSONIELLA BRUNNEA (MERIPILACEAE, AGARICOMYCOTINA) ОТ СОСТАВА КУЛЬТУРАЛЬНОЙ СРЕДЫ

Целью работы было установление зависимости накопления биомассы продуцентом меланина *Pseudonadsoniella brunnea* от состава культуральной среды. В исследованиях использовали 14 разных культуральных сред: стандартные жидкие среды (Malt extract broth (МЭБ), Сабуро, картофельно-глюкозный бульон), а также оригинальные (модифицированные) питательные среды, основой которых служили МЭБ, ячменно-солодовый экстракт и Nutrient Broth. В состав модифицированных сред вводили разные составляющие, в частности 0,9 % NaCl, моносахариды (D-глюкозу, фруктозу, D(+)-ксилозу), дисахариды (сахарозу, D(+)-мальтозу, D-лактозу) и др. Культивирование *Ps. brunnea* осуществляли при pH 3-4, температуре +24±2 °C в течение 28 суток. Анализ результатов проведенных исследований свидетельствует о том, что для накопления биомассы продуцентом меланина *Pseudonadsoniella brunnea* самыми оптимальными являются жидкие питательные среды МЭБ, Сабуро, ячменно-солодовый экстракт (ЯСЕ) с дополнительным внесением в ЯСЕ пептона ферментативного (1 %), дрожжевого экстракта (0,5 %) и смесь указанных сред в различных соотношениях.

Ключевые слова: меланин, черные дрожжеподобные грибы, биомасса.

T. Kondratiuk, Ph. D., T. Akulenko, eng., Ie. Torgalo, Ph. D.,
T. Beregovaya, Dr. Sci., L. Ostapchenko, Dr. Sci.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

DEPENDENCE OF BIOMASS ACCUMULATION BY MELANIN PRODUCER PSEDONADSONIELLA BRUNNEA (MERIPILACEAE, AGARICOMYCOTINA) OF THE CULTURAL MEDIUM content

Dependence of biomass accumulation by melanin producer *Pseudonadsoniella brunnea* (Merepilaceae, Agaricomycotina) of the cultural medium content was aim of this study. The following 14 different types of cultural media were used: standard liquid nutrient media (Malt extract broth – МЭБ), Sabouraud Broth, potato-dextrose Broth, as well as the original (modified) nutritional media, based on Malt extract Broth, barley malt extract and Nutrient Broth. Various components were used for the modified media, in particular 0.9 % NaCl, monosaccharides (D-glucose, fructose, D (+) – xylose), disaccharides (sucrose, D (+) – maltose, D-lactose), and others. Cultivation of *Ps. brunnea* was carried out at pH 3-4, temperature + 24 ± 2 °C for 28 days. The analysis of the results obtained shows that the following media: the liquid nutrient media of МЭБ, Sabouraud Broth, and barley malt extract with the addition of enzymatic peptone (1 %), yeast extract (0.5 %) and a mixture of these media in different proportions found to be the most optimal media for the accumulation of biomass of melanin producer *Pseudonadsoniella brunnea*.

Keywords: melanin, black yeast-like fungi, biomass.

УДК 577.122:616-092.9-099:547.45:613.64

А. Безродна^{1,2}, асист., І. Вишницька¹, канд. биол. наук,
С. Стеценко¹, канд. биол. наук

Харківський національний медичний університет, Харків, Україна¹,
Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, Харків, Україна²,
Е. Ходош, канд. мед. наук
Харківська медична академія післядипломної освіти, Харків, Україна

ВИВЧЕННЯ ПОКАЗНИКІВ ОБМІНУ БІЛКІВ В ОРГАНІЗМІ ЩУРІВ ПІД ВПЛИВОМ ІНГАЛЯЦІЙНОЇ ІНТОКСИКАЦІЇ "ВЕЙПОМ" ЕЛЕКТРОННИХ СИГАРЕТ

Виробники електронних сигарет стверджують, що їхня продукція не завдає шкоди людському організму й є відмінним способом, щоб позбавитися шкідливої звички – табакокуріння. Проте учені довели зворотнє: вейпування веде до передозувань ніотином, а клуби пари електронних сигарет містять токсичні канцерогенні з'єднання (формальдегід, ацетальдегід, ацетон, акролеїн), які отруюють людину. Окрім того, в процесі випаровування рідини складові частини електронного пристрою виділяють у вигляді пари такі важкі метали, як мідь, хром, свинець, нікель і олово, які, потрапляючи в людський організм, призводять до незворотних змін в органах і тканинах на клітинному рівні. Мета досліджень – вивчення впливу інгаляційної інтоксикації "вейпом" електронних сигарет на обмін білків в організмі щурів у підгострому експерименті шляхом визначення вмісту в сироватці крові загального білку, альбуміну і продуктів азотистого обміну – креатиніну та сечовини. Установлено, що за результатами підгострого експерименту внаслідок інгаляційної заправки електронними сигаретами протягом 45 діб в організмі щурів помічено зниження рівня загального білку сироватки крові в піддослідних тварин на 18,74 %, альбуміну – на 35,25 %, а також підвищення вмісту креатиніну в сироватці крові на 89,88 % і сечовини на 30,23 %. Результати біохімічних досліджень свідчать, що внаслідок інгаляційної заправки електронними сигаретами в організмі щурів спостерігається гіпопротеїнемія за рахунок гіпоальбумінемії, що свідчить про порушення білоксинтезуючої функції печінки. А гіперкреатинінемія і тенденція до уремії можуть свідчити про порушення екскреторної функції нирок. Результати клінічного спостереження щодо використання пацієнтом "вейпу" констатують у хворого діагноз екзогенний алергічний (токсичний) альвеоліт, зумовлений вейпінгом, гострий перебіг.

Ключові слова: електронні сигарети, токсифікація, організм щурів, показники обміну білків.

Вступ. Виробники електронних сигарет стверджують, що їх продукція не несе шкоди людському організму і являється відмінним способом позбавитися від

шкідливої звички – табакокуріння [1]. Проте ученими доведено зворотнє: безмежне вейпування веде до передозувань ніотином, а клуби пари електронних сига-

рет містять токсичні канцерогенні з'єднання (формальдегід, ацетальдегід, ацетон, акролеїн), які отруюють людину [2]. Крім того, в процесі випару рідини складові частини електронного пристрою виділяють в пар такі важкі метали, як мідь, хром, свинець, нікель і олово, які, потрапляючи в людський організм, призводять до безповоротних змін в органах і тканинах на клітинному рівні. Істотним недоліком використання пристроїв для куріння електронних сигарет є випадки раптових вибухів, внаслідок чого є летальні наслідки [3].

У науковій літературі поширюються припущення, що однією з головних проблем збільшеної популярності електронних сигарет є використання їх для вживання наркотичних засобів і психотропних речовин, а також нестримно зростаюча пропозиція цієї продукції, реклама і відсутність правового регулювання її виробництва і споживання [4, 5].

Доведено, що використання електронних систем доставки нікотину пов'язане з ризиком виникнення ускладнень, в першу чергу, з боку респіраторного тракту, і, що вони не мають ніяких переваг перед класичними засобами нікотинзаміщуючої терапії. В той же час, використання електронних сигарет пов'язане з небезпекою не лише для користувача, але і для людей, що оточують його, що додатково обмежує застосування їх як терапевтичний засіб, а вплив на здоров'я курців такої складової цих сигарет, як пропіленгліколь, при тривалій інгаляції викликає особливе занепокоєння [6].

Визначено, що пропіленгліколь не тільки може дратувати слизову оболонку дихальних шляхів і очей, викликати сухість порожнини рота і глотки але й викликати порушення мембран гепатоцитів, білкового та вуглеводного обміну та їх регуляції тощо [7, 8]. Хімічний склад картриджів і рідин для вейпів викликає сумніви у безпеці кінцевого аерозолі. У останніх публікаціях, що висвітлюють розподіл часток за розміром у аерозолі, показано, що аерозоль містить частки, здатні досягати альвеол, проникати в кровотік і шкідливо впливати на організм [9].

