

Подано експериментальні дані про особливості будови, розвитку і функціонування рослинних і тваринних організмів, флору і фауну України, одержаних науковцями НДІ фізіології імені академіка Богача та ННЦ "Інститут біології" та інших наукових установ. Викладено також нові дані про патофізіологічні закономірності й біохімічні механізми регуляції процесів на клітинному та органному рівнях після впливу різноманітних фізико-хімічних чинників.

Для викладачів, наукових співробітників, аспірантів і студентів.

Подано экспериментальные данные об особенностях строения, развития и функционирования растительных и животных организмов, полученных учеными НИИ физиологии имени академика Богача и УНЦ "Институт биологии" и других научных учреждений. Изложены также новые данные о патофизиологических закономерностях и биохимических механизмах регуляции процессов на клеточном и органном уровнях после воздействия различных физико-химических факторов.

Для преподавателей, научных сотрудников, аспирантов и студентов.

The experimental dates development and function of the plant and animal organisms of research institute and ESC "Institute of Biology". Results of newly pathophysiological aspects and biochemical mechanisms of cell and organism processes regulation under the influence of different factors are presented.

For scientists, professors, aspirants and student.

ВІДПОВІДАЛЬНИЙ РЕДАКТОР РЕДАКЦІЙНА КОЛЕГІЯ	Л.І. Остапченко, д-р біол. наук, проф. Є. О. Торгалло, канд. біол. наук (відп. секр.); С. Є. Вакал, асист. (техн. секр.); С. Сабо, д-р біол. наук, проф. (м. Ірвайн, США. Університет Каліфорнії); О. В. Жолос, д-р біол. наук, проф. (Королівський університет Белфаста, м. Белфаст, Великобританія); М. Шандор, д-р біол. наук, проф. (Західно-Угорський Університет, м. Сомбатгей, Угорщина); С. Юозас, д-р біол. наук, проф. (Інститут ботаніки, м. Вільнюс, Литва); Б. Каленгхем, проф. (м. Кембридж, Великобританія); В. О. Іваниця, д-р біол. наук, проф.; Т. В. Берегова, д-р біол. наук, проф.; Д. Н. Говорун, д-р біол. наук, проф.; Дж. Воллес, д-р біол. наук, проф. (Торонто, Онтаріо, Канада); І. Г. Ємельянов, д-р біол. наук, проф.; Е. М. Дзержинський, д-р біол. наук, проф.; І. Ю. Костіков, д-р біол. наук, проф.; О. Я. Складаров, д-р біол. наук, проф.; В. С. Мартинюк, д-р біол. наук, проф.; М. Ю. Макаручук, д-р біол. наук, проф.; В. П. Поліщук, д-р біол. наук, проф.; В. К. Рибальченко, д-р біол. наук, проф.; Н.Ю. Таран, д-р біол. наук, проф.; А. В. Сиволоб, д-р біол. наук, проф.; А. Г. Мойсеєнок, д-р біол. наук, проф., чл.-кор. НАН Білорусії
Адреса редколегії	03127, Київ-127, просп. акад. Глушкова, 2а, ННЦ "Інститут біології"; ☎ (38044) 521-35-98
Затверджено	Вченою радою ННЦ "Інститут біології" 25.06.15 (протокол № 13)
Атестовано	Вищою атестаційною комісією України. Постанова Президії ВАК України № 1-05/3 від 14.04.10
Зареєстровано	Міністерством юстиції України. Свідоцтво про державну реєстрацію КВ № 16053-4525 ПР від 09.11.09
Засновник та видавець	Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет". Свідоцтво внесено до Державного реєстру ДК № 1103 від 31.10.02
Адреса видавця	01601, Київ-601, 6-р Т.Шевченка, 14, кімн. 43 ☎ (38044) 239 31 72, 239 32 22; факс 239 31 28

ЗМІСТ

Маркевич А., Вірченко О., Фалалєєва Т., Непорада К. Вплив 2-(2-гідроксифенокси)-L- пролінату натрію на процеси деградації білків слизово-епітеліального бар'єру шлунка щурів за умов експериментального виразкоутворення	5
Макарчук М., Коробейнікова Л. Зв'язок психофізіологічного стану з вмістом гемоглобіну та сечовини у крові елітних спортсменів.....	8
Кузнєцова М., Галенова Т., Довгуша О., Савчук О. Вплив водного екстракту стручків квасолі (<i>PHASEOLUS VULGARIS</i>) на показники глюкози в крові та маси тіла діабетичних щурів	12
Бакалець Т., Цимбал Д., Кривдюк І., Мінченко Д. Експресія генів <i>NEK2</i> , <i>NEK4</i> , <i>EIF2AK1</i> , <i>PIM1</i> та <i>MEST</i> у клітинах гліоми лінії <i>U87</i> за умов дефіциту глютаміну і глюкози в залежності від функції сигнального ензиму <i>ERN1</i>	15
Расцька Я., Ішук Т., Галенова Т., Джус О., Остапченко Л. Динаміка вмісту молекул середньої маси в плазмі крові при експериментальній опіковій хворобі	19
Калмикова О., Джус О., Сенчило Н., Островська Г., Гарманчук Л. Морфо-функціональна характеристика трансформованих клітинних культур при дії активаторів та інгібіторів рецепторів з ферментативною активністю	22
Крохмаль І. Особливості онтогенезу видів роду <i>CAMPANULA</i> L., інтродукованих в степову зону України	26
Шестак А., Філімонова Н., Зима І. Вплив бінаурального ритму на активність головного мозку людини	40
Катрій Т., Вовк Т., Кравченко Н., Савчук О. Рівень IGG та АДФ-залежна агрегація тромбоцитів за системного червоного Вовчака та різних підтипів ішемічного інсульту	43
Фоменко І. Вплив нестероїдних протизапальних препаратів на показники систем NO та H ₂ S в слизовій оболонці товстої кишки.....	45
Нечипуренко О., Хархота М., Авдєєва Л. Ефективність використання каротинсинтезувальних штамів <i>B. subtilis</i> IMB B-7513 та <i>B. amyloliquefaciens</i> УКМ B-5113 для корекції експериментального дисбактеріозу у мишей	48
Кузнєцова М., Галенова Т., Довгуша О., Савчук О. Вплив водного екстракту стручків квасолі (<i>PHASEOLUS VULGARIS</i>) на показники глюкози в крові та маси тіла діабетичних щурів	52
Порубльова Л., Негруцький Б., Негеля А. Вивчення впливу метилування фактора елонгації трансляції EEF1A1 на білок-білкові взаємодії	55
Карастан О., Мулюкіна Н., Плачинда Г., Папіна О., Ковалева І. Оцінка генетичної подібності безнасінєвих сортів винограду ампелографічної колекції Навчально-наукового Центру "Інститут Виноградарства і Виноробства імені В.Є. Таїрова" та їх ймовірних батьківських форм	60
Стамбульська У. Вплив біхромату калію на фізіолого-біохімічні показники рослин гороху.....	64
Світін Р., Горобчишин В. Постциклічний паразитизм нематод роду <i>OSWALDOCRUZIA</i> TRAVASSOS, 1917 у деяких видів рептилій на території України	68
Свергун Н., Храновська Н., Скачкова О., Климяк Г., Іномістова М. Зміни експресії гена <i>GSTP1</i> в пухлині при прогнозуванні перебігу нейробластоми.....	70
Молчанюк Н. Світло- та електронно-мікроскопічне вивчення хоріокапілярів, пігментного епітелію і фоторецепторних клітин сітківки щурів в динаміці після введення різних доз метанолу	74
Ханнанова О., Смоляр Н. Вищі спорові рослини регіонального ландшафтного парку "ГАДЯЦЬКИЙ": видовий склад, еколого-ценотичні особливості та стан збереження	78

СОДЕРЖАНИЕ

Маркевич А., Вирченко А., Фалалеева Т., Непорада К. Влияние 2-(2-гидроксифенокси)-L-пролината натрия на процессы деградации белков слизисто-эпителиального барьера желудка крыс при экспериментальном язвообразовании	5
Макарчук Н., Коробейникова Л. Связь психофизиологического состояния с содержанием гемоглобина и мочевины в крови у элитных спортсменов	8
Кузнецова М., Галенова Т., Довгуша О., Савчук А. Влияние водного экстракта стручков фасоли (<i>PHASEOLUS VULGARIS</i>) на показатели глюкозы в крови и массы тела диабетических крыс	12
Бакалец Т., Цимбал Д., Кривдюк И., Минченко Д. Экспрессия генов <i>NEK2</i> , <i>NEK4</i> , <i>EIF2AK1</i> , <i>PIM1</i> и <i>MEST</i> в клетках глиомы линии <i>U87</i> при дефиците глутамина и глюкозы в зависимости от функции сигнального энзима <i>ERN1</i>	15
Раецкая Я., Ишук Т., Галенова Т., Джус Е., Остапченко Л. Динамика содержания молекул средней массы в плазме при экспериментальной ожоговой болезни	19
Калмыкова О., Джус Е., Сенчило Н., Островская Г., Гарманчук Л. Морфо-функциональная характеристика трансформированных клеточных культур при действии активаторов и ингибиторов рецепторов с ферментативной активностью	22
Крохмаль И. Особенности онтогенеза видов рода <i>CAMPANULA</i> L., интродуцированных в степную зону Украины	26
Шестак А., Филимонова Н., Зима И. Влияние бинаурального ритма на активность головного мозга человека	40
Катрий Т., Вовк Т., Кравченко Н., Савчук А. Уровень IgG и АДФ-зависимая агрегация тромбоцитов при системной красной Волчанке и различных подтипах ишемического инсульта	43
Фоменко И. Влияние нестероидных противовоспалительных препаратов на показатели систем NO и H ₂ S в слизистой оболочке толстой кишки	45
Нечипуренко А., Хархота М., Авдеева Л. Эффективность использования каротинсинтезирующих штаммов <i>B. subtilis</i> ИМБ В-7513 та <i>B. amyloliquefaciens</i> УКМ В-5113 для коррекции экспериментального дисбактериоза у мышей	48
Кузнецова М., Галенова Т., Довгуша О., Савчук А. Влияние водного экстракта стручков фасоли (<i>PHASEOLUS VULGARIS</i>) на показатели глюкозы в крови и массы тела диабетических крыс	52
Порублева Л., Негруцкий Б., Негеля А. Изучение влияния метилирования фактора элонгации трансляции EEF1A1 на белок-белковые взаимодействия	55
Карастан О., Мулюкина Н., Плачинда Г., Папина О. Оценка генетического сходства бессемянных сортов винограда коллекции учебно-исследовательского центра "Институт Виноградарства и Виноделия имени В.Е. Таирова" и их предполагаемых родительских форм	60
Стамбульская У. Влияние бихромата калия на физиолого-биохимические показатели растений гороха	64
Свитин Р., Горобчишин В. Постциклический паразитизм нематод рода <i>Oswaldocruzia</i> Travassos, 1917 у некоторых видов рептилий на территории Украины	68
Свергун Н., Храновская Н., Скачкова О., Климяк Г. Иномистова М. Изменения экспрессии гена <i>GSTP1</i> в опухоли при прогностировании течения нейробластомы	70
Молчанюк Н. Свето- и электронно-микроскопическое изучение хориокапилляров, пигментного эпителия и фоторецепторных клеток сетчатки крыс в динамике после введения различных доз метанола	74
Ханнанова О., Смоляр Н. Высшие споровые сосудистые растения регионального ландшафтного парка "ГАДЯЦКИЙ": видовой состав, эколого-ценотические особенности и состояние сохранности	78

CONTENTS

Markevich A., Virchenko O., Falalyeyeva T., Neporada K. Effect of sodium 2-(2-hydroxyphenoxy)acetyl-L-prolinate on the process of protein degradation in mucous epithelial barrier of rat stomach in the condition of experimental ulceration	5
Makarchyk M., Korobeinikova L. Relation of psychophysiological state with biochemical blood indices in elite athletes	8
Kyznetsova M., Halenova T., Dovgusha O., Savchuk O. Effect of an aqueous extract of PHASEOLUS VULGARIS pods on blood glucose and body weight in diabetic rats	12
Bakalets T., Tsymbal D., Kryvdiuk I., Minchenko D. Expression of <i>NEK2</i> , <i>NEK4</i> , <i>EIF2AK1</i> , <i>PIM1</i> and <i>MEST</i> genes in <i>U87</i> glioma cells upon glutamine and glucose deprivation depending on <i>ERN1</i> signaling enzyme function	15
Raetska Ya., Ischuk T., Galenova T., Dzhush O., Ostapchenko L. Dynamics of middle mass molecules in blood plasma after experimental modeling burn disease	19
Kalmukova O., Dzhush O., Senchylo N., Ostrovska G., Garmanchuk L. Morpho-funktional characteristics of transformed cell cultures under the action of activators and inhibitors with enzymatic activity	22
Krokhmal I. Features of ontogenesis of <i>CAMPANULA L. species</i> , that introduction in Ukraine steppe	26
Shestak A., Filimonova N., Zima I. Influence of binaural beats on human brain activity	40
Katriy T., Vovk T., Kravchenko N., Savchuk O. The level of IgG and ADP-inducible platelet aggregation in patients with systemic lupus erythematosus and different subtypes of ischemic stroke	43
Fomenko I. Effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs on indices of NO and H ₂ S systems in colonic mucosa	45
Nechypurenko O., Kharhota M., Avdeeva L. Effectivity of carotene-synthesizing strains <i>B. subtilis</i> IMV B-7513 and <i>B. amyloliquefaciens</i> UCM B-5113 for correction of experimental dysbacteriosis in mice	48
Kyznetsova M., Halenova T., Dovgusha O., Savchuk O. Effect of an aqueous extract of phaseolus vulgaris pods on blood glucose and body weight in diabetic rats	52
Porubleva L., Negrutskii B., Negelya A. Methylation of translation elongation factor EEF1A1 affects the protein-protein interactions	55
Karastan O., Mulyukina N., Plachinda G., Papina A. Assessment of genetic similarity of seedless grapes from collections <i>NSC "TAIROV INSTITUTE OF VITICULTURE AND WINEMAKING"</i> and their probable parental forms	60
Stambul'ska U. Effect of potassium dichromate on some physiological and biochemical parameters of pea plants	64
Svitin R., Gorobchishyn V. Postcycle parasitism of nematodes of the genus <i>OSWALDOCRUZIA</i> TRAVASSOS, 1917 parasitizing several species of snakes from the territory of Ukraine	68
Svergun N., Khranovskaya N., Skachkova O., Klimnyuk G., Inomistova M. Alterations of GSTP1 gene expression in tumor for neuroblastoma prognosis	70
Molchanyuk N. Light and electron microscopic study of choriocapillaries, pigment epithelium and photoreceptor cells in the retina of rats in dynamics after administration of different doses of methanol	74
Hananova O., Smolyar N. Higher dispute vascular plants regional landscape park " <i>HADIACH</i> ": species composition, ecological and coenotic features and conservation status	78

ВПЛИВ 2-(2-ГІДРОКСИФЕНОКСИ)АЦЕТИЛ)-L-ПРОЛІНАТУ НАТРІЮ НА ПРОЦЕСИ ДЕГРАДАЦІЇ БІЛКІВ СЛИЗОВО-ЕПІТЕЛІАЛЬНОГО БАР'ЄРУ ШЛУНКА ЩУРІВ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ВИРАЗКОУТВОРЕННЯ

В статті досліджено профілактичну та лікувальну дії 2-(2-гідроксифеноксид)ацетил)-L-пролінату натрію при стресовій, етаноловій, індометациновій та аспіриновій виразці на стан слизового бар'єру за вмістом оксипроліну, фукози та гексуронової кислоти.

Ключові слова: 2-(2-гідроксифеноксид)ацетил)-L-пролінат натрію, виразка, слизовий бар'єр шлунка.

Вступ. Слизово-бікарбонатний-фосфоліпідний бар'єр і поверхневі епітеліоцити становлять першу лінію захисту слизової оболонки шлунка (СОШ) [1, 2]. Основним активним компонентом слизу, що здійснює захисну функцію, є глікопротеїни муцину, вміст яких досягає 5% [3]. Полімери муцинів СОШ утворюються з геліформуючих муцинів MUC5AC (кардальний, фундальний і антральний відділи) і MUC6 (фундальний і антральний відділи), синтез яких кодується генами MUC [4]. Стабілізація гелю та підвищення його в'язкості обумовлена секрецією низькомолекулярних пептидів з родини трефойлових факторів [5]. Секретований епітеліоцитами бікарбонат затримується в слизі і ефективно нейтралізує дію гідрохлоридної кислоти на епітелій СОШ [6]. Поверхневі епітеліоцити є ключовими у підтриманні гомеостазу СОШ, завдяки здатності синтезувати слиз, бікарбонати, простагландини, як фактор активації секреції бікарбонатів, білки теплового шоку, які попереджують деградацію білків слизової, пептиди з родини трефойлових факторів і кателецидини, що відіграють роль у протидії бактеріальній колонізації [2]. Фосфоліпіди епітеліоцитів забезпечують гідрофобність цих клітин, а отже, відштовхування кислоти та водорозчинних ушкоджуючих агентів від поверхневого епітелію шлунка [7]. Цільні контакти між поверхневими епітеліоцитами запобігають зворотній дифузії гідрохлоридної кислоти та пепсину [8]. В нормі описані фактори захисту ефективно регулюють цілісність СОШ, проте вони не здатні протидіяти надмірному ульцерогенному стимулу, що призводить до пептичної виразки шлунка.

Ульцерогенні чинники руйнують слизово-бікарбонатний-фосфоліпідний бар'єр. Загальним явищем за умов виразки є протеоліз мукопротеїнів, а також порушення їх синтезу через руйнування мукоцитів [9, 10]. Специфічні механізми висвітлені для різних типів пептичної виразки. Так, нестероїдні протизапальні засоби інгібують синтез простагландинів, зокрема захисного простагландину E₂, які беруть участь у глікозилюванні протеїнів муцину, вивільненні мукопротеїнів з мукоцитів *in vitro* та синтезі бікарбонатів [11]. Стрес пов'язаний з порушенням генної експресії MUC5AC, а отже зменшенням утворення мукопротеїнів [12]. Тапака та співав. (2003) виявили, що глюкокортикоїди пригнічують експресію MUC5AC, що може бути механізмом уражувачої дії стресу на слизовий бар'єр [13]. Вітчизняними дослідниками показано зниження резистентності слизового бар'єра гастродуоденальної зони внаслідок посилення деградації сіалопротеїнів, колагенових білків, зниження продукції фукопротеїнів слизу за умов пептичної виразки [14]. У зв'язку з цим розробка підходів для зміцнення слизово-епітеліального бар'єру є надзвичайно актуальною в комплексній терапії пептичної виразки шлунка.

Нашими попередніми роботами показана антивиразкова активність 2-(2-гідроксифеноксид)ацетил)-L-пролі-

нату натрію [15]. Нами були показані антиоксидантні властивості сполуки [16, 17], проте не був з'ясований її вплив на слизово-епітеліальний бар'єр шлунка. Отже, метою роботи було дослідити профілактичну та лікувальну дію 2-(2-гідроксифеноксид)ацетил)-L-пролінату натрію при етаноловій, аспіриновій, стресовій та індометациновій виразці на стан слизового бар'єру за вмістом оксипроліну, фукози та гексуронової кислоти.

Об'єкт та методи досліджень. Дослідження проводили на 170 білих нелінійних лабораторних щурах. Всі роботи з тваринами проводились з дотриманням нормативів Конвенції з біоетики Ради Європи 1997 року, Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей, відповідно до Закону України від 21.02.2006 № 3447-IV "Про захист тварин від жорстокого поводження" та у відповідності з етичними нормами і правилами роботи з лабораторними тваринами.

Для вивчення профілактичної та лікувальної дії 2-(2-гідроксифеноксид)ацетил)-L-пролінату натрію на стан слизового бар'єру шлунка в кожній моделі виразки щури були поділені на 3 групи по 10 щурів в кожній: 1 група – інтактні тварини; 2 група – тварини, в яких моделювали експериментальні виразки та вводили фізіологічний розчин (2 мл/кг 0,9% NaCl); 3 група – тварини, в яких моделювали експериментальні виразки та вводили досліджувану сполуку (в дозі 1 мг/кг, розчинену в 0,9% NaCl з розрахунку 2 мл/кг). За умов вивчення профілактичних властивостей 2-(2-гідроксифеноксид)ацетил)-L-пролінату натрію внутрішньоочеревинні (в/о) ін'єкції фізіологічного розчину та досліджуваної сполуки здійснювали за 30 хв до ульцерогенного чинника. Лікувальний вплив визначали за умов 3-добового введення сполуки після моделювання виразок.

Ерозивно-виразкові ураження СОШ щурів викликали методом водно-імобілізаційного стресу за Такагі та співав. [18]. Етанолову виразку моделювали шляхом інтрагастрального введення 96⁰ етанолу (1 мл на щура) [19]. Індометацинові ураження викликали інтрагастральним введенням розчину індометацину (20 мг/кг) в об'ємі 2 мл/кг (розчин індометацину складався з 89,5% води, 10% етанолу та 0,5% карбоксиметилцелюлози) [20]. При дослідженні профілактичної дії сполуки через 6 годин після введення розчину індометацину щурам давали корм, а умертвіння здійснювали через 24 години. При вивченні лікувальних властивостей стан слизового бар'єру оцінювали через 3 доби після введення індометацину. При аспіриновій моделі виразково-ерозивні ураження СОШ щурів викликали за допомогою інтрагастрального введення аспірину (ацетилсаліцилова кислота) у дозі 100 мг/кг (ЗАТ "Технолог", Україна). Аспірин розчиняли в 0,2 н HCl (20 мг/0,5 мл) та вводили в об'ємі 2,5 мл/кг інтрагастрально [21]. Забір слизової шлунка здійснювали через 3 год після введення аспірину.

У гомогенаті слизової оболонки шлунка і пристінкового слизу шлунка визначали вміст вільних оксипроліну [22], фукози [23] і гексуронової кислоти [24] спектрофотометричним методом. Вміст оксипроліну визначали методом Тетянец С.С. [22], який заснований на реакції піролідин-2 карбонової кислоти, що утворюється при окисненні оксипроліну з парадиметиламінобензальдегідом. Концентрацію визначали за калібрувальним графіком і виражали в мкмоль/г. Фукозу визначали методом Dishe, Shettles [23]. Принцип методу полягає в тому, що фукоза при нагріванні з сірчаною кислотою з додаванням цистеїну утворює продукт, концентрація якого прямо пропорційна концентрації фукози. Для з'ясування помилки поправки на фарбування, яке може викликати різні сахарами, оптичну густину визначали при різних довжинах хвиль 396 нм і 430 нм. Розрахунок проводили щодо стандартного розчину фукози і виражали в мкмоль/г. Принцип методу визначення гексуронової кислоти полягає в тому, що гексуронової кислоти при нагріванні з сірчаною кислотою перетворюються на альдегід фурфуролу або його гомологи [24]. Отримані альдегіди конденсуються з ароматичними фенолами (карбазол), що і визначається фотометрично. Розрахунок проводили щодо стандартного розчину глюкуронової кислоти та виражали в мкмоль/г.

Всі кількісні та якісні показники, зареєстровані в журналі досліджень, підлягали статистичній обробці за допомогою пакету програм Statistica 8.0. Отримані результати досліджень перевіряли на нормальність розподілу за допомогою W тесту Шапіро-Вілкі. Оскільки дані були параметричні, то для їх порівняння використовували t-критерій Стюдента для незалежних вибірок, рівень значущості становив $p < 0,05$. Дані представляли у вигляді середнього значення (M) і помилки середнього (m).

Результати досліджень та їх обговорення. В результаті виразкоутворення, викликаного різними чинниками, в СОШ активувалися колагенолітичні і протеолітичні процеси. Це підтверджувалося зростанням через 3 год після водно-імобілізаційного стресу вмісту оксипроліну на 69,4% ($p < 0,001$), фукози – на 143,5% ($p < 0,001$) та гексуронової кислоти – на 80,9% ($p < 0,001$) порівняно з показниками інтактних щурів (табл. 1). Через 1 год після введення етанолу збільшення вмісту оксипроліну складало 61,9% ($p \leq 0,01$), фукози – 97,3% ($p \leq 0,001$), гексуронової кислоти – 83,3% ($p \leq 0,001$). Індометацин через 1 добу після введення та аспірин через 3 години після введення зумовлювали збільшення рівня оксипроліну на 57,8% ($p \leq 0,01$) і на 100,8% ($p \leq 0,001$), фукози – 336,5% ($p \leq 0,001$) і 137,4% ($p \leq 0,001$), гексуронової кислоти – 97,6% ($p \leq 0,001$) і 76,2% ($p \leq 0,01$) щодо інтактних тварин [14].