Показано, що паління електронних сигарет змінює профіль природжених захисних білків дихальних шляхів, викликаючи як подібні, так і унікальні патологічні зміни відносно впливу звичайних сигарет. Автори визначили, що у людей, що палили як звичайні, так і електронні сигарети, був різко підвищений рівень білків, пов'язаних з окислювальним стресом, і рівень природжених захисних білків, пов'язаних з хронічною обструктивною хворобою легенів [10]. Доведено, що навіть безнікотинова електронна сигарета, шкідливо впливає на стоматологічний статус за рахунок вмісту в ній пропіленгліколю, який при нагріванні, виділяє ефір, що негативно впливає на слизову оболонку порожнини рота [11].

Фахівці із Сполучених Штатів Америки після дослідження легень курців обох видів сигарет дійшли до висновку, що електронні аналоги ані трохи не менш небезпечні, чим звичайна тютюнова продукція. Фізіолог Мехмет Кесимер, співробітник Університету Північної Кароліни стверджує, що в легенях і дихальних шляхах любителів електронних сигарет є присутньою висока концентрація білків, що свідчать про наявність нейтрофільних гранулоцитів. Так називають специфічний вид лейкоцитів, який захищає організм від грибкової і бактерійної інфекції. У надмірній кількості вони можуть завдати шкоди – спровокувати вовчанку, псоріаз або васкуліт. Навіть в організмах підлітків, які палили безнікотинові електронні сигарети, вдихаючи лише ароматну пару, були виявлені такі речовини, як пропіленгліколь і гліцерол, які при нагріванні можуть утворювати канцерогенні з'єднання [4].

Цілком ґрунтовними є наукові аргументи на користь того, що нікотин від електронних сигарет і ряд речовин в їх аерозолях (формальдегід, акролеїн) здатні викликати пошкодження ДНК і мутагенез. Це важливі відомості, оскільки вони дозволяють припустити, що тривале використання цього продукту може підвищувати для споживача ризик раку [12]. Нове дослідження експертів з Нью-Йоркського університету руйнує стале уявлення про вейп як про практично безпечний для здоров'я пристрій для паління. Учені провели випробування, в якому брали участь миші. Біологи три місяці вивчали дію на мишей пару від електронних сигарет із вмістом нікотину. У результаті у піддослідних виявлено ушкодження ДНК, клітин серця, легенів і сечового міхура [13, 14].

Наводимо результати клінічного спостереження щодо використання пацієнтом "вейпу", яке виконане на базі Харківської медичної академії післядипломної освіти к.м.н., доцентом Е.М. Ходош: хворий М., 27 років, вейпінгом захоплюється протягом останніх 3-х років. Член відповідного клубу, бере участь в змаганнях. За місяць до вступу став відчувати задишку при помірних фізичних навантаженнях (підйом по сходах, ходьба вгору по пологому схилу). З огляду на фактор ризику – "вейпінг", молодий вік, симптом – прогресуюча задишка і типові патерни на КТ ОГК у хворого діагностовано екзогенний алергічний (токсичний) альвеоліт, обумовлений вейпінгом, гострий перебіг. Результати КТ ОГК: дифузне підвищення щільності легеневої тканини, потовщення стінки сегментарних бронхів, багаточисельні мілкоочагові тіні на фоні сітчастої перебудови легеневого малюнка і тотального двостороннього "матового скла". Лікування системними глюкокортикостероїдами протягом 1,5 міс. дали позитивний результат. Хворий виписаний з одужанням. Подальша доля пацієнта невідома.

Мета роботи – вивчення впливу інгаляційної інтоксикації електронними сигаретами організму щурів на біохімічні показники білкового обміну.

Матеріали та методи дослідження. Біохімічні дослідження проведені в процесі підгострого експерименту на протязі 45 діб, в якому використано 20 статевозрілих щурів популяції WAG. Тварини були розділені на 2 групи по 10 тварин у кожній: перша – контроль; друга – дослідна група (піддавалася інгаляційній інтоксикації). Робота з тваринами проводилася згідно з Вимогами "Європейської конвенції про захист хребетних тварин, яких використовують для експериментального та інших наукових цілей" (Страсбург, 1998) та закону України "Про захист тварин від жорстокого ставлення" (№ 3447-IV від 21.02.2006) зі змінами, внесеними до Закону №3447-IV згідно із Законом № +1759-VI від 15.12.2009.

Зазначимо, що принцип цього дослідження заснований на покроковій процедурі. Під час 4-годинного періоду впливу протягом 45-ти діб досягається потрібна доза "вейпа", яка відповідає підгострій інгаляційній токсичності речовин, які входять до складу випаровувань [15]. Протягом експерименту тварини знаходилися в інгаляційних камерах. Температура в експериментальному приміщенні під час утримання тварин підтримувалася на рівні $22 \pm 3^\circ \text{C}$, відносна вологість повітря – у діапазоні від 30 до 70 %. Освітлення було штучним з інтервалом – 12 год світло / 12 год темрява. Під час усього експерименту тварини споживали воду, харчування було стандартним.

Зазначимо, що вплив "вейпу" шляхом "тільки через ніс" є найкращим методом випробування випарів, які можуть конденсуватися з утворенням аерозолів. Кожен день за тваринами в клітці вели спостереження щодо появи змін на шкірі й хутрі, очах і слизових оболонках, а також загального стану та поведінки тварин [15]. Для

вивчення стану обміну білків визначали в сироватці крові вміст загального білка, альбумінів, продуктів азотистого обміну – креатиніну і сечовини.

Вміст загального білка у крові проводили за допомогою біуретової реакції [16]. Принцип методу: білки реагують у лужному середовищі з Купрум сульфатом з утворенням сполук фіолетового кольору. Інтенсивність забарвлення вимірювали на спектрофотометрі PV 1251B при $\lambda=540-560$ нм. у діапазоні 0-1 од., кювета – 10 мм. Концентрацію білка визначали за допомогою калібрувальних кривих, для побудови яких як стандарт використовували ліофілізований альбумін. Достовірність результатів контролювали за допомогою контрольних сироваток "Биоконт С" (Росія).

Вміст альбуміну в сироватці крові визначали за допомогою експрес-наборів ("Sigma", США). Принцип методу базувався на вимірюванні інтенсивності поглинання комплексу альбуміну з бромкрезоловим зеленим на спектрофотометрі PV 1251 B при 628 нм [17]. Вміст альбуміну в сироватці крові визначали спектрофотометрично проти холостої проби. Розраховували за калібрувальною кривою, яку будували за допомогою стандартного розчину бічного сироваткового альбуміну.

Вміст креатиніну у сироватці крові визначали спектрофотометричним методом за допомогою набору реактивів "Філісіт-Діагностика" (Дніпро, Україна). Принцип методу заснований на тому, що пікринова кислота взаємодіє у лужному середовищі із креатиніном з утворенням продукту червоного кольору. Визначали вміст креатиніну в мкмоль/л після депротеїнізування сироватки крові розчином трихлороцтової кислоти [18]. Оптичну щільність

визначали спектрофотометрично на спектрофотометрі PV 1251B при довжині хвилі 500 – 560 нм у діапазоні 0-1,0 од. Довжина оптичного шляху становила 10 мм. Достовірність одержаних результатів контролювали за допомогою контрольних сироваток "Биоконт С" (Росія).

Вміст сечовини в сироватці крові визначали діацетилмонооксимним методом за допомогою набору реактивів "Філісіт-Діагностика" (Дніпро, Україна). Принцип методу заснований на тому, що сечовина утворює з діацетилмонооксимом у присутності іонів заліза (III) та тіосемікарбазиду комплекс червоного кольору, за інтенсивністю забарвлення якого визначали її концентрацію [16]. Оптичну щільність визначали спектрофотометрично на спектрофотометрі PV 1251 B при довжині хвилі 540–560 нм у діапазоні 0-1,0 од. Довжина оптичного шляху становила 10 мм. Достовірність одержаних результатів контролювали за допомогою контрольних сироваток "Биоконт С" (Росія).

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою параметричних методів. Порівняння середніх величин у групах при нормальному розподілі проводилося за допомогою t-критерію Стьюдента. За критичний рівень значущості брався $p \leq 0,05$.