Таблиця 1. Вміст продуктів деградації пристінкового слизу за умов дії ульцерогенних чинників та профілактичного введення 2-(2-гідроксифенокс)ацетил-L-пролінат натрію (ГФП) ($M \pm m$, $n=10$ в кожній групі)

Ульцерогенний чинник	Групи щурів	Оксипролін	Фукоза	Гексуронової кислоти
Інтактний контроль		1,21 $\pm$ 0,04	1,15 $\pm$ 0,09	0,42 $\pm$ 0,01
Стрес	NaCl, 0,9%	2,05 $\pm$ 0,07***	2,80 $\pm$ 0,15***	0,76 $\pm$ 0,01***
	ГФП	1,58 $\pm$ 0,08*/###	2,21 $\pm$ 0,25***/#	0,51 $\pm$ 0,02*/#
Етанол	NaCl, 0,9%	1,96 $\pm$ 0,07**	2,27 $\pm$ 0,17***	0,77 $\pm$ 0,06***
	ГФП	1,62 $\pm$ 0,19**/#	1,64 $\pm$ 0,06*/#	0,65 $\pm$ 0,03**/#
Індометацин	NaCl, 0,9%	1,91 $\pm$ 0,05**	5,02 $\pm$ 0,05***	0,83 $\pm$ 0,05***
	ГФП	1,74 $\pm$ 0,03**/#	2,87 $\pm$ 0,11***/####	0,71 $\pm$ 0,02**/#
Аспірин	NaCl, 0,9%	2,43 $\pm$ 0,05***	2,73 $\pm$ 0,15***	0,74 $\pm$ 0,04**
	ГФП	1,59 $\pm$ 0,05*/####	1,47 $\pm$ 0,04*/###	0,53 $\pm$ 0,02*/###

Примітка: *, **, *** – $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ у порівнянні з інтактним контролем; #, ##, ### – $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ у порівнянні з групою щурів, яким на фоні ульцерогенного чинника вводили фізіологічний розчин.

2-(2-гідроксифенокс)ацетил-L-пролінат натрію за умов профілактичного введення до стресу значущо зменшував вміст оксипроліну в слизовому бар'єрі на 22,9% ($p < 0,01$), фукози – на 21,1% ($p < 0,05$), гексуронової кислоти – на 32,9% ($p < 0,05$) у порівнянні з групою щурів, яким вводили фізіологічний розчин. За умов етанолової виразки профілактичний ефект сполуки на рівень оксипроліну склав 17,3% ($p < 0,05$), на рівень фукози – 27,7% ($p < 0,05$), на рівень гексуронової кислоти – 15,6% ($p < 0,05$) щодо щурів, яким вводили фізіологічний розчин на тлі виразкоутворення. Введення 2-(2-гідроксифенокс)ацетил-L-пролінату натрію при індометацин- та аспірин-індукованому виразкоутворенні зменшувало вміст оксипроліну в гомогенаті СОШ на 8,9% ($p < 0,05$) та на 34,6% ($p < 0,001$), фукози – 42,8% ($p < 0,001$) та на 46,1% ($p < 0,01$), гексуронової кислоти – на 14,4% ($p < 0,05$) та на 28,4% ($p < 0,01$) у порівнянні з групою щурів, яким вводили фізіологічний розчин. Отримані дані підтверджують превентивний ефект 2-(2-гідроксифенокс)ацетил-L-пролінату натрію на слизово-епітеліальний бар'єр в шлунку за умов експериментальних виразок.

Через 3 доби після моделювання виразок активність процесів деградації захисних білків СОШ не зменшувалася. Нами встановлено, що за умов стресу показники вмісту оксипроліну перевищували рівень інтактних тва-

рин на 71,9% ($p < 0,01$), фукози – на 149,5% ($p < 0,001$), гексуронової кислоти – на 78,6% ($p < 0,01$). При введенні етанолу вміст оксипроліну був підвищений на 59,5% ($p < 0,01$), фукози – на 87,8% ($p < 0,001$), гексуронової кислоти – на 88,1% ($p < 0,01$) щодо інтактних тварин. Нестероїдні протизапальні засоби зумовлювали найбільш виражений руйнівний вплив на слизово-епітеліальний бар'єр. Індометацин збільшував вміст оксипроліну на 56,2% ($p < 0,001$), фукози – на 325,2% ($p < 0,001$), гексуронової кислоти – на 83,3% ($p < 0,01$) щодо інтактних тварин. При аспіриновій виразці показники оксипроліну були більшими від рівня інтактних тварин на 100,8% ($p < 0,001$), фукози – на 137,4% ($p < 0,01$), гексуронової кислоти – на 83,3% ($p < 0,05$).

3-добове введення 2-(2-гідроксифенокс)ацетил-L-пролінату натрію після стресу зменшувало вміст оксипроліну в СОШ на 24,8% ($p < 0,01$), фукози – на 28,9% ($p < 0,05$), гексуронової кислоти – на 14,3% ($p < 0,05$) у порівнянні з групою щурів, яким вводили фізіологічний розчин. При ураженнях, викликаних етанолом, сполука зменшувала вміст оксипроліну на 19,7% ($p < 0,01$), фукози – на 22,2% ($p < 0,05$), гексуронової кислоти – на 22,8% ($p < 0,05$) щодо щурів з виразкою, яким вводили 0,9% NaCl. За умов 3-добового введення досліджуваної субстанції після моделювання індометацинової виразки рівень фукози знижувався на 44,8% ($p < 0,01$), гексуро-

нових кислот – на 10,4% ($p<0,05$) у порівнянні зі щурами, яким на фоні ульцерогенного чинника вводили фізіологічний розчин. Проте терапевтичного ефекту сполуки на рівень оксипроліну в гомогенаті СОШ не було виявлено. При аспіриновій виразці вміст оксипроліну зни-

жувався на 34,5% ($p<0,01$), фукози – на 46,1% ($p<0,01$), гексуронової кислоти – на 27,3% ($p<0,01$). Таким чином, нами був виявлений терапевтичний вплив 3-добового введення 2-(2-гідроксифенокс)ацетил-L-пролінату натрію на слизово-епітеліальний бар'єр шлунка щурів.

Таблиця 2. Вміст продуктів деградації пристінкового слизу за умов дії ульцерогенних чинників та лікувального введення 2-(2-гідроксифенокс)ацетил-L-пролінату натрію (ГФП) ($M \pm m$, $n=10$ в кожній групі)

Ульцерогенний чинник	Групи щурів	Оксипроліни	Фукоза	Гексуронової кислоти
Інтактний контроль		1,21 $\pm$ 0,04	1,15 $\pm$ 0,09	0,42 $\pm$ 0,01
Стрес	NaCl, 0,9%	2,08 $\pm$ 0,07**	2,87 $\pm$ 0,11***	0,75 $\pm$ 0,01**
	ГФП	1,51 $\pm$ 0,04*###	2,04 $\pm$ 0,17**/#	0,48 $\pm$ 0,02*/#
Етанол	NaCl, 0,9%	1,93 $\pm$ 0,05**	2,16 $\pm$ 0,04***	0,79 $\pm$ 0,04**
	ГФП	1,55 $\pm$ 0,08**/###	1,68 $\pm$ 0,02*/#	0,61 $\pm$ 0,03*/#
Індометацин	NaCl, 0,9%	1,89 $\pm$ 0,03***	4,89 $\pm$ 0,04***	0,77 $\pm$ 0,03**
	ГФП	1,88 $\pm$ 0,03**	2,70 $\pm$ 0,05**/###	0,69 $\pm$ 0,01*/#
Аспірин	NaCl, 0,9%	2,43 $\pm$ 0,07***	2,73 $\pm$ 0,15**	0,77 $\pm$ 0,04*
	ГФП	1,59 $\pm$ 0,05*/###	1,47 $\pm$ 0,04*/###	0,56 $\pm$ 0,04*/###

Примітка: *, **, *** – $p<0,05$, $p<0,01$, $p<0,001$ у порівнянні з інтактним контролем; #, ##, ### – $p<0,05$, $p<0,01$, $p<0,001$ у порівнянні з групою щурів, яким на фоні ульцерогенного чинника вводили фізіологічний розчин.

Отримані результати свідчать, що досліджувана сполука ефективно запобігала деградації захисних білків слизу при різних моделях виразкоутворення. Це корелювало з захистом СОШ від уражень при профілактичному введенні сполуки та пришвидшенню їх гоєння при 3-добовому лікувальному введенні.

Висновок: Отримані результати свідчать, що 2-(2-гідроксифенокс)ацетил-L-пролінат натрію за умов різних ульцерогенних впливів (стрес, етанол, індометацин, аспірин) запобігав деградації колагенових та неколагенових протективних білків пристінкового слизу в шлунку щурів. Це і є одним з механізмів профілактичної та лікувальної дії сполуки на ерозивно-виразкові ураження шлунка.

Список використаних джерел

- Werther J. L. The gastric mucosal barrier / J. L. Werther // Mount Sinai Journal of Medicine. – 2000. – Vol.67, № 1. – P.41-53.
- Laine L. Gastric mucosal defense and cytoprotection: bench to bedside / L. Laine, K. Takeuchi, A. Tarnawski // Gastroenterology. – 2008. – Vol.135, № 1. – P.41-60.
- The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state in vivo / C. Atuma, V. Strugala, A. Allen [et al.] // American Journal of Physiology – Gastrointestinal and Liver Physiology. – 2001. – Vol.280, № 5. – P. 922-929.
- The adherent gastric mucous layer is composed of alternating layers of MUC5AC and MUC6 mucin proteins / S. B. Ho, K. Takamura, R. Anway [et al.] // Digestive Diseases and Science. – 2004. – Vol.49, № 10. – P.1598-1606.
- The human trefoil peptide, TFF1, is present in different molecular forms that are intimately associated with mucus in normal stomach / J. L. Newton, A. Allen, B. R. Westley [et al.] // Gut. – 2000. – Vol.46, № 3. – P.312-320.
- Allen A. Gastrointestinal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin / A. Allen, G. Flemstrom // American Journal of Physiology – Cell Physiology. – 2005. – Vol.288, № 1. – P.C1-19.
- Lichtenberger L. M. Gastrointestinal mucosal defense / L. M. Lichtenberger // Current opinion in gastroenterology. – 1999. – Vol.15, № 6. – P.463-472.
- Tarnawski A. Cellular and Molecular Mechanisms of Gastrointestinal Ulcer Healing / A. Tarnawski // Digestive Diseases and Sciences. – 2005. – Vol.50, № 1. – P.S24-S33.
- Fragmentation pattern of mucins in normal and diseased gastric mucosae: a glycoprotein fractionates with gastric mucins purified from mucosal scrapings of cancer and peptic ulcer patients / A. S. Mall, H. A. McLeod, R. Hickman [et al.] // Digestion. – 1999. – Vol.60, № 3. – P.216-226.
- Srikanta B. M. Alterations of matrix metalloproteinases, gastric mucin and prostaglandin E(2) levels by pectic polysaccharide of swallow root (Decalepis hamiltonii) during ulcer healing / B. M. Srikanta,

U. V. Sathisha, S. M. Dharmesh // Biochimie. – 2009. – Vol.92, № 2. – P.194-203.

11. Effects of PGE2 and of different synthetic PGE derivatives on the glycosylation of pig gastric mucins / M. L. Enss, H. K. Heim, S. Wagner [et al.] // Prostaglandins, Leukotrienes & Essential Fatty Acids. – 1998. – Vol.59, № 1. – P.49-54.

12. In vivo characterization of the molecular-genetic changes in gastric mucosa during the development of acute gastritis and stress ulceration / D. Choo, K. Khwaja, K. Nori [et al.] // The Journal of trauma. – 2002. – Vol.52, № 4. – P.720-725; discussion 725-726.

13. Tanaka T. Postnatal changes and effects of glucocorticoid on MUC5AC mRNA expression in the rat stomach / T. Tanaka, S. Tani // Biological and Pharmaceutical Bulletin. – 2003. – Vol.26, № 7. – P.927-930.

14. Скрипник І. М. Патогенетична роль зниження резистентності слизового бар'єра при коморбідному перебігу пептичної виразки дванадцятипалої кишки та ГЕРХ / І. М. Скрипник, Г. В. Осьодло // Гастроентерологія. – 2013. – Т.2, № 48.

15. Скринінг синтезованих низькомолекулярних органічних сполук щодо їх ефективності в профілактиці уражень слизової оболонки шлунка. / А. О. Маркевич, О. П. Гаділія, Т. М. Фалалєєва [та ін.] // Вісник проблем біології та медицини. – 2013. – Т.1(102), № 3. – С.116-121.

16. The influence of low molecular weight organic compounds on antioxidant defense system of the gastric mucosa under ethanol-induced gastric lesions in rats / O. Gadiliya, M. Timoshenko, K. Dvorschenko [et al.] // Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv. Series: Biology. – 2013. – Vol.65. – P.54-57.

17. Скринінг синтезованих низькомолекулярних органічних сполук щодо їх ефективності в лікуванні виразок на лабораторних тваринах / О. П. Гаділія, Л. І. Остапченко, А. О. Маркевич [та ін.] // Світ медицини та біології. – 2013. – № 3(39). – С.16-20.

18. Takagi K. Studies on the Drugs for Peptic Ulcer. A Reliable Method for Producing Stress Ulcer in Rats / K. Takagi, Y. Kasuya, K. Watanabe // Chemical and Pharmaceutical Bulletin (Tokyo). – 1964. – Vol.12. – P.465-472.

19. Effect of glyprolines PGP, GP, and PG on homeostasis of gastric mucosa in rats with experimental ethanol-induced gastric ulcers / T. M. Falalyeyeva, G. E. Samonina, T. V. Beregovaya [et al.] // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2010. – Vol.149, № 6. – P.699-701.

20. Comparison of Indomethacin, Diclofenac and Aspirin-Induced Gastric Damage according to Age in Rats / P. J. Seo, N. Kim, J. H. Kim [et al.] // Gut Liver. – 2012. – Vol.6, № 2. – P.210-217.

21. Effect of central administration of ondansetron, a 5-hydroxytryptamine-3 receptor antagonist on gastric and duodenal ulcers / S. T. Ramesh, M. Asad, S. S. Dhamanigi [et al.] // Fundamental & Clinical Pharmacology. – 2009. – Vol.23, № 3. – P.303-309.

22. Тетянець С. С. Метод определения свободного оксипролина в сыворотке крови / С. С. Тетянець // Лабораторное дело. – 1985. – № 1. – С.61-62.

23. Шараев П. Н. Метод определения фукозы, не связанной с белками / П. Н. Шараев, Н. С. Стрелков, Р. Р. Кильдиярова // Клиническая лабораторная диагностика. – 1997. – № 4. – С.17-18.

24. Шараев П. Н. Метод определения гликозаминогликанов в биологических жидкостях / П. Н. Шараев // Лабораторное дело. – 1987. – № 5. – С.530-532.

Надійшла до редколегії 19.05.15

А. Маркевич, асп., А. Вирченко, канд. биол. наук, Т. Фалалеева, д-р биол. наук

Киевский национальный университет им. Тараса Шевченко, Киев,

К. Непорада, д-р биол. наук

Высшее государственное учебное заведение Украины "Украинская медицинская стоматологическая академия", Полтава

ВЛИЯНИЕ 2 (2-ГИДРОКСИФЕНОКСИ)АЦЕТИЛ)-L-ПРОЛИНАТА НАТРИЯ НА ПРОЦЕССЫ ДЕГРАДАЦИИ БЕЛКОВ СЛИЗИСТО-ЭПИТЕЛИАЛЬНОГО БАРЬЕРА ЖЕЛУДКА КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ЯЗВООБРАЗОВАНИИ

В статье показано профилактическое и лечебное действие 2-(2-гидроксифенокси) ацетил)-L-пролината натрия при стрессовой, этаноловой, индометациновой и аспириновой язве на состояние слизистого барьера по содержанию оксипролина, фукозы и гексуроновых кислот.

Ключевые слова: 2-(2-гидроксифенокси) ацетил)-L-пролината натрия, язва, слизистый барьер желудка.

A. Markevich, PhD stud., O. Virchenko, PhD., T. Falalyeyeva, DSc

Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine,

K. Neporada, DSc.

Higher Medical Educational Institution of Ukraine "Ukrainian Medical Stomatological Academy", Poltava

EFFECT OF SODIUM 2-(2-HYDROXYPHENOXY) ACETYL)-L-PROLinate ON THE PROCESS OF PROTEIN DEGRADATION IN MUCOUS EPITHELIAL BARRIER OF RAT STOMACH IN THE CONDITION OF EXPERIMENTAL ULCERATION

The article show of the preventive and therapeutic action of sodium 2-(2-hydroxyphenoxy)acetyl)-L-prolinate on the gastric mucosal barrier state in the conditions of stress, ethanol, aspirin and indomethacin ulcer.

Key words: 2-(2-hydroxyphenoxy)acetyl)-L-prolinate, ulcer, gastric mucosal barrier.

УДК 796.072.2

М. Макарчук, д-р біол. наук,

Л. Коробейнікова, канд. біол. наук

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

ЗВ'ЯЗОК ПСИХОФІЗІОЛОГІЧНОГО СТАНУ З ВМІСТОМ ГЕМОГЛОБІНУ ТА СЕЧОВИНИ У КРОВІ ЕЛІТНИХ СПОРТСМЕНІВ

Вивчався зв'язок психофізіологічних функцій, вегетативної регуляції ритму серця із інформативними біохімічними показниками крові у елітних спортсменів. Використовувалися методики оцінки латентного періоду простої та складної зорово-моторної реакції, статистичного аналізу варіабельності ритму серця, вмісту гемоглобіну та рівня сечовини у крові.

Ключові слова: психофізіологічні стани, рівень гемоглобіну та сечовини у крові, варіабельність ритму серця, елітні спортсмени.

Вступ. Проблема корекції психофізіологічних станів у спортсменів, в умовах напруженої м'язової діяльності, вимагає виявлення механізмів вегетативного забезпечення функціонування фізіологічних функцій. Відомо, що під час напруженої м'язової діяльності зростає потреба у киснево-транспортній функції організму спортсмена. Одним із інформативних показників, що відображає рівень киснево-транспортної функції організму є гемоглобін, який, також, є основним білком еритроцитів у крові людини [1,2]. Саме концентрація гемоглобіну в крові – є вирішальним чинником, що впливає, з одного боку на функціональні можливості організму спортсмена при виконанні м'язової діяльності, а з другого – критерієм стомлення та механізмом відновлення після навантажень.

Між різними фізіологічними системами існує певний, іноді, опосередкований зв'язок. Основне завдання організму, в умовах екстремальної інтенсивної м'язової діяльності, є збереження гомеостазу. Тому, константи організму людини, що відображають рівень гомеостазу, в умовах напруженої м'язової діяльності, дають можливість здійснювати контроль за функціональним станом [3,4]. Поряд із показником гемоглобіну у крові, для контролю і корекції стану організму спортсмена, важливу інформативну значимість має концентрація сечовини в крові. Сечовина є продуктом розпаду амінокислот під час навантажень, що зв'язує токсичний аміак (NH₃). Тому зростання рівня концентрації сечовини з 3,5-6, 5 ммоль/л до 7-8 ммоль/л, а іноді і до 9 ммоль/л вказує на порушення роботи нирок та констатує недостатнє відновлення організму після тривалих інтенсивних навантажень [5,6]. Поряд із показниками, що відобража-

ють гомеостаз організму для корекції функціонального (психофізіологічного) стану використовуються показники, які є більш лабільними: показники варіабельності ритму серця та нейродинамічних функцій спортсменів.

Виходячи з вищезгаданого, актуальним питанням сучасної фізіології спорту є вивчення зв'язку між психофізіологічними станом та показниками крові – гемоглобіном і сечовиною, з метою оцінки та корекції станів, які виникають в умовах напруженої м'язової діяльності у елітних спортсменів. Дослідження проведені згідно Зведеного плану науково-дослідних робіт у сфері фізичної культури і спорту на 2011 – 2015 рр. теми 2.23 "Превентивні програми нейропсихофізіологічної підтримки спортсменів високої кваліфікації на заключних етапах багаторічної підготовки" (номер державної реєстрації 0109U007579).

Метою роботи було – вивчення зв'язку психофізіологічних станів, вегетативною регуляцією ритму серця із біохімічними показниками крові – гемоглобіном і сечовиною у елітних спортсменів.

Матеріали та методи дослідження. Для визначення зв'язку між психофізіологічним станом організму спортсмена, вегетативною регуляцією серцевого ритму та показниками крові: гемоглобіном і сечовиною, було обстежено 24 елітних спортсмена, членів національної збірної команди України з греко-римської боротьби, віком 20-28 років. Дослідження було проведено в динаміці циклу тренувальних навантажень, впродовж, 28 днів. Виміри проводилися в чотири етапи (за мезоциклами Платонова В.М. [7]). Всі спортсмени знаходилися в умовах підготовчого навчально-тренувального

збору перед відповідальними змаганнями року. Психофізіологічний стан оцінювався за допомогою комп'ютерної системи "Діагност-1". Визначались показники латентного періоду простої та складної зорово-моторної реакції, часу моторної реакції та часу центральної обробки інформації, коефіцієнту варіації латентного часу реакції. Вегетативна регуляція оцінювалася за показниками статистичного аналізу варіабельності ритму серця. Для цієї мети використовувався кардіомонітор "Polar RS800CX". Реєструвалися параметри вегетативної регуляції ритму серця та результати спектрального аналізу у спортсменів. Отримані дані було представлено у протоколі за допомогою статистичної програми "KubiosHRV". Випробування варіабельності ритму серця проводили лежачі 5 хвилин та за 5 хвилин після переходу людини у вертикальне положення. Загальний клінічний аналіз крові визначали з метою вивчення кількісного і якісного складу формених елементів крові (клітин крові). Визначали вміст гемоглобіну у крові, як відображення аеробних можливостей організму спортсмена. При посиленому розпаді тканинних білків, надмірному надхо-

дженні до організму амінокислот у печінку, в процесі зв'язування токсичного для організму людини аміаку, синтезується нетоксична азотовмісна речовина – сечовина, за концентрацією якої можливо оцінити функціональний стан спортсменів у процесі підготовки до змагань.

Забір крові здійснювався натще спеціалістами лабораторії "EUROLAB".

Статистичний аналіз здійснювався за допомогою програмного пакету Statgraphics 5.1 (Manugistics, Inc.). Через те, що обстежувана вибірка не підпадала під нормальний розподіл за показниками які вивчалися, було застосовано методи непараметричної статистики за допомогою критерію знакових рангових сум Вілкоксона. Для демонстрації розподілу даних використовували інтерквартильний розмах, вказуючи першу квартиль (25% перцентиль) та третю квартиль (75%).

Результати та їх обговорення. В табл. 1 представлено значення показників психофізіологічних функцій у елітних спортсменів в динаміці циклу тренувальних навантажень.