Результати досліджень та їх обговорення. Результати експериментальних досліджень виявили, що інгаляційна інтоксикація "вейпом" впливає на основні біохімічні маркери обміну білків в організмі щурів. Було виявлено зниження загального білку та альбуміну в крові експериментальних щурів за умов підвищення концентрації кінцевих продуктів обміну білків – сечовини і креатиніну (табл. 1).

Таблиця 1. Вплив компонентів електронних сигарет на показники обміну білків організму щурів в умовах тривалої інгаляційної інтоксикації ($M \pm m$, $n=20$)

Показники	Дослідні групи	
	Контроль ($n=10$)	Група спостереження ($n=10$)
Загальний білок (г/л)	74,2 $\pm$ 3,8	60,3 $\pm$ 1,6*
Альбумін (г/л)	43,4 $\pm$ 1,7	28,1 $\pm$ 1,5*
Креатинін (мкмоль/л)	69,2 $\pm$ 4,17	131,4 $\pm$ 2,1*
Сечовина (ммоль/л)	5,16 $\pm$ 0,32	6,72 $\pm$ 1,36

Примітка: * – відмінності достовірні $p < 0,05$.

Під час експерименту спостерігалось зниження рівня загального білка сироватки крові у піддослідних тварин на 18,74 %, що свідчить про пригнічення синтезу білка в організмі тварин. При цьому вміст у загальному білку його найбільшої фракції – альбуміну – також зменшився на 35,25 %, що свідчить про зміну фракційного складу білків сироватки [19]. Серед органів, патології яких призводять до гіпопротеїнемії і зсуву окремих фракцій загального білка крові, важливе місце займають порушення функцій печінки і нирок [7,19]. Звісно, що при навантаженні токсичними речовинами печінка виконує детоксифікуючу функцію [7].

На тлі гіпопротеїнемії і гіпоальбумінемії спостерігалось підвищення вмісту креатиніну і недостовірне підвищення сечовини в сироватці крові [19]. Відомо, що креатинін і сечовина з іншими речовинами становлять залишковий Нітроген крові і підлягають виділенню із організму. Також креатинін бере участь в енергетичному обміні м'язової та інших тканин. З організму креатинін виводиться нирками із сечею, тому його вміст в крові – важливий показник діяльності нирок. Зважаючи на це, зазначимо, що інгаляційна інтоксикація паром електронних сигарет призвела до зростання вмісту креатиніну в сироватці щурів на 89,88 %. Зазначимо, що гіперкреатинінемія, як відомо, може бути наслідком зневоднення організму, ураження і розпаду м'язової тканини, а

також гострої або хронічної ниркової недостатності [20]. Стає очевидним, що при впливі "вейпу" спостерігається зміна функціонального стану нирок.

Важливою інформативною ознакою зміни діяльності нирок служить і сечовина крові, яка в основному виводиться з організму нирками. Відомо, що синтез сечовини здійснюється в мітохондріях гепатоцитів із використанням трьох молекул АТФ. Загалом інгаляційна інтоксикація "вейпом" призводить до тенденції підвищення вмісту сечовини – на 30,23 %. Ці дані свідчать про те, що в умовах субтоксичної інтоксифікації організму "вейпом" в підгострому експерименті спостерігається тенденція до уремії та достовірна гіперкреатинінемія, що підтверджує ймовірне порушення функціонального стану нирок.

Висновки:

1. Встановлено, що за результатами підгострого експерименту внаслідок інгаляційної затравки електронними сигаретами на протязі 45 діб в організмі щурів визначено зниження рівня загального білка сироватки крові у піддослідних тварин на 18,74 %, альбуміну – на 35,25 %, а також підвищення вмісту креатиніну у сироватці крові на 89,88 % та сечовини на 30,23 %.

2. Отримані результати біохімічних досліджень свідчать, що внаслідок інгаляційної затравки електронними сигаретами в організмі щурів спостерігається гіпоп-

ротейнемія за рахунок гіпоальбумінемії, що свідчить про порушення білоксинтезуючої функції печінки.

А гіперкреатинінемія та тенденція до уремії можуть свідчити про порушення екскреторної функції нирок.

Рекомендації щодо продовження досліджень.

Враховуючи літературні дані щодо зростання пулу вільних амінокислот плазми крові в результаті активації розпаду білків, що сприяє направленому синтезу ряду клітинних структур, представляється актуальним дослідження фонду амінокислот плазми під час інгаляційної інтоксикації електронними сигаретами.

Список використаних джерел:

- DeHart W.B. The Experimental Tobacco Marketplace: Narratives engage cognitive biases to increase electronic cigarette substitution / W.B. DeHart, A.M. Mellis, B.A. Kaplan et al. // *Drug Alcohol Depend.*, 2019. – Vol. 19. – P. 203–211.
- Кочеткова С.К. Исследование особенностей курения кальяна и электронных сигарет / С.К. Кочеткова, И.М. Остапченко // Мат-лы региональной научно-практич. конф. "Научное обеспечение производства сельскохозяйственной и пищевой продукции высокого качества и повышенной безопасности". – Краснодар : ГНУ ВНИИТТИ, 2011. – С. 249–256.
- Исследование жидкостей для электронных систем доставки никотина / С.К. Кочеткова, Н.А. Дурунча, Т.А. Пережогина, И.М. Остапченко // *Международ. научно-исследоват. журн.*, 2017. – № 4 (58). – С. 54–57.
- Centers for Disease Control and Prevention Notes from the field: electronic cigarette use among middle and high school students-United States, 2011-2012 // *Morbidity and mortality weekly report*, 2013. – Vol. 62, № 35. – P. 729–762.
- Скворцова С.В. Правовое регулирование использования электронных сигарет в России / С.В. Скворцова, Ф.С. Штурмин // *Успехи в химии и химической технологии*, 2017. – Т. XXXI, № 7. – С. 79–81.
- Осипов Д.А. Место электронных систем доставки никотина в терапии никотиновой зависимости: современный взгляд на проблему / Д.А. Осипов // *Вест. современ. клинич. мед-ны*, 2018. – Т. 11, вып. 2. – С. 46–50.
- Nakonechna O.A. Disturbance of the transmembrane phosphatidylserine asymmetry in hepatocytes as an apoptosis marker under the action of xenobiotics on rats / O.A. Nakonechna, L.A. Babichuk, A.I. Bezrodna // *Ukr. Biochem. J.*, 2018. – Vol. 90., № 6. – P.82–88.
- Наконечна О. А. Вплив блоксополімерів на регуляцію та основні показники білкового та вуглеводного обміну у щурів в умовах підгострого токсикологічного експерименту / О.А. Наконечна, А.І. Безродна, К.А. Кривонос // *Вісн. Київ. нац. ун-ту імені Тараса Шевченка. Серія : Проблеми регуляції фізіологічних функцій*, 2018. – № 25. – С. 55–59.
- Main and side stream effects of electronic cigarettes / E. Papaefstathiou, M. Stilianou, A. Agapiou // *J. Environ. Manage*, 2019. – Vol. 238, № 2. – P. 10–17.
- E-Cigarette Use Causes a Unique Innate Immune Response in the Lung, Involving Increased Neutrophilic Activation and Altered Mucin Secretion / B. Reidel, G. Radicioni, P.W. Clapp et al. // *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2018. – Vol. 197, N 4. – P. 492–501.
- Влияние вейпа и табачных сигарет на слизистую оболочку полости рта / А.П. Петрова, А.О. Павлова, Ю.Д. Мирошник, А.А. Сергеев // *Международ. студ. науч. вест.*, 2018. – № 1. – С. 35–39.
- Lung cancer specialist physicians' attitudes towards e-cigarettes: A nationwide survey / W.S. Dong, I.K. Young, J.K. Seung et al. // *PLOS ONE*, 2017. – DOI:10.1371/journal.pone.0172568.
- Atala A. Re: E-Cigarette Smoke Damages DNA and Reduces Repair Activity in Mouse Lung, Heart, and Bladder as Well as in Human Lung and Bladder Cells / A. Atala // *J. Urol.*, 2018. – Vol. 200(4). – P. 701–711.
- Lee H.-W. E-cigarette smoke damages DNA and reduces repair activity in mouse lung, heart, and bladder as well as in human lung and bladder cells / H.-W. Lee // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2018. – Vol. 1. – P. 1560–1569.
- ГОСТ 32646-2014 Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Острая ингаляционная токсичность – метод определения класса острой токсичности (метод АТС). Дата введения 2015-06-01.
- Камышников В. С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике / В.С. Камышников. – 3-е изд. – М. : МЕДпресс информ, 2009. – 896 с.
- Ингерлейб М. Б. Анализы: полный справочник / М.Б. Ингерлейб. – М. : Изд-во: АСТ. – 2011. – 250 с.
- Лабораторные методы исследования в клинике : справочник / под ред. проф. В.В. Меншикова. – М. : Медицина, 1987. – 368 с.
- Показники загального обміну і оксидативного стресу у щурів при тривалій дії малих концентрацій Cd2+ / У.Сі, Ю.Кот, К.Кот,

С. Перський та ін. // *Вісн. Харків. нац. ун-ту імені В.Н. Каразіна. Серія : Біологія*, 2017. – Вип. 29. – С. 182–187.