Таблиця 1. Показники психофізіологічних функцій у спортсменів в динаміці циклу тренувальних навантажень (n=24, медіана, верхній і нижній квартиль)

Показники	Етапи навантаження			
	1	2	3	4
Латентний період простої зорово-моторної реакції, (мс)	264, 12 235,54; 312,45	252,13 229,82; 286,44	245,43 218,31; 296,53	262,32 243,54; 281,42
Коефіцієнт варіації латентного періоду простої зорово-моторної реакції, %	22, 21 15,54; 28,73	33,11* 25,44; 37,63	28,32 24,43; 37,26	30,36 28,12; 38,54
Час моторної реакції, мс	174,15 99,64; 182,52	189,62 164,84; 228,46	176,23 168,41; 211,63	189,25 171,42; 236,87
Латентний період складної зорово-моторної реакції вибору двох із трьох подразників (мс)	448,41 341,74; 469,51	468,34 425,74; 498,32	432,87 398,55; 478,42	424,65 389,62; 494,52
Коефіцієнт варіації складної зорово-моторної реакції, %	15,74 11,62; 19,36	16,45 12,83; 21,83	22,67* 15,38; 26,34	18,43 14,43; 22,27
Час моторної реакції, мс	221,62 186,73; 246,56	214,37 186,73; 247,74	208,32 186,63; 225,43	224,43 203,73; 326,24
Час центральної обробки інформації, мс	226,38 198,43; 263,37	204,65 174,42; 232,72	211,54 173,62; 211,81	186,36* 116,63; 225,47

Примітка: * – $p < 0,05$ порівняно із першим етапом дослідження

Аналіз результатів дослідження психофізіологічних функцій встановив – наявність достовірної різниці між початком періоду навантаження та серединою за двома показниками: коефіцієнт варіації латентного періоду простої зорово-моторної реакції та коефіцієнт варіації латентного періоду складної зорово-моторної реакції (табл. 1). При цьому, достовірне підвищення показнику коефіцієнту варіації латентного періоду простої зорово-моторної реакції виявлено на другому етапі навантажень, а зростання коефіцієнту варіації латентного періоду складної зорово-моторної реакції спостерігається на третьому етапі (табл. 1).

Динаміка латентного періоду простої зорово-моторної реакції характеризується недостовірними змінами абсо-

лютих значень (табл. 1). У той же час, латентний період простої зорово-моторної реакції має тенденцію до зменшення абсолютних значень показнику (табл. 1). Це вказує на покращення психофізіологічних характеристик у спортсменів в динаміці тренувального збору.

Достовірно найменше значення показнику часу центральної затримки інформації, в кінці циклу навантажень, вказує, що покращення швидкості нейродинамічного реагування пов'язано із процесом впрацювання, що супроводжується удосконаленням системи аналізу і переробки інформації у елітних спортсменів.

В табл. 2 представлено значення інформативних показників крові у спортсменів у динаміці циклу тренувальних навантажень.

Таблиця 2. Біохімічні показники у елітних спортсменів в динаміці циклу тренувальних навантажень (n=24, медіана, верхній і нижній квартиль)

Показники	Етапи навантаження			
	1	2	3	4
Гемоглобін капілярної крові Hb, г/л	157,34 136,47; 173,35	155,67 142,45; 163,73	149,63* 140,56; 163,93	158,500** 149,50; 165,50
Сечовина капілярної крові, ммоль/л	5,76 3,42; 6,83	5,32 3,83; 6,38	7,26* 3,36; 8,39	5,50** 5,30; 6,48

Примітки:

1. * – $p < 0,05$ порівняно із першим етапом дослідження;

2. ** – $p < 0,05$ порівняно із попереднім етапом дослідження.

Аналіз результатів табл. 2 свідчить про наявність абсолютних значень рівня гемоглобіну та сечовини у крові спортсменів, в динаміці циклу навантажень, в діапазоні норми.

В той же час, виявляється, що на третьому етапі навантажень спостерігається достовірне зниження рівня гемоглобіну та одночасне зростання рівня сечовини у крові елітних спортсменів (табл. 2).

Зниження рівня концентрації гемоглобіну може бути пов'язано із порушенням структури еритроцитів крові, внаслідок поступового зростання інтенсивних фізичних навантажень. Підвищення абсолютного значення гемоглобіну в крові, на четвертому етапі, свідчить про високий рівень кваліфікації та тренуваності досліджуваних спортсменів і зменшення об'єму та інтенсивності фізичних навантажень (табл. 2).

Зростання рівня сечовини в крові відбувається разом із зменшенням рівня аміаку (NH₃). Цей процес відбувається внаслідок зниження імовірності інтоксикації аміаку (NH₃), як наслідок обміну амінокислот в умовах напруженої м'язової діяльності. Можна зазначити, що зростання концентрації сечовини на третьому етапі пов'язано із станом стомлення внаслідок доведення фізичних навантажень до максимального рівня. Подальше зниження концентрації сечовини у крові, на четвертому етапі, викликано врівноваженістю швидкості метаболізму білка у спортсменів на етапі поступового зниження інтенсивності та об'єму навантажень (табл. 2).

Значення показників вегетативної регуляції ритму серця при ортостатичній пробі у спортсменів, в динаміці тренувально-підготовчого збору, представлено в табл. 3.

Таблиця 3. Показники вегетативної регуляції ритму серця при ортостатичній пробі у елітних спортсменів в динаміці циклу тренувальних навантажень (n=24, медіана, верхній і нижній кuartиль)

Показники	Етапи навантаження			
	1	2	3	4
у горизонтальному положенні				
Середня тривалість RR- інтервалів, мс	879,80 688,33;1198,21	1005,81* 936,14;1105,45	933,92 865,71;1187,12	1008,43* 836,47;1284,34
Середнє квадратичне відхилення RR- інтервалів, мс	88,51 54,51; 124,52	73,22 48,51; 95,12	60,22* 39,26; 67,32	90,43** 73,27; 103,35
у вертикальному положенні				
Середня тривалість RR- інтервалів, мс	826,72 760,52; 989,32	828,85 727,98; 904,21	801,52 711,36; 899,86	837,51** 773,37; 932,23
Середнє квадратичне відхилення RR- інтервалів, мс	77,41 54,72; 107,54	70,55 53,23; 104,55	60,32* 51,32; 72,62	83,26*** 64,53; 92,46

Примітки:

1. * – $p < 0,05$ порівняно із першим етапом дослідження;
2. ** – $p < 0,05$ порівняно із попереднім етапом дослідження.

Аналіз результатів, представлених в табл. 3, свідчить про тенденцію до зниження абсолютних значень середньої тривалості та середнього квадратичного відхилення кардіоінтервалів на третьому етапі навантажень у елітних спортсменів, як у горизонтальному, так і у вертикальному положенні. Отриманий факт вказує на зростання рівня функціонування системи кровообігу та збільшення рівня напруження регуляції серцевого ритму.

На четвертому етапі навантажень спостерігається тенденція до зростання абсолютних значень середньої тривалості та середнього квадратичного відхилення кардіоінтервалів. Це вказує на наявність зменшення рівня напруження вегетативної регуляції серцевого ритму.

Значення показників спектрального аналізу серцевого ритму при ортостатичній пробі у елітних спортсменів, в динаміці циклу тренувальних навантажень, представлено в табл. 4.

Таблиця 4. Показники спектрального аналізу серцевого ритму при ортостатичній пробі у елітних спортсменів в динаміці циклу тренувальних навантажень (n=24, медіана, верхній і нижній кuartиль)

Показники	Етапи навантаження			
	1	2	3	4
у горизонтальному положенні				
Над низькочастотний спектр (VLF), мс ²	1442,93 842,52;3578,83	2853,52 863,73;3764,63	2173,52 7943,54;4543,65	854,72*** 573,54;2562,72
Низькочастотний спектр (LF), мс ²	1258,83 682,83;2728,71	1742,54 643,63;1843,42	1115,62 683,52;1845,63	385,51** 253,54;966,56
Високочастотний спектр (HF), мс ²	683,73 387,63;2836,63	953,62 363,76;2754,63	854,47 473,56;2674,76	934,51 534,68;1112,56
Відношення LF/HF	1,83 1,63; 5,63	1,53 0,83; 2,65	2,51 0,65; 4,67	1,36** 0,93; 1,86
у вертикальному положенні				
Над низькочастотний спектр (VLF), мс ²	3763,63 1847,72; 5832,54	2754,73 1376,62; 4874,54	1276,63 694,54; 1764,65	1274,83 663,72; 1673,73
Низькочастотний спектр (LF), мс ²	2376,83 1002,45; 3984,53	1754,84 875,53; 3764,53	1853,54 1165,59;2654,54	783,74 576,98; 2875,84
Високочастотний спектр (HF), мс ²	737,52 385,54; 1136,54	375,64 163,54; 749,43	397,84* 275,73; 874,65	969,36* 118,41; 286,71
Відношення LF/HF	4,84 2,63; 6,59	6,73 3,63; 9,87	8,84* 4,65; 11,63	2,98*** 4,12; 5,53

Примітки:

1. * – $p < 0,05$ порівняно із першим етапом дослідження;
2. ** – $p < 0,05$ порівняно із попереднім етапом дослідження.

Представлений аналіз табл. 4 свідчить про тенденцію до зниження абсолютних значень наднизькочастотного (VLF) та низькочастотного (LF) спектрів, у горизонтальному положенні, на четвертому етапі навантажень, у елітних спортсменів. Цей факт вказує на уповільнення впливу центрального контуру регуляції серцевого ритму та симпатичного тону вегетативної нервової системи на пазухо-предсердний вузол серця. Одночасно спостерігається зниження показнику вегетативного балансу (LF/HF), що свідчить, про переважання парасимпатичного впливу вегетативної нервової системи над симпатичним, на четвертому етапі циклу навантажень. У вертикальному положенні виявляється зниження показнику високочастотного спектру (HF) на третьому етапі навантажень, із одночасним зростанням абсолютного значення вегетативного балансу (LF/HF) (табл. 4). Отриманий результат вказує, що в умовах ортостатичної проби, на третьому етапі навантажень, виявляється уповільнення впливу парасимпатичного тону вегетативної нервової системи, що має прояв у зростанні ступеня напруження регуляції ритму серця. На четвертому етапі навантажень, у вертикальному положенні виявлено зростання показнику високочастотного спектру (HF), із одночасним зниженням показнику вегетативного балансу (LF/HF), порівняно із третім етапом навантажень (табл. 4). Цей факт відображає тенденцію до зростання активації парасимпатичного тону вегетативної нервової системи, внаслідок адаптаційних перебудов до максимальних фізичних навантажень. Для виявлення структури зв'язків між психофізіологічним станом, вегетативною регуляцією ритму серця та біохімічними показниками крові у елітних спортсменів було проведено аналіз парної кореляції (за Спірменом). Аналіз засвідчив наявність великої кількості достовірних кореляційних зв'язків між показниками, що досліджувалися. Виявлено наявність достовірних кореляційних зв'язків між показниками психофізіологічного стану та біохімічними показниками крові. Зворотний зв'язок, між латентним періодом складної зорово-моторної реакції та концентрацією гемоглобіну ($r=-0,51$), вказує на залежність прояву нейродинамічних функцій від накопичення киснем крові. Наявність достовірної кореляції між латентним періодом простої зорово-моторної реакції та сечовиною ($r=0,43$) вказує на зв'язок між рівнем прояву сенсомоторних реакцій та оптимальною концентрацією сечовини у крові. Достовірні значення коефіцієнтів кореляції, між сенсомоторними реакціями та показниками варіабельності ритму серця ($r=0,69$), відображають зв'язок психофізіологічного стану спортсменів із системою вегетативної регуляції кардіоінтервалів.

Показник концентрації гемоглобіну має достовірний кореляційний зв'язок із середньою тривалістю RR-інтервалів ($r=0,54$). Виявлений факт вказує на існуючий зв'язок між елементами кардіореспіраторної системи у елітних спортсменів.

Висновки. Проведений аналіз виявив, що покращення швидкості нейродинамічного реагування пов'язано із удосконаленням системи аналізу і переробки

інформації у елітних спортсменів в динаміці циклу тренувальних навантажень.

Одночасно, виявлено, що зниження рівня концентрації гемоглобіну може бути пов'язано із порушенням структури еритроцитів крові, внаслідок інтенсивних фізичних навантажень. Зростання концентрації сечовини на третьому "ударному" етапі циклу навантажень пов'язано із станом стомлення. Подальше зниження концентрації сечовини у крові, на четвертому "відновлюваному" етапі, викликано врівноваженістю швидкості метаболізму білка у спортсменів високої майстерності.

Аналіз змін показників варіабельності ритму серця свідчить про тенденцію до зниження абсолютних значень наднизькочастотного та низькочастотного спектрів коливань кардіоінтервалів на четвертому "відновлюваному" етапі навантажень у елітних спортсменів. Цей факт вказує на уповільнення впливу центрального контуру регуляції серцевого ритму та симпатичного тону вегетативної нервової системи на пазухо-предсердний вузол серця.

В умовах ортостатичної проби виявляється уповільнення впливу парасимпатичного тону вегетативної нервової системи, що спостерігається у зростанні ступеня напруження регуляції ритму серця та зростанні активації парасимпатичного тону вегетативної нервової системи, внаслідок адаптаційних перебудов в організмі спортсмена.

Проведений кореляційний аналіз засвідчив наявність достовірних кореляційних зв'язків між показниками психофізіологічного стану та біохімічними показниками крові, що говорить про залежність прояву нейродинамічних функцій від накопичення киснем крові та оптимальною концентрацією сечовини у крові елітних спортсменів.

Достовірні значення коефіцієнтів кореляції, між сенсомоторними реакціями та показниками варіабельності ритму серця ($r=0,69$), відображають зв'язок психофізіологічного стану спортсменів із системою вегетативної регуляції кардіоінтервалів.

Список використаних джерел

1. Дорофеева О. Є. Біохімічні показники крові спортсменів високого класу як критерії адаптації до значних фізичних навантажень / О. Є. Дорофеева // Фізіологічний журнал. – 2004. – №3. – С. 65-70.
2. Волков Н.И. Биохимия мышечной деятельности / Н.И. Волков, Э.Н. Несен, А.А. Осипенко, С.Н. Корсун. – К.: Олімпійська література., 2000.
3. Korobeynikov G. Age, psycho-emotional states and stress resistance in elite wrestlers International / G. Korobeynikov, L. Korobeinikova, V. Shatskiy // Journal of Wrestling. – 2013. – V.3 (1). – P. 58-70.
4. Медико-біологічне забезпечення підготовки спортсменів збірних команд України з олімпійських видів спорту: [навч. – метод. посіб.] / О. А. Шинкарук, О. М. Лисенко, Л. М. Гуніна, В. П. Карпенко та ін.; під заг. ред. О. А. Шинкарук. – К.: Олімпійська література, 2009. – 147 с.
5. Дубровский В.И. Спортивная медицина: Учеб. для студентов вузов, обучающихся по пед. Специальностям. – 1999. – С. 480.
6. Спортивная фармакология и диетология / сост. Т. В. Гишак [и др.]; ред. С. А. Олейник, Л. М. Гунина. – М. [и др.]: Диалектика, 2008. – 250 с.: табл. – Библиогр.: с. 245-249.
7. Платонов В.Н. Периодизация спортивной тренировки. Общая теория и её практическое применение / В.Н. Платонов. – К.: Олімпійська література, 2013.

Надійшла до редколегії 07.05.15

Н. Макачук, д-р биол. наук, Л. Коробейникова, канд. биол. наук
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

СВЯЗЬ ПСИХОФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ С СОДЕРЖАНИЕМ ГЕМОГЛОБИНА И МОЧЕВИНЫ В КРОВИ У ЭЛИТНЫХ СПОРТСМЕНОВ

Изучалась связь психофизиологических функций, вегетативной регуляции ритма сердца с информативными показателями крови: гемоглобином и мочевиной у элитных спортсменов. Использовались методики оценки латентного периода простой и сложной зрительно-моторной реакции, статистического анализа вариабельности ритма сердца, содержания гемоглобина и уровня мочевины в крови.

Ключевые слова: психофизиологическое состояние, концентрация гемоглобина и мочевины в крови, вариабельность ритма сердца, элитные спортсмены.

M. Makarchyk, DSc., L. Korobeinikova, PhD
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

RELATION OF PSYCHOPHYSIOLOGICAL STATE WITH BIOCHEMICAL BLOOD INDICES IN ELITE ATHLETES

The relationship between psycho-physiological states, autonomic regulation of heart rhythm with blood biochemical parameters in elite athletes were examined. Used methodology for assessing latent period simple and complex visual-motor reaction, a statistical analysis of heart rate variability, hemoglobin content and the level of urea in the blood.

Keywords: physiological conditions, hemoglobin and concentration, variability rhyme heart elite athletes.

UDK 615.322: 616.379-008.64

M. Kyznetsova, Phd stud., T. Halenova, Phd,
O. Dovgusha, stud, O. Savchuk, DSc
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv

EFFECT OF AN AQUEOUS EXTRACT OF *PHASEOLUS VULGARIS* PODS ON BLOOD GLUCOSE AND BODY WEIGHT IN DIABETIC RATS

This study was carried out to investigate the metabolic effects of the aqueous extract of pod of bean (*Phaseolus vulgaris*) in streptozotocin-induced diabetic rats (STZ). The oral administration of extract in dose of 200 mg/kg had the potential to decrease blood glucose and to prevent weight loss in STZ-induced diabetic rats.

Key words: extract of *Phaseolus vulgaris*, diabetes, blood glucose and body weight.

Introduction. Diabetes mellitus is the most frequent endocrine disease in developed countries. According to the World Health Organization the diabetic population is likely to increase up to 300 million or more by the year 2030 [1]. Diabetes mellitus is a chronic metabolic disease that arises from defects in the glucose homeostasis, which in turn are the result of an absolute insulin deficiency (type 1 diabetes) or an insulin resistance (type 2 diabetes). The disease often co-exists with hypertension and dyslipidemia with dangerous consequences to the cardiovascular system [2]. Currently available therapies for diabetes include insulin and various oral anti-diabetic agents such as sulfonylureas, biguanides and glinides. But despite a variety of therapeutic approaches, diabetes remains difficult for treatment. Moreover many of the anti-diabetic medications have a number of serious adverse effects [3]. That's why it is highly desirable to have additional agents to support therapeutic treatment or for the formulation of special food and beverages [4].

Medicinal plants with a long history of human use offer great potential for the discovery of new anti-diabetic drugs. Many reports and studies were published before the discovery of insulin and the plant was later a subject of intensive research [5]. Some botanical products have been shown to improve glucose metabolism and overall condition of individuals suffered from diabetes not only through hypoglycemic effects but also from improving lipid metabolism, antioxidant status and capillary function [6, 7]. Furthermore, a lot of plants (*Vaccinium myrtillus*, *Urtica dioica*, *Allium sativum*, et.) are known to have hypoglycemic and anti-diabetic use through insulin-like or insulin-potentiating action [8-10].

Phaseolus vulgaris commonly known as kidney bean is a food item of mass consumption in Ukraine and other European countries [11]. Bean possesses anti-diabetic activity and have been used in traditional medicine, especially for the secondary complications of diabetes including renal failure, retinopathy, neuropathy [12]. There are few of literature data concerning the mechanisms of bean antidiabetic properties. Along to published studies demonstrating the effectiveness of different *P. vulgaris* extracts under the hyperglycemic conditions [13, 14] also exist works which disprove this fact [15, 16]. There are evidences that different parts of *P. vulgaris* contain substances hypoglycemic mechanism of action of which differ (tryphonelin, arginine, lysine, tryptophan, asparagine, chromium, vitamin C, hemicellulose, soluble fibers) [17]. Numerous recent studies are focused on mechanisms of hypoglycemic influence of *P. vulgaris* seed extract. It has been shown that cotyledons of beans, but not other plant organs contain enzymes which inhibit enzymes involved in

carbohydrate metabolism and blood pressure maintaining (α -amylase/ α -glucosidase and angiotensin I-converting enzyme, respectively) [18].

Nevertheless effective popular remedy in the treatment of diabetes among population of Ukraine suffering from diabetes are pods of bean. However its hypoglycemic action rarely is mentioned in literature [19]. Therefore, the aim of this study was to investigate the ability of the aqueous extract of pod of bean (*Phaseolus vulgaris*) to affect on the levels of blood glucose and body weight in streptozotocin-induced diabetic rats.

Material and methods. 132 g of dried pods of *P. vulgaris* were poured into 1.0 liter of water at 100°C [20]. Mixture was held in a boiling water bath for 20 minutes, then allowed to cool for overnight and filtered. Obtained extract was centrifuged at 1000 g for 10 min, for removing plant debris, and the supernatant was dried using The Telstar LyoQuest freeze dryer (Spain). Dry extract (8 g) was stored at -20°C until the time of use. When needed, the residual extract was suspended in distilled water and used in the study.

Female white non-linear rats (100–120 g) were used in the study. Induction of experimental diabetes were conducted by an intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ, 45 mg/kg body weight) dissolved in a 0.01 M citrate buffer, pH 4.5. Control group received 0.01 M citrate buffer, pH 4.5. Two days after the single dose of STZ injection, animals with glycemic values in fasting > 25mmol/l were taken for the experiment [20].

The experiment was conducted for 28 days. A total of 24 rats were used in the study. During the experiment all animals were fed with standard commercial food and water available *ad libitum*. Rats were treated orally (by gavage) with distilled water or aqueous solution of *Phaseolus vulgaris* pod extract (200 mg/kg bwt/day) [20]. Animals were divided into four groups of 6 rats each: group 1, normal control (distilled water); group 2, normal + extract; group 3, diabetes control (distilled water); group 4, diabetes + extract. The levels of blood glucose and body weight were evaluated weekly after 4-hr of fasting. Blood samples were obtained through puncture of the tail vein and glucose levels were detected by "HLYUKOFOT II" (Ukraine) glucometer.

The data for groups were analyzed by statistical analysis of Microsoft Excel. Comparisons were performed using parametric Student's *t* test. Values were considered statistically significant when $P < 0.05$.

Results and discussion. Figure 1 demonstrates the change of blood glucose level when aqueous extract of *P. vulgaris* pod was orally administered to normal and STZ-induced diabetic animals. The blood glucose levels in healthy

rats, which administered plant extract throughout the experiment (group 2) were similar to their initial values and were not different statistically compared with group 1 of control rats.

At the beginning of the experiment the rate of glucose in diabetic animals exceeded relevant control values in

6 times (31.2 mmol/L vs 5.5 mmol/L). At the end of the first week of extract administration in both groups 3 and 4 the decrease of blood glucose levels according to initial values was observed (22 vs 31.2 and 15.8 vs 31.1).

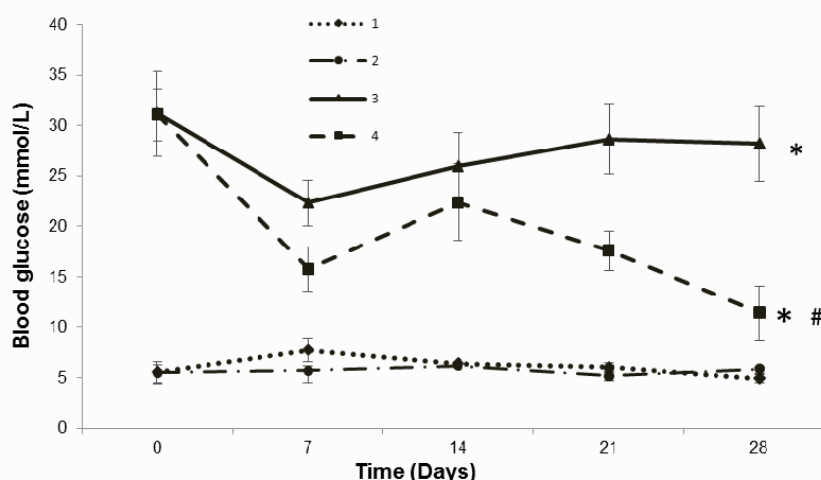


Fig. 1. Effect of the aqueous extract of *P. vulgaris* pod on blood glucose levels in diabetic rats during days of treatment ($M \pm m$; $n=6$)

Groups of animals: 1 – normal control (distilled water); 2 – normal + extract; 3 – diabetes control (distilled water); 4 – diabetes + extract

* Significantly different from the control: $*P < 0.05$.

Significantly different from the diabetes control: $\#P < 0.05$.

It may be due to activation of compensatory mechanisms of protection aimed at maintaining of glucose homeostasis in response to acute damaging of the pancreatic β -cells by STZ. During subsequent week (14 day) in both diabetic groups 3 and 4 glucose levels increased to 26 and 22 mmol/L respectively. During the later stages of the experiment (at 21 and 28 days) in the group of diabetic rats subjected to treatment with extract blood glucose levels were reduced by 38 and 59% comparatively with group 3 respectively. On the other hand in group 3 of control diabetic rats blood glucose level continued to grow. At 28 days in this group studied parameter was recovered to initial values, while in treated group of STZ-induced rats blood glucose level decreased to 63%.