20. Вишняцкая И.А. Влияние оксигенированных алкилфенолов на состояние белкового обмена в подостром токсикологическом опыте / И.А. Вишняцкая, Д.И. Маракушин, О.А. Наконечная // *Укр. журн. клінічної та лаборатор. мед-ни*, 2013. – Т.8. – №2. – С.173–178.

Reference (Scopus):

- De Hart W.B., Mellis A.M., Kaplan B.A. The Experimental Tobacco Marketplace: Narratives engage cognitive biases to increase electronic cigarette substitution. *Drug Alcohol Depend.* 2019; 19: 203-11.
- Kochetkova S.K., Ostapchenko I.M. Investigation of the features of smoking hookah and electronic cigarettes. Materials of the regional scientific-practical conference "Scientific support for the production of high-quality agricultural and food products and enhanced security." – Krasnodar: GNU VNIITTI., 2011: 249-56.
- Kochetkova S.K., Duruncha N.A., Perezhogin T.A., Ostapchenko I.M. Study of liquids for electronic nicotine delivery systems. *International Research Journal*. 2017; 4 (58): 54-57.
- Centers for Disease Control and Prevention Notes from the field: electronic cigarette use among middle and high school students-United States, 2011-2012. *Morbidity and mortality weekly report*. 2013; 62(35): 729-62.
- Skvortsova S.V., Shurmin F.S. Legal regulation of the use of electronic cigarettes in Russia. *Advances in chemistry and chemical technology*. 2017: XXXI (7): 79-81.
- Osipov D.A. Place of electronic nicotine delivery systems in the treatment of nicotine addiction: a modern view of the problem. *Bulletin of modern clinical medicine*. 2018; 11(2): 46-50.
- Nakonechna O. A., Babichuk L. A., Bezrodna A. I. Disturbance of the transmembrane phosphatidylserine asymmetry in hepatocytes as an apoptosis marker under the action of xenobiotics on rats. *Ukr. Biochem. J.* 2018; 90 (6): 82-88.
- Nakonechna O.A., Bezrodna A.I., Krivonos K.A. Effect of bloxopolymers on regulation and main indicators of the protein and carbohydrate metabolism in rats under conditions of subject toxicological experiment. *Visnyk Taras Shevchenko National University of Kyiv. Problems of physiologic functions regulation*. 2018; 25: 55-59.
- Papaefstathiou E., Stylianou M., Agapiou A. Main and side stream effects of electronic cigarettes. *J. Environ. Manage*. 2019; 238 (2): 10-17.
- Reidel B., Radicioni G., Clapp P.W. E-Cigarette Use Causes a Unique Innate Immune Response in the Lung, Involving Increased Neutrophilic Activation and Altered Mucin Secretion. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2018; 197 (4): 492-501.
- Petrova A.P., Pavlova A.O., Miroshnichenko Yu.D., Sergeev A.A. The effect of vape and tobacco cigarettes on the oral mucosa. *International Student Scientific Herald*. 2018; 1: 35-39.
- Dong W. S., Young I.K., Seung J.K. Lung cancer specialist physicians' attitudes towards e-cigarettes: A nationwide survey. *PLOS ONE*. 2017; DOI:10.1371/journal.pone.0172568.
- Atala A. Re: E-Cigarette Smoke Damages DNA and Reduces Repair Activity in Mouse Lung, Heart, and Bladder as Well as in Human Lung and Bladder Cells. *J. Urol.* 2018. 200(4): 701-711.
- Lee H.-W. E-cigarette smoke damages DNA and reduces repair activity in mouse lung, heart, and bladder as well as in human lung and bladder cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2018; 1. 1560–69.
- [State standard 32646-2014 Test methods on the effects of chemical products on the human body. Acute Inhalation Toxicity – method for class of acute toxicity determining]. Introduction date: 2015 Jun 01. Russian.
- Kamyshnikov V.S. [Handbook of clinical and biochemical studies and laboratory diagnostics]. 3rd ed. Moscow: Medpress inform; 2009. 896 p. Russian.
- Ingerleib M.B. [Analyzes: a complete guide]. Publisher AST; 2011. 250 p. Russian.
- Menshikov V.V. editor. [Laboratory research methods in the clinic. Directory]. Moscow: The Medicine; 1987. 368 p. Russian.
- Wu Si, Yu.Kot, K.Kot, E.Persky, R.Morse, O.Doran, Hamdallah Amjad Total metabolism and oxidative stress parameters in rats at long-term exposure to low concentrations of Cd2+. *The Journal of V.N. Karazin Kharkiv National University. Series "Biology"*. 2017; 29: 182-87.
- Vyshnytska IA, Marakushin DI, Nakonechna OA. Effect of ethoxylated alkylphenols on the state of proteins metabolism in subacute toxicological experiment. *Ukrainian Journal of Clinical and Laboratory Medicine*. 2013;8(2):173-8. Russian.

Надійшла до редакції 14.02.2019

Отримано виправлений варіант 15.03.2019

Підписано до друку 15.03.2019

Received in the editorial 14.02.2019

Received a revised version on 15.03.2019

Signed in the press on 15.03.2019

А. Безродная^{1,2}, асист., И. Вишницкая¹, канд. биол. наук,
С. Стеценко¹, канд. биол. наук
Харьковский национальный медицинский университет, Харьков, Украина¹,
Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина, Харьков, Украина²,
Э. Ходош, канд. биол. наук
Харьковская медицинская академия последиипломного образования, Харьков, Украина

ИЗУЧЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ОБМЕНА БЕЛКОВ В ОРГАНИЗМЕ КРЫС ПОД ВЛИЯНИЕМ ИНГАЛЯЦИОННОЙ ИНТОКСИКАЦИИ "ВЕЙПОМ" ЭЛЕКТРОННЫХ СИГАРЕТ

Производители электронных сигарет утверждают, что их продукция не несет вреда человеческому организму и является оптимальным способом избавиться от вредной привычки – табакокурения. Однако учеными доказано обратное: вейпование ведет к передозировке никотином, а клубы пара электронных сигарет содержат токсичные канцерогенные соединения (формальдегид, ацетальдегид, ацетон, акролеин), которые отравляют человека. Кроме того, в процессе испарения жидкости составные части электронного устройства выделяют в пар такие тяжелые металлы, как медь, хром, свинец, никель и олово, которые, попадая в человеческий организм, приводят к необратимым изменениям в органах и тканях на клеточном уровне. Целью исследований является изучение влияния ингаляционной интоксикации "вейпом" электронных сигарет на обмен белков в организме крыс в подостром эксперименте путем определения содержания в сыворотке крови общего белка, альбумина и продуктов азотистого обмена – креатинина и мочевины. Установлено, что в результате подострого эксперимента вследствие ингаляционной заправки электронными сигаретами в течение 45 суток в организме крыс определено снижение уровня общего белка сыворотки крови у подопытных животных на 18,74 %, альбумина – на 35,25 %, а также повышение содержания креатинина в сыворотке крови на 89,88 % и мочевины на 30,23 %. Полученные результаты биохимических исследований свидетельствуют, что в результате ингаляционной заправки электронными сигаретами в организме крыс наблюдается гипопроteinемия за счет гипоальбуминемии, что свидетельствует о нарушении белоксинтетической функции печени. А гиперкреатининемия и тенденция к уремии могут свидетельствовать о нарушении экскреторной функции почек. Результаты клинического наблюдения относительно использования пациентом "вейпа" констатируют у больного диагноз экзогенный аллергический (токсический) альвеолит, обусловлен вейпингом, острое течение.

Ключевые слова: электронные сигареты, токсификация, организм крыс, показатели обмена белков.

A. Bezrodna^{1,2}, asist., I. Vyshnyska¹, Ph. D.,
S. Stetsenko¹, Ph. D.
Kharkiv National Medical University, Kharkiv, Ukraine¹,
Kharkiv National University named by V.N. Karazin, Kharkiv, Ukraine²,
E. Khodosh, Ph. D.
Kharkiv Medical Academy of Postgraduate Education, Kharkiv, Ukraine

STUDYING THE INDICATORS OF PROTEIN METABOLISM IN THE ORGANISM OF RATS UNDER THE INFLUENCE OF INHALATION INTOXICATION BY "VAPOUR" ELECTRONIC CIGARETTES

Manufacturers of electronic cigarettes claim that their products do not harm the human body and is a great way to get rid of the bad habit – tobacco smoking. However, scientists proved the opposite: vaping leads to an overdose of nicotine, and puffs of vapor of electronic cigarettes contain toxic carcinogenic compounds (formaldehyde, acetaldehyde, acetone, acrolein) that poison a person. In addition, in the process of evaporation of a liquid, components of an electronic device emit such heavy metals as copper, chromium, lead, nickel and tin into steam, which, entering the human body, lead to irreversible changes in organs and tissues at the cellular level. The purpose of the research is to study the effect of inhaled intoxication of the "vapour" of electronic cigarettes on the exchange of proteins in the rat's body in a subacute experiment by determining the content of total protein, albumin and nitric metabolism products, creatinine and urea, in serum. It has been established that as a result of subacute experiment, following an inhalation priming with electronic cigarettes, for 45 days in the rat organism the decrease of the serum total protein level in the experimental animals was determined at 18.74 %, albumin – by 35.25 %, as well as the increase in serum creatinine blood by 89.88 % and urea by 30.23 %. The results of biochemical studies indicate that as a result of inhalation priming with electronic cigarettes in the rat body, hypoproteinemia is observed due to hypoalbuminemia, which suggests a violation of the protein-synthetic function of the liver. A hypercreatinemia and a tendency to uremia may indicate a violation of the excretory function of the kidneys. The results of clinical observation regarding the use of the "vapour" patient indicate the diagnosis -eosinophilic exogenous (toxic) alveolitis, due to vaping, acute flow.

Key words: electronic cigarettes, toxification, rat organism, indicators of protein metabolism.

УДК 577.112.7:612

Я. Расцька, канд. біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

РІВЕНЬ ПРОЗАПАЛЬНИХ ЦИТОКІНІВ ЗА УМОВ ЛУЖНОГО ОПІКУ СТРАВОХОДУ 2-ГО СТУПЕНЯ ТА ПРИ ВВЕДЕННІ ЕКСТРАКТУ СТРУЧКІВ *PHASEOLUS VULGARIS*

У сучасному світі частота отруєнь унаслідок прийому корозивних агентів продовжує зростати. Хімічні опіки найпоширеніша патологія стравоходу у дітей. У результаті проникнення лугів і контакту зі стінкою стравоходу в поєднанні з некрозом відбувається пошкодження слизової, підслизової та м'язової оболонки стравоходу. Незважаючи на велику кількість ліків, які були випробувані при лікуванні ускладнень, викликаних опіками стравоходу, інформації, яка б вказувала на високу ефективність застосованих раніше препаратів, небагато. При лікуванні хімічних опіків стравоходу виникає багато ускладнень. Повноцінне відновлення функціонального статусу імунітету – важливий крок у комплексній терапії лікування хімічних опіків стравоходу. Аналіз даних літератури свідчить про позитивний вплив поліфенолів натурального походження на нормалізацію фізіологічних і біохімічних параметрів за різних патологій. Екстракт стручків квасолі звичайної (*Phaseolus vulgaris* pods extract (PVPE)) є прикладом багатого на біоактивні компоненти джерела з корисними характеристиками для людини. Тому метою нашої роботи було дослідити рівень прозапальних цитокінів (ІЛ-1β та ІЛ-6) у сироватці крові щурів за умов моделювання лужного опіку стравоходу 2-го ступеня на 7,15, 21 та 31 доби та за введення екстракту стручків *Phaseolus Vulgaris*. Під час дослідження встановлено, що при ЛОС 2 спостерігається виражене і тривале підвищення маркерних прозапальних цитокінів ІЛ-1β та ІЛ-6, що можуть спричинити утворення гранульованої тканини, наслідком чого є формування рубців, порушення репаративної регенерації та уповільнення загоєння опікової рани. Вміст прозапальних цитокінів у групі тварин з лікуванням нижчий порівняно з групою з опіком без лікування протягом часу досліду, що може вказувати на виражений терапевтичний ефект екстракту стручків квасолі при лужних опіках стравоходу.

Ключові слова: лужний опік стравоходу, інтерлейкіни, квасоля.

Вступ. У сучасному світі, частота отруєнь унаслідок прийому корозивних агентів продовжує зростати. Хімічні опіки є найпоширенішою патологією стравоходу у

дітей [3, 4, 17]. У результаті проникнення лугів і контакту зі стінкою стравоходу в поєднанні з некрозом відбувається пошкодження слизової, підслизової та м'язової

оболонки стравоходу [19, 22, 23]. Незважаючи на велику кількість ліків, які були випробувані при лікуванні ускладнень, викликаних опіками стравоходу, небагато інформації, котра б вказувала на високу ефективність застосованих раніше препаратів [1, 2, 5, 14].

Процес загоєння ран складається з трьох взаємопов'язаних фаз: запалення, проліферація та загоєння. Унаслідок лужного опіку стравоходу відбувається індукція запального процесу, яка характеризується викидом прозапальних цитокінів [8, 25]. Запалення є важливим процесом для успішного загоєння постопікових ран. Такі медіатори запалення, як цитокіни, кініни, ліпіди та інші реалізують імунний сигнал для задіяння лейкоцитів та макрофагів задля ініціації проліферативної фази [20]. Подовжена в часі фаза запалення є шкідливим чинником для нормального загоєння після опіків і впливає на інші фази загоєння ран [21]. Подовжену фазу загоєння асоціюють з надлишковим рубцюванням (завдяки надлишковій депозиції колагену) [24].

Процес загоєння ран у щурів дуже подібний на процес загоєння ран у людей, моделі на гризунах добре вивчені і вважаються прийнятними для досліджень загоєння ран [7, 9, 15]. При лікуванні хімічних опіків стравоходу виникає багато ускладнень [18]. Повноцінне відновлення функціонального статусу імунітету – важливий крок у комплексній терапії лікування хімічних опіків стравоходу.

Аналіз даних літератури свідчить про позитивний вплив поліфенолів натурального походження на нормалізацію фізіологічних і біохімічних параметрів за різних патологій [20]. Екстракт стручків квасолі звичайної (*Phaseolus vulgaris* pods extract (PVPE)) є прикладом багатого на біоактивні компоненти джерела з корисними характеристиками для людини. Тому метою нашої роботи було дослідити рівень прозапальних цитокінів (IL-1 β та IL-6) у сироватці крові щурів за умов моделювання лужного опіку стравоходу 2-го ступеня на 7, 15, 21 та 31 доби та при введенні екстракту стручків *Phaseolus Vulgaris*.