The change of body weight was examined under the oral administration of bean extract to normal and STZ-induced diabetic rats (Figure 2). Throughout the study for normal

rats positive (2.1 g) weight gain per day was observed. At the end of the experiment in both groups of normal rats (1 and 2) body weight was increased by 31 and 52 % accordingly to initial values.

During the experiment in group of control diabetes sustained weight loss (to 17%) was observed at 28 day. While in the group of diabetic animals treated with plant extract weight increased by 11 % compared with values before treatment. Interestingly that during first week of the experiment in both groups 3 and 4 weight loss was observed (1.7 g per day and 1.4 g per day respectively). However, at the later stages of the study in group of untreated diabetic rats body weight continued to decrease and at 28 day of experiment the average index was 2.3 g per day. At the same time in group 4 positive weight gain was observed (1.7 g per day after third week of the experiment).

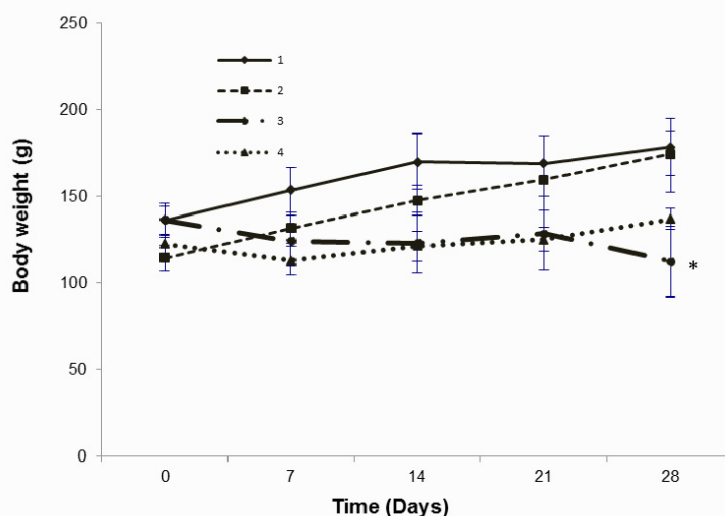


Fig. 2. Effect of the aqueous extract of *P. vulgaris* pod on body weight levels in diabetic rats during days of treatment ($M \pm m$; $n=6$)

Groups of animals: 1 – normal control (distilled water); 2 – normal + extract; 3 – diabetes control (distilled water); 4 – diabetes + extract

* Significantly different from the control: $*P < 0.05$.

Significantly different from the diabetes control: $\#P < 0.05$.

It is well known, that as beta-cell loss progresses, insulin is insufficiently presented to maintain glucose and lipid homeostasis. With further insulin deficiency, there is an increase in lipolysis of fat cells as well as protein breakdown state designed to provide alternative sources of fuel. These mechanisms along with the caloric loss from glycosuria result in the weight loss typically of the diabetic state [21]. Based on the results, it can be concluded that oral administration of STZ-diabetic rats with the aqueous extract of pod of *P. vulgaris* reduces blood glucose levels and implies that *P. vulgaris* may be a bioactive material to prevent metabolic diseases relating to blood glucose. A possible mechanism by which the studied extract exerts its activity on the diabetic rats might be due to ability stimulate β -cells to secrete more insulin or to increase insulin sensitivity in peripheral tissues [22]. But the exact mechanism of *P. vulgaris* influence remains not understandable, so further studies are recommended.

References

1. Kaštelan S. / Body Mass Index and Retinopathy in Type 1 Diabetic Patients // S. Kaštelan, J. Salopek Rabatić, M. Tomić [et al.] // International Journal of Endocrinology. – 2014. – Feb 18; 2014:387919. doi: 10.1155/2014/387919. Epub 2014 Feb 18. Available from: <http://www.google.com>
2. Crook E. D. Therapeutic controversies in hypertension management: Angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors or angiotensin receptor blockers in diabetic nephropathy? ACE inhibitors / E. D. Crook, S. Penumalee // Ethnicity & Disease. – 2004. – Vol. 14, N 4. – P.2-4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
3. Saxena A. Role of selected Indian plants in management of type 2 diabetes: a review / A. Saxena, N. K. Vikram // Journal of Alternative and Complementary Medicine. – 2004. – Vol. 10, N 2. – P.369-378. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
4. Mishra S. B. An analytical review of plants for antidiabetic activity with their phytoconstituent & mechanism of action: a review / S. B. Mishra, C. V. Rao, SK. Ojha [et al.] // International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. – 2010. – Vol. 1, N 1. – P.29-44. Available from: <https://www.google.com.ua>
5. Subbulakshmi G. Indigenous foods in the treatment of diabetes mellitus / G. Subbulakshmi, M. Naik // Bombay Hospital Research Journal. – 2001. – Vol. 43. – P.548-61. Available from: <http://www.google.com>
6. Frondoza C. G. An in vitro screening assay for inhibitors of proinflammatory mediators in herbal extracts using human synovial cell cultures / C. G. Frondoza, A. Sohrabi, A. Polotsky [et al.] // In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal. – 2004. – Vol. 40, N 3-4. – P. 95-101. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
7. Malviya N. Antidiabetic potential of medicinal plants / N. Malviya, S. Jain, S. Malviya // Acta Poloniae Pharmaceutica. – 2010. – Vol. 67, N 2. – P.113-118. Available from: <https://www.google.com.ua>
8. Helmstädter A. Antidiabetic drugs used in Europe prior to the discovery of insulin / A. Helmstädter // Pharmazie. – 2007. – Vol. 62. – P.717–720. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

9. Mentreddy S. R. Medicinal plants with hypoglycemic/anti-hyperglycemic properties: a review / S. R. Mentreddy, A. I. Mohamed, A. M. Rimando // Industrial crops and rural development : proceedings of 2005 annual meeting of the Association for the Advancement of Industrial Crops: International Conference on Industrial Crops and Rural Development, 17-21 September 2005, Murcia, Spain / (Journal). – 2005. – Vol. 20. – P.341-353. Available from: <https://www.google.com.ua>
10. Jarald E. Diabetes and herbal medicines / E. Jarald, S. B. Joshi, D. C. Jain // Iranian Journal of Pharmacology & Therapeutics. – 2008. – Vol. 7, N 1. – P.97-106. Available from: <https://www.google.com.ua>
11. Sathe S. K. Dry beans of *Phaseolus*. A review. Part 2. Chemical composition: carbohydrates, fiber, minerals, vitamins, and lipids / S. K. Sathe, S. S. Deshpande, D. K. Salunkhe // Critical Reviews in Food Science and Nutrition. – 1984. – Vol. 21, N 1. – P.41-93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
12. Savickiene N. Importance of biologically active components and plants in the prevention of complications of diabetes mellitus / N. Savickiene, A. Dagilyte, A. Lukosius [et al.] // Medicina (Kaunas). – 2002. – Vol. 38, N 10. – P.970-5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
13. Venkateswaran S. Antioxidant effect of *Phaseolus vulgaris* in streptozotocin-induced diabetic rats / S. Venkateswaran, L. Pari // Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition. – 2002. Vol. 11. P.206–209. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
14. Tan G. Y. Antidiabetic components in vegetables and legumes / G. Y. Tan, X. J. Li, H. Y. Zhang // Molecules. – 2008. – Vol. 13. – P.1189–1194. Available from: <http://www.mdpi.com>
15. Neef H. Hypoglycemic activity of selected European plants / H. Neef, P. Declercq, G. Laekeman // Phytotherapy Research. – 1995. – Vol. 9. P.45–48. Available from: <http://www.researchgate.net>
16. Cerovic A. The dry plant extract of common bean seed (*Phaseoli vulgaris* pericarpium) does not have an effect on postprandial glycemia in healthy human subject / A. Cerovic, I. Miletic, A. Konic-Ristic [et al.] // Bosnian Journal of Basic Medical Sciences. – 2006. – Vol. 6, N 3. – P.28–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
17. Casanas F. Chemical basis for the low sensory perception of the Ganxet bean (*Phaseolus vulgaris*) seed coat / F. Casanas, M. Pujola, L. Bosch [et al.] // Journal of the Science of Food and Agriculture. – 2002. – Vol. 82. – P.1282-1286. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com>
18. Moreno J. Characterization of alpha-Amylase Inhibitor, a Lectin-Like Protein in the Seeds of *Phaseolus vulgaris* / J. Moreno, T. Altabella, M. J. Chrispeels // Plant Physiology. – 1990. – Vol. 92. – P.703-709. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
19. Pari L. V. Effect of an aqueous extract of *Phaseolus vulgaris* on the properties of tail tendon collagen of rats with streptozotocin-induced diabetes / L. V. Pari, S. Venkateswaran // Brazilian Journal Of Medical and Biological Research. – 2003. – Vol. 36, N 7. – P.861-70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
20. Venkateswaran S. Antioxidant effect of *Phaseolus vulgaris* in streptozotocin-induced diabetic rats / S. Venkateswaran, L. Pari // Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition. – 2002. – Vol. 11, N 3. – P.206-209. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
21. Cooke D. W. Type 1 Diabetes Mellitus in Pediatrics / D. W. Cooke, L. Plotnick // Pediatrics in Review. – 2008. – Vol. 29, N 11. – P.374-84. Available from: <http://pedsinreview.aappublications.org>
22. Serrano J. Role of black bean *Phaseolus vulgaris* on the nutritional status of Guatemalan population / J. Serrano, I. Goni // Archivos Latinoamericanos de Nutricion. – 2004. – Vol. 54, N 1. – P.36-44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Надійшла до редколегії 12.05.15

М. Кузнєцова, асп., Т. Галенова, канд.біол. наук, О. Довгуша, студ., О. Савчук, д-р біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

ВПЛИВ ВОДНОГО ЕКСТРАКТУ СТРУЧКІВ КВАСОЛІ (*PHASEOLUS VULGARIS*) НА ПОКАЗНИКИ ГЛЮКОЗИ В КРОВІ ТА МАСИ ТІЛА ДІАБЕТИЧНИХ ЩУРІВ

Дане дослідження було проведено для вивчення ефектів водного екстракту стручків квасолі (*Phaseolus vulgaris*) на показники вуглеводного обміну у стрептозототин-індукованих діабетичних (STZ) щурів. Пероральне введення екстракту в дозі 200 мг/кг призвело до зменшення втрати ваги та рівня глюкози в крові в STZ-індукованих діабетичних щурах.

Ключові слова: екстракт *Phaseolus vulgaris*, цукровий діабет, рівень глюкози в крові, маса тіла.

М. Кузнєцова, асп., Т. Галенова, канд. биол. наук, О. Довгуша, студ., А. Савчук, д-р биол. наук
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

ВЛИЯНИЕ ВОДНОГО ЭКСТРАКТА СТРУЧКОВ ФАСОЛИ (*PHASEOLUS VULGARIS*) НА ПОКАЗАТЕЛИ ГЛЮКОЗЫ В КРОВИ И МАССЫ ТЕЛА ДИАБЕТИЧЕСКИХ КРЫС

Данное исследование было проведено для изучения эффектов водного экстракта стручков фасоли (*Phaseolus vulgaris*) на показатели углеводного обмена у стрептозототин-индуцированных диабетических (STZ) крыс. Пероральное введение экстракта в дозе 200 мг/кг приводило к уменьшению потери веса и уровня глюкозы в крови в STZ-индуцированных диабетических крысах.

Ключевые слова: экстракт *Phaseolus vulgaris*, сахарный диабет, уровень глюкозы в крови, масса тела.

УДК 577.112.7

Т. Бакалець, асп., Д. Цимбал, пров. інж.,
І. Кривдюк, асп., Д. Мінченко, канд. мед. наук
Інститут біохімії імені О.В. Палладіна, Київ

ЕКСПРЕСІЯ ГЕНІВ *NEK2*, *NEK4*, *EIF2AK1*, *PIM1* ТА *MEST* У КЛІТИНАХ ГЛІОМИ ЛІНІЇ U87 ЗА УМОВ ДЕФІЦИТУ ГЛУТАМІНУ І ГЛЮКОЗИ В ЗАЛЕЖНОСТІ ВІД ФУНКЦІЇ СИГНАЛЬНОГО ЕНЗИМУ ERN1

В статті було розглянуто експресію генів, що кодують протеїнкінази NEK2, NEK4, EIF2AK1 і PIM1 та фактор MEST, залучених до регуляції процесів поділу клітин та їх проліферації, у клітинах гліоми лінії U87 з повним пригніченням функції ERN1.