Матеріали та методи. Моделювання опіку. У досліджах використовували білих нелінійних статевонезрілих щурів (1-місячних) масою 90–110 г (відповідають 1-4-річному віку дітей) із дотриманням загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (вересень 2001 р.), інших міжнародних угод і національного законодавства в цій галузі. Тварин утримували на стандартному раціоні віварію. Опік стравоходу моделювали введенням 0,2 мл 20 % розчину NaOH, що відповідає 2-му ступеню опіку, для цього вводили зонд у стравохід запаяним торцем і отвором на відстані 2 мм від нього. Зонд вводили на глибину 4 см від верхніх різців щура та повільно вводили 0,2 мл 20 % NaOH, таким чином, відтворюючи 2-й ступінь опіку. Контрольним щурам одноразово перорально вводили відповідний об'єм води для ін'єкцій [18]. Тварин утримували на стандартному раціоні віварію. **Формування груп.** Тварини були розділені на 4 групи: група 1 (G1) – інтактні контрольні тварини (пероральне введення фізіологічного розчину у відповідній дозі та терміни); група 2 (G2) – контрольні тварини, яким вводили екстракт, починаючи з 2-ї доби досліді, в об'ємі 1 мг/кг протягом 31 доби; група 3 (G3) – лужний опік страво-

ходу 2-го ступеня, які споживали воду; група 4 (G4) – група з лужним опіком стравоходу 2-го ступеня, яким вводили екстракт, починаючи з 2-ї доби досліді, в об'ємі 1 мг/кг протягом 31 доби.

Отримання екстракту стручків квасолі звичайної. Для приготування екстракту 132 г подрібненого сухого лушпиння квасолі звичайної заливали 1 л окропу [16]. Посудину щільно закривали і настоювали на киплячій водянній бані протягом 15 хв. Потім екстракт охолоджували при кімнатній температурі 25° С. Отриманий екстракт фільтрували через декілька шарів марлі та центрифугували при 1000 g протягом 10 хв для позбавлення грубих залишків рослинної сировини. Надосад заморожували, після чого висушували шляхом ліофілізації. У результаті описаних вище маніпуляцій отримали 8 г сухого екстракту, який зберігали при –20° С. У дослідженнях використовували свіжеприготовані водні розчини сухого екстракту.

Отримання біологічного матеріалу. Методом введення тварин із досліді була цервікальна дислокація. Сироватку крові та тканини стравоходу для дослідження отримували на 7, 15, 21 та 31 добу, які відповідають стадіям опікової хвороби [10].

Імуноферментний аналіз. Для визначення вмісту прозапальних цитокінів використовували метод імуноферментного аналізу, який проводили відповідно до стандартного протоколу з певними модифікаціями [11]. Досліджувані зразки слизової оболонки стравоходу (10 мкг/мл у 50 мМ Тріс-HCl буфері (pH 7,4)) об'ємом 100 мкл інкубували в лунках 96-лункового планшета протягом ночі за 4° С. Для блокування неспецифічних ділянок зв'язування після відмивання інкубують із 5 % знежиреним молоком протягом години +37° С. Наступний етап – відмивали 0,05 М тріс-HCl буфером із твін-20 та 0,05 М тріс-HCl буфером двічі. Потім додавали первинні антитіла певної специфічності та інкубували 1 годину години +37° С. Після цього була інкубація з відповідними вторинними антитілами. Після кожного із зазначених етапів проводилось відмивання 0,05 М тріс-HCl буфером з 0,1 % твін-20 двічі. Як субстрат пероксидазної реакції в роботі використовували о-фенілєندیамін/пероксид водню ("Sigma", США). Вимірювання проводили при довжині хвилі 492 нм.

Статистичну обробку результатів проводили з використанням методів математичної статистики та застосуванням пакетів прикладних програм Statistica 6.0, Microsoft Excel 2010 і TotalLab 2.01. Достовірними вважали відмінності за $p < 0,05$. Для кожного отриманого результату визначали показники середнього арифметичного (M) і стандартної похибки середнього арифметичного (m).

Результати та обговорення. Унаслідок порушення епітеліального бар'єра може відбутися сепсис і послаблення імунітету [2]. Гостра запальна відповідь ініціюється через активацію тканинними макрофагами і секрецією прозапальних цитокінів, особливо IL-1 та IL-6, які забезпечують багато локальних і систематичних змін під час запалення [6, 12]. Ми дослідили зміни вмісту прозапальних цитокінів у динаміці (табл. 1).

Таблиця 1. Рівень прозапальних цитокінів у сироватці крові щурів на 7-му добу за умов ЛОС 2-го ступеня та при введенні екстракту квасолі в дозі 1 мг/кг; ($M \pm m$, $n = 10$ для кожної групи)

7 Day	IL-1b	IL-6
G 1	0.123±0.006	0.142±0.007
G 2	0.119±0.006	0.141±0.007
G 3	0.191±0.013*	0.275±0.022*
G 4	0.169±0.010*#	0.264±0.015*

* – $p \leq 0,05$ порівняно з контролем G1; # – $p \leq 0,05$ порівняно з групою G3.

IL-1 β є одним із ключових цитокінів у регуляції та захисті ран. Отримані нами дані вказують на збільшення вмісту IL-1 β за умов ЛОС 2 протягом 31 доби. Вміст прозапального цитокіну IL-1b зростає у 1,55 раза в групі G3 та в 1,37 раза в групі G4 на 7 добу порівняно з конт-

рольною групою тварин (табл. 1). На 14 добу помічається збільшення вмісту IL-1b в 1,26 та 1,14 для груп G3 та G4, відповідно (табл. 2). На 21 добу помічається збільшення вмісту в 1,25 раза в групі G3 та 1,14 для G4 порівняно з контрольною групою G1 (табл. 3).

Таблиця 2. Рівень прозапальних цитокінів у сироватці крові щурів на 14 добу за умов ЛОС 2-го ступеня та при введенні екстракту квасолі в дозі 1 мг/кг, ($M \pm m$, $n=10$ для кожної групи)

14 Day	IL-1b	IL-6
G 1	0.121±0.006	0.144±0.007
G 2	0.123±0.006	0.142±0.007
G 3	0.153±0.008*	0.272±0.015*
G 4	0.138±0.006*#	0.244±0.012*#

* – $p \leq 0,05$ порівняно з контролем G1; # – $p \leq 0,05$ порівняно з групою G3.

IL-6 відіграє роль плейотропного цитокіна і бере участь у рості та диференціації різних типів клітин [12, 13]. У нашому дослідженні показано збільшення вмісту IL-6 протягом всього часу досліді. Вміст прозапального цитокіну IL-6 був збільшений у 1,93 раза в групі G3 та в 1,85 раза в групі G4 на 7 добу порівняно з контрольною

групою тварин (табл. 1). На 14 добу помічено збільшення вмісту IL-6 у 1,88 та 1,69 для груп G3 та G4, відповідно (табл. 2). На 21 добу помічено збільшення вмісту в 1,34 раза в групі G3 та 1,19 для G4 порівняно з контрольною групою G1 (табл. 3).

Таблиця 3. Рівень прозапальних цитокінів у сироватці крові щурів на 21 добу за умов ЛОС 2-го ступеня та при введенні екстракту квасолі в дозі 1 мг/кг, ($M \pm m$, $n=10$ для кожної групи)

21 Day	IL-1b	IL-6
G 1	0.123±0.006	0.139±0.007
G 2	0.119±0.006	0.142±0.007
G 3	0.154±0.012*	0.187±0.013*
G 4	0.141±0.008*	0.166±0.010*

* – $p \leq 0,05$ порівняно з контролем G1; # – $p \leq 0,05$ порівняно з групою G3.

Таким чином, під час нашого дослідження було помітно збільшення прозапальних цитокінів, що може вказувати на подовжену фазу запалення. При застосуванні екстракту квасолі помічалася зниження вмісту прозапальних цитокінів порівняно з показниками при ЛОС 2, що

вказує на протизапальні властивості цієї речовин і показує перспективність використання екстракту квасолі як речовини, що сприяє загоєнню опіку стравоходу.

Таблиця 4. Рівень прозапальних цитокінів в сироватці крові щурів на 31 добу за умов ЛОС 2-го ступеня та при введенні екстракту квасолі в дозі 1 мг/кг, ($M \pm m$, $n=10$ для кожної групи)

31 Day	IL-1b	IL-6
G 1	0.123±0.006	0.147±0.007
G 2	0.122±0.006	0.142±0.007
G 3	0.125±0.008	0.163±0.011
G 4	0.125±0.006	0.143±0.007

* – $p \leq 0,05$ порівняно з контролем G1; # – $p \leq 0,05$ порівняно з групою G3.

Отримані результати показали, що при ЛОС 2-го ступеня спостерігається виражене і тривале підвищення маркерних прозапальних цитокінів IL-1 β та IL-6. При використанні екстракту квасолі за умов ЛОС вміст прозапальних цитокінів у групі тварин з лікуванням нижчий порівняно з групою з опіком без лікування протягом досліді, що може вказувати на виражений терапевтичний ефект екстракту стручків квасолі при лужних опіках стравоходу.

Список використаних джерел:

1. Bautista A. Effects of prednisolone and dexamethasone in children with alkali burns of the oesophagus / A. Bautista, R. Varela, A. Villanueva // Eur J. Pediatr. Surg., 1996. – № 6. – P. 198–203.
2. Cakmak M. The effect of corticosteroids and pentoxifylline in caustic esophageal burns. A prospective trial in rats / M. Cakmak, A. Nayci, N. Renda // Int. Surg., 1997. – № 82. – P. 371–375.
3. Contini S. Oesophageal corrosive injuries in children: a forgotten social and health challenge in developing countries / S. Contini, A. Swarray-Deen, C. Scarpignato // Bull. World Health Organ., 2009. – № 87. – P. 950–954.
4. Cruz R. Chemical burns in children: Aetiology and prevention / R. Cruz, T. Pang, J. Harvey, A. Holland // Burns, 2015. – № 41. – P. 764–769.

5. Demirbilek S. Effects of estradiol and progesterone on the synthesis of collagen in corrosive esophageal burns in rats / S. Demirbilek, F. Bernay, R. Rizalar // J. Pediatr. Surg., 1994. – № 29. – P. 1425–1428.
6. Cytokine response to burn injury: relationship with protein metabolism / J. DeBandt, S. Chollet-Martin, A. Hervann et al. // J. Trauma, 1994. – № 36. – P. 624–634.
7. Diabetes impairs the late inflammatory response to wound healing / T. Fahey, A. Sadaty, W. Jones et al. // J. Surg. Res., 1991. – № 50. – P. 308–313.
8. Cytokine expression profile over time in severely burned pediatric patients / C. Finnerty, D. Herndon, R. Przkora et al. // Shock, 2006. – № 26. – P. 13–29.
9. Ford H. Characterization of wound cytokines in the sponge matrix model / H. Ford, R. Hoffman, E. Wing // Arch. Surg., 1989. – № 124. – P. 1422–1428.
10. Fistal E. Combustiology / E. Fistal, G. Kozinets, G. Samoilenko. – Kharkov, 2004.
11. Hepatoprotective effect of orally applied water-soluble pristine C60 fullerene against CCl₄-induced acute liver injury in rats / T. Halenova, I. Varenuk, N. Roslova et al. // RSC Adv., 2016. – № 6. – P. 100046–100055.
12. Kishimoto T. Interleukin-6: discovery of a pleiotropic cytokine / T. Kishimoto // Arthritis Res Ther., 2006. – № 8. – P. 2–8.
13. Changes in the levels of interleukins 6, 8, and 10, tumor necrosis factor alpha, and granulocyte-colony stimulating factor in Korean burn patients: relation to burn size and postburntime / H. Kim, J. Kim, H. Yim, D. Kim // Ann Lab Med., 2012. – № 32. – P. 339–344.
14. Effects of caffeic acid phenethyl ester and epidermal growth factor on the development of caustic esophageal stricture in rats / U. Koltuksuz, H. Mutus, R. Kutlu et al. // J. Pediatr Surg., 2001. – № 36. – P. 1504–1509.
15. Kondo T. The dynamics of inflammatory cytokines in the healing process of mouse skin wound: a preliminary study for possible wound age determination / T. Kondo, T. Ohshima // Int. J. Legal Med., 1996. – № 108. – P. 231–236.
16. Effect of aqueous extract from Phaseolus vulgaris pods on lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in the liver and kidney of diabetic rats / M. Kyznetsova, O. Makieieva, D. Lavrovska et al. // J. Appl. Pharm. Sci., 2015. – № 5. – P. 1–6.
17. Cytokine profile indicators in rat blood serum in a model of esophagus burn induced by antioxidant chemical preparation / Y. Raetska, N. Chornenka, T. Koval et al. // Biomedical Research and Therapy, 2017. – № 9. – P. 1591–1606.
18. Experimental modeling of 1st and 2nd degrees alkali esophageal burn in immature rats / Y. Raetska, T. Ischuk, O. Dzhus et al. // Biol. Syst., 2014. – № 6. – P. 39–44.
19. Apoptosis and necrosis in the ischemic zone adjacent to third degree burns / A. Singer, S. McClain, B. Taira et al. // Acad. Emerg. Med., 2008. – № 15. – P. 549–554.
20. Singer A. Cutaneous wound healing / A. Singer, R. Clark // N. Engl. J. Med., 1999. – № 341. – P. 738–746.
21. Delayed wound repair in sepsis is associated with reduced local pro-inflammatory cytokine expression / K. Sommer, A. Sander, M. Albig et al. // PLoS One, 2013. – № 8. – P. 739–742.
22. The roles of autophagy and apoptosis in burn wound progression in rats / J. Tan, H. Zhang, Z. Lei et al. // Burns, 2013. – № 39. – P. 1551–1556.
23. Tiwari V. Burn wound: how it differs from other wounds? / V. Tiwari // Indian. J. Plast. Surg., 2012. – № 45. – P. 364–373.
24. Xue M. Extracellular matrix reorganization during wound healing and its impact on abnormal scarring / M. Xue, C. Jackson // Adv Wound Care (New Rochelle), 2015. – № 4. – P. 119–136.
25. Youn Y. The role of mediators in response to thermal injury / Y. Youn, C. Lalonde, R. Demling. // World. J. Surg., 1992. – № 16. – P. 30–40.
5. Demirbilek S, Bernay F, Rizalar R, Bariş S, Gürses N. Effects of estradiol and progesterone on the synthesis of collagen in corrosive esophageal burns in rats. J Pediatr Surg 1994;29:1425–8.
6. DeBandt JP, Chollet-Martin S, Hervann A, et al. Cytokine response to burn injury: relationship with protein metabolism. J Trauma 1994; 36: 624.
7. Fahey, T. J. D., Sadaty, A., Jones, W. G. D., Barber, A., Smoller, B., and Shires, G. T. (1991) Diabetes impairs the late inflammatory response to wound healing. J. Surg. Res. 50, 308–313
8. Finnerty CC, Herndon DN, Przkora R, Pereira CT, Oliveira HM, Queiroz DM, et al. Cytokine expression profile over time in severely burned pediatric patients. Shock 2006;26:13–9.
9. Ford, H. R., Hoffman, R. A., Wing, E. J., Magee, D. M., McIntyre, L., and Simmons, R. L. (1989) Characterization of wound cytokines in the sponge matrix model. Arch. Surg. 124, 1422–1428
10. Fital E.Y., G.P. Kozinets, G.E. Samoilenko and al., Combustiology, Kharkov: 2004.
11. Halenova TI, Varenuk IM, Roslova NM, Dzerzhynsky ME, Savchuk OM, Ostapchenko LI. Hepatoprotective effect of orally applied water-soluble pristine C60 fullerene against CCl₄-induced acute liver injury in rats. 2016. RSC Adv 6:100046–100055
12. Kishimoto T. Interleukin-6: discovery of a pleiotropic cytokine. Arthritis Res Ther 2006;8 Suppl 2:S2.
13. Kim HS, Kim JH, Yim H, Kim D. Changes in the levels of interleukins 6, 8, and 10, tumor necrosis factor alpha, and granulocyte-colony stimulating factor in Korean burn patients: relation to burn size and post-burntime. Ann Lab Med 2012; 32:339–44.
14. Koltuksuz U, Mutuş HM, Kutlu R, Ozyurt H, Cetin S, Karaman A, et al. Effects of caffeic acid phenethyl ester and epidermal growth factor on the development of caustic esophageal stricture in rats. J Pediatr Surg 2001;36:1504–9.
15. Kondo, T., and Ohshima, T. (1996) The dynamics of inflammatory cytokines in the healing process of mouse skin wound: a preliminary study for possible wound age determination. Int. J. Legal Med. 108, 231–236
16. Kyznetsova MY, Makieieva OM, Lavrovska DO, Tymoshenko MO, Sheverova DP, Halenova TI, Savchuk OM, Ostapchenko LI. 2015. Effect of aqueous extract from Phaseolus vulgaris pods on lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in the liver and kidney of diabetic rats. J Appl Pharm Sci. 5:1–6.
17. Raetska Y, Chornenka N, Koval T, Savchuk O, Beregova T, Ostapchenko L. Cytokine profile indicators in rat blood serum in a model of esophagus burn induced by antioxidant chemical preparation. Biomedical Research and Therapy [Internet]. 20Sep.2017
18. Raetska Ya. B., Ischuk T. V., Dzhus O. I., Savchuk O. M., Ostapchenko L. I. Experimental modeling of 1st and 2nd degrees alkali esophageal burn in immature rats. Biol. Syst. 2014;6(1):39–44. (In Ukrainian).
19. Singer AJ, McClain SA, Taira BR, Guerriero JL, Zong W. Apoptosis and necrosis in the ischemic zone adjacent to third degree burns. Acad Emerg Med. 2008;15:549–54.
20. Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. N Engl J Med. 1999;341:738–46.
38. Hinz B. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. J Invest Dermatol. 2007;127:526–37.
21. Sommer K, Sander AL, Albig M, Weber R, Henrich D, Frank J, et al. Delayed wound repair in sepsis is associated with reduced local pro-inflammatory cytokine expression. PLoS One. 2013;8, e73992.
22. Tan JQ, Zhang HH, Lei ZJ, Ren P, Deng C, Li XY, et al. The roles of autophagy and apoptosis in burn wound progression in rats. Burns. 2013;39:1551–6.
23. Tiwari VK. Burn wound: how it differs from other wounds? Indian J Plast Surg. 2012;45:364–73.
- 32.
24. Xue M, Jackson CJ. Extracellular matrix reorganization during wound healing and its impact on abnormal scarring. Adv Wound Care (New Rochelle) 2015;4(3):119–136.
25. Youn YK, Lalonde C, Demling R. The role of mediators in response to thermal injury. World J Surg 1992; 16: 30.

Reference (Scopus):

1. Bautista A, Varela R, Villanueva A, Estevez E, Tojo R, Cadranet S. Effects of prednisolone and dexamethasone in children with alkali burns of the esophagus. Eur J Pediatr Surg 1996;6:198–203.
2. Cakmak M, Nayci A, Renda N, Erekel S, Gökçora H, Yücesan S. The effect of corticosteroids and pentoxifylline in caustic esophageal burns. A prospective trial in rats. Int Surg 1997;82:371–5.
3. Contini S, Swarray-Deen A, Scarpignato C. Oesophageal corrosive injuries in children: a forgotten social and health challenge in developing countries. Bull. World Health Organ. 2009;87:950–954.
4. Cruz R, Pang TC, Harvey JG, Holland AJ. Chemical burns in children: Aetiology and prevention. Burns 2015; 41: 764–769

Я. Раецкая, канд. биол. наук

Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

УРОВЕНЬ ПРОВосПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ В УСЛОВИЯХ ЩЕЛОЧНОГО ОЖОГА ПИЩЕВОДА 2-Й СТЕПЕНИ И ПРИ ВВЕДЕНИИ ЭКСТРАКТА СТРУЧКОВ PHASEOLUS VULGARIS

В современном мире частота отравлений вследствие приема коррозионных агентов продолжает расти. Химические ожоги наиболее частая патология пищевода у детей. В результате проникновения щелочей и контакта со стенкой пищевода вместе с некрозом происходит повреждение слизистой, подслизистой и мышечной оболочки пищевода. Несмотря на большое количество лекарств, которые были испытаны при лечении осложнений, вызванных ожогами пищевода, немного информации, которая бы указывала о высокой эффективности применяемых ранее препаратов. При лечении химических ожогов пищевода возникает много осложнений. Полноценное восстановление функционального статуса иммунитета – важный шаг в комплексной терапии лечения химических ожо-

Надійшла до редколегії 14.02.2019
Отримано виправлений варіант 15.03.2019
Підписано до друку 15.03.2019

Received in the editorial 14.02.2019
Received a revised version on 15.03.2019
Signed in the press on 15.03.2019

гов пищевода. Анализ данных литературы свидетельствует о положительном влиянии полифенолов натурального происхождения на нормализацию физиологических и биохимических параметров при различных патологиях. Экстракт стручков фасоли обыкновенной (*Phaseolus vulgaris* pods extract (PVPE)) является примером богатого на биоактивные компоненты источника полезных веществ для человека. Поэтому целью нашей работы было исследование уровня провоспалительных цитокинов (ИЛ-1 α и ИЛ-6) в сыворотке крови крыс в условиях моделирования щелочного ожога пищевода (ЩОП) 2-й степени на 7, 15, 21 и 31 сутки и при введении экстракта стручков *Phaseolus Vulgaris*. В ходе нашего исследования было установлено, что при ЩОП 2-й степени наблюдается выраженное и длительное повышение маркерных провоспалительных цитокинов ИЛ-1 α и ИЛ-6, которые могут вызвать образование гранулированной ткани, следствием чего является формирование рубцов, нарушение репаративной регенерации и замедление заживления ожоговой раны. Содержание провоспалительных цитокинов в группе животных с лечением ниже по сравнению с группой с ожогом без лечения в течении всего времени опыта, что может указывать на выраженный терапевтический эффект экстракта стручков фасоли при щелочных ожогах пищевода.

Ключевые слова: щелочной ожог пищевода, интерлейкины, фасоль.

Ya. Raietska, Ph. D.

Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

THE CONTENT OF PROINFLAMMATORY CYTOKINES IN BLOOD SERUM IN RATS WITH ALKALI BURNS ESOPHAGUS UNDER THE TREATMENT WITH *PHASEOLUS VULGARIS* EXTRACT

The frequency of damage due to poisoning with chemicals is increasing. Chemical burns are the most common pathology of the esophagus in children. As a result of penetration of alkalis and contact with the wall of the esophagus, along with necrosis, damage to the mucous membrane, submucosal and muscular membrane of the esophagus occurs. Despite a large number of drugs that have been tested in the treatment of complications caused by esophageal burns, there is little information that would indicate the high effectiveness of the previously used drugs. When treating chemical burns of the esophagus there are many complications. Full restoration of the functional status of immunity is an important step in the complex therapy of treatment of chemical burns of the esophagus. The analysis of literature data shows the positive influence of polyphenols of natural origin on the normalization of physiological and biochemical parameters in various pathologies. The extract of common beans (*Phaseolus vulgaris* pods extract (PVPE)) is an example of a rich bioactive component of the source with beneficial characteristics for humans. Therefore, the purpose of our work was to investigate the level of proinflammatory cytokines (IL-1 β and IL-6) in blood serum of rats in the simulation of alkaline esophageal burns of 2 degrees at 7th, 15th, 21st and 31st days and for the introduction of *Phaseolus Vulgaris* pod extract. During our study, it was found that during alkali burns esophagus second degree, marked and prolonged increase in marker proinflammatory cytokines IL-1 β and IL-6, which could cause the formation of granulated tissue, resulting in the formation of scars, violation of reparative regeneration and delayed healing of burn wounds. The content of proinflammatory cytokines in a group of animals with treatment is lower compared with the group with burns without treatment during the experiment time, which may indicate the expressed therapeutic effect of the extract of beans pods in alkaline burns of the esophagus.

Keywords: alkali burn esophagus, gystology, *Phaseolus vulgaris*.

Наукове видання



ВІСНИК

КИЇВСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОГО УНІВЕРСИТЕТУ ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

БІОЛОГІЯ

Випуск 1(77)

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. 11,04. Наклад 300. Зам. № 219-9258.
Гарнітура Arial. Папір офсетний. Друк офсетний. Вид. № Б 1.
Підписано до друку 27.03.19

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