Ключові слова: експресія генів, протеїнкінази, клітини гліоми, дефіцит глюкози і glutаміну, ERN1.

Вступ. Важливим фактором росту різних злоякісних пухлин, в тому числі гліом, є дефіцит поживних речовин, а це є вагомим фактором в індукції стресу ендоплазматичного ретикулу та експресії великої групи генів, зокрема про-проліферативних генів [1 – 4]. Ендоплазматичний ретикулум є надзвичайно чутливою до змін гомеостазу внутрішньоклітинною структурою, що проводить дуже точний контроль якості протеїнів, які проходять тут процес згортання і дозрівання перед переходом їх до апарату Гольджі, причому всі не згорнуті чи неправильно згорнуті протеїни затримуються і обов'язково знищуються. А тому реакція клітин на не згорнуті в ендоплазматичному ретикулумі протеїни є необхідною для збереження його функціональної цілісності і називається стресом ендоплазматичного ретикулу, який опосередковується трьома сенсорно-сигнальними системами, локалізованими в ендоплазматичному ретикулумі: ERN1/IRE1 (Endoplasmic Reticulum to Nuclei Signaling 1/Inositol Requiring Enzyme-1), PERK (PRK-like Endoplasmic Reticulum Kinase) та ATF6 (Activating Transcription Factor 6), але саме ERN1 (сигналювання від ендоплазматичного ретикулу до ядра-1) є головною сенсорно-сигнальною системою цього стресу [5 – 8]. За умов активації стресу ендоплазматичного ретикулу блокується синтез протеїнів і припиняється вхід до ендоплазматичного ретикулу нових протеїнів, що синтезуються, а це сприяє не лише фолдингу протеїнів, які уже є в ендоплазматичному ретикулумі, а і їх деградації [9 – 12].

Сенсорно-сигнальний ензим ERN1 є біфункціональним, оскільки має два різних каталітичних домени для серин/треонінової кінази та для ендорибонуклеази, які опосередковують залежне від ERN1 сигналювання. Відомо, що асоційована з ERN1 кіназна активність аутофосфорилує цей ензим і що це фосфорилування є необхідним моментом його димеризації та активації ендорибонуклеази ERN1. Ендорибонуклеаза ERN1 є відповідальною за деградацію певних мРНК та ініціацію альтернативного сплайсингу пре-XBP1 (X-box binding protein 1) мРНК [10, 11]. Сплайс-варіант мРНК XBP1 кодує синтез транскрипційного фактора, що контролює експресію сотень генів, які мають відношення до стресу ендоплазматичного ретикулу [10, 11], зокрема до регуляції процесів проліферації та смерті клітин [12, 13].

Сигнальний шлях ERN1 стресу ендоплазматичного ретикулу тісно пов'язаний з процесами проліферації і росту злоякісних пухлин, що було продемонстровано в досліджах з повною блокадою функції цього сигнального шляху у клітинах гліоми та аденокарциноми легень, оскільки виключення функції ERN1 призводить до пригнічення росту пухлин із цих клітин [9, 13, 14]. Відомо, що гліоми є надзвичайно агресивними пухлинами з вираженим ангіогенезом та посиленою інвазією клітин у нормальну паренхіму головного мозку і що чинники, які

імітують ефекти ішемії, є асоційованими з ростом гліом і сприяють виживанню пухлинних клітин, а також посилюють їх агресивність [9]. Детальне вивчення механізмів залежності пухлинних клітин від дефіциту поживних речовин, зокрема глюкози та glutаміну, є необхідною умовою для розробки нових терапевтичних стратегій сенсibiliзації клітин та пригнічення росту пухлин шляхом блокади механізмів їх проліферації та виживання.

Протеїнкінази родини NEK (NIMA (never in mitosis gene A)-related kinases (NEK2, NEK4 та PIM1), а також протеїнкіназа EIF2AK1 (eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 1) та фактор MEST (mesoderm specific transcript) задіяні у регуляції клітинного циклу та проліферації пухлинних клітин і зміни в рівнях їх експресії корелюють з посиленням ростом злоякісних пухлин [15 – 18], але залежність цих протеїнкіназ від стресу ендоплазматичного ретикулу та молекулярні механізми регуляції їх експресії вивчені ще недостатньо. Відомо, що протеїнкінази NEK2 та NEK4 відіграють важливу роль в регуляції мітозу шляхом фосфорилування низки протеїнів, причому транскрипція NEK2 репресується пухлинним супресором TP53 [15]. Протеїнкіназа EIF2AK1 приймає участь у регуляції синтезу протеїнів шляхом фосфорилування фактора ініціації трансляції EIF2S1, що виключає трансляцію за умов стресу ендоплазматичного ретикулу [17]. Онкогенний фактор PIM1 є також протеїнкіназою, що взаємодіє з NIMA і посилює процеси проліферації, причому рівень її експресії підвищений за лейкемії [16], а фактор MEST, навпаки, є зниженим у деяких типах злоякісних пухлин [18]. В той же час, функціональне значення, як і механізм їх дії, може бути різним у різних злоякісних пухлинах, що вимагає подальшого вивчення ролі цих протеїнкіназ та фактора MEST у клітинах гліоми в залежності від ERN1 сигнального шляху та дефіциту поживних речовин.

Метою даної роботи було оцінити експресію генів, що кодують протеїнкінази *NEK2*, *NEK4*, *EIF2AK1* і *PIM1* та фактор *MEST*, залучених до регуляції процесів поділу клітин та їх проліферації, у клітинах гліоми лінії U87 з повним (як кінази, так і ендорибонуклеази) пригніченням функції ERN1 для визначення його ролі в механізмах регуляції цих генів за умов дефіциту глюкози та glutаміну.

Матеріали та методи. Клітини гліоми лінії U87 були отримані із "ATCC" (США) і росли у середовищі DMEM (Dulbecco's modified Eagle's minimum essential medium); "Gibco, Invitrogen" (США) з високою концентрацією глюкози (4.5 г/л), що містило додатково 2 ммоль/л glutаміну, 10% ембріональної сироватки телят ("Equitech-Bio, Inc.", США), пеніцилін (100 одиниць/мл; "Gibco") та стрептоміцин (0.1 мг/мл; "Gibco") при 37°C в інкубаторі з 5% CO₂. У цій роботі були використані дві сублінії цих клітин гліоми: 1) контрольні клітини (вектор), що були стабільно трансфіковані вектором

pcDNA3.1, та 2) клітини (dnERN1) з повним пригніченням функції сенсорно-сигнального ензиму ERN1 домінант-негативною конструкцією dnERN1, що не мала кіназного та ендорибонуклеазного доменів ERN1. Пригнічення функції ензиму ERN1 було оцінено раніше по рівню фосфорилювання ERN1 та утворенню альтернативного сплайс-варіанту XBP1 за умов індукованого тунікаміцином (10 мкг/мл протягом 2 годин) стресу ендоплазматичного ретикулулу [19]. При дослідженні впливу дефіциту глюкози та глутаміну клітини промивали, додавали середовище DMEM ("Gibco") без глюкози або без глутаміну і витримували протягом 16 годин.

РНК із клітин гліоми виділяли як описано раніше [19, 20]. Осад РНК промивали 75 % етанолом, розчиняли у воді, вільній від рибонуклеаз, переосажували етанолом, знову розчиняли у воді і використовували для синтезу комплементарної ДНК. Синтез кДНК проводили за допомогою QuaniTect Reverse Transcription Kit ("QIAGEN", Німеччина) згідно протоколу виробника.

Рівень експресії генів *NEK2*, *NEK4*, *EIF2AK1*, *PIM1* та *MEST* у клітинах гліоми визначали методом кількісної полімеразної ланцюгової реакції використовуючи "Mx 3000P QPCR" ("Stratagene", La Jolla, CA, США) та SYBRGreen Mix ("AB gene, Thermo Fisher Scientific", Epsom, Surrey, UK). Для всіх досліджених генів ампліфікацію проводили протягом 40 циклів за таких температурних умов циклу: 95°C – 30 сек., 55°C -30 сек. та 72°C – 30 сек. Для ампліфікації кДНК NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 2 (*NEK2*) були використані такі праймери: прямий (5'– ACCGTATTGCATCGGGATCT –3' та зворотний (5'– AGCAGCCCAATGACCAGATA –3'). Нуклеотидні послідовності цих праймерів відповідають послідовності 557 – 576 та 764 – 745 кДНК *NEK2* людини (GenBank номер NM_002497). Розмір ампліфікованого фрагмента 208 п.н.з. Ампліфікацію кДНК *NEK4* (NIMA-related kinase 4), відомої також як *STK2* (serine/threonine protein kinase 2), проводили за допомогою прямого (5'– ACATGGCTAGCACCCCTCATT –3') та зворотного (5'– TGGGCTGTAATCTCTTGCCA –3') праймерів, які відповідають послідовності 685 – 704 та 899 – 880 кДНК *NEK4* людини (GenBank номер NM_003157). Розмір ампліфікованого фрагмента 215 п.н.з. Для ампліфікації кДНК *PIM1* (*pim-1* oncogene), відомого також як *PIN1/protein* (peptidyl-prolyl cis-trans isomerase) NIMA-interacting 1 або serine/threonine-protein kinase *PIM1*, були використані такі праймери: прямий – 5'– CCGAGTGTATAGCCCTCCAG –3' та зворотний – 5'– GGGCCAAGCACCATCTAATG –3'. Нуклеотидні послідовності цих праймерів відповідають послідовності 1042-1061 та 1247 – 1228 кДНК *PIM1* людини (GenBank номер NM_002648). Розмір ампліфікованого фрагмента 206 п.н.з. Ампліфікацію кДНК *EIF2AK1* (eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 1), відомої також як *HRI* (heme-regulated initiation factor 2-alpha kinase), проводили за допомогою прямого (5'– AGACAGAGGCACAGTACCAC –3') та зворотного (5'– TTAATTGCTGATCAGGGCCA –3') праймерів, які відповідають послідовності 1258 – 1277 та 1518 – 1499 кДНК *EIF2AK1* людини (GenBank номер NM_014413). Розмір ампліфікованого фрагмента 261 п.н.з. Для ампліфікації кДНК *MEST* (mesoderm specific transcript), відомого також як *PEG1* (paternally-expressed gene 1 protein), були

використані такі праймери: прямий (5'– TTGGCTTCAGTGACAAACCG –3' та зворотний (5'– TGACAGCACACCTCCATCTT –3'). Нуклеотидні послідовності цих праймерів відповідають послідовності 576 – 595 та 859 – 840 кДНК *MEST* людини (GenBank номер NM_002402). Розмір ампліфікованого фрагмента 284 п.н.з. Ампліфікацію кДНК бета-актину (*ACTB*) проводили за допомогою прямого – 5'– GGACTTCGAGCAAGAGATGG –3' та зворотного – 5'– AGCACTGTGTGGCGTACAG –3' праймерів. Нуклеотидні послідовності цих праймерів відповідають послідовності 747 – 766 та 980 – 961 кДНК *ACTB* людини (GenBank номер NM_001101). Розмір ампліфікованого фрагмента 234 п.н.з. Селекцію праймерів проводили у програмі "Primer3web", version 4.0.0 (<http://primer3.ut.ee/>). По рівню експресії гена бета-актину оцінювали рівень експресії мРНК досліджуваних генів. Праймери були отримані з компанії "Sigma-Aldrich" (США).

Специфічність отриманих продуктів полімеразної ланцюгової реакції перевіряли по кривим плавлення, електрофорезом в агарозному гелі, а для *NEK2* та *EIF2AK1* також і секвенуванням. Аналіз результатів дослідження експресії генів *NEK2*, *NEK4*, *EIF2AK1*, *PIM1* та *MEST* виконували за допомогою спеціальної комп'ютерної програми "Differential expression calculator" а статистичний аналіз з використанням *t*-тесту однієї проби (*one sample t test*). Значення експресії генів *NEK2*, *NEK4*, *EIF2AK1*, *PIM1* та *MEST* нормалізували по рівню експресії гена бета-актину і представляли у відсотках від контрольних клітин (вектор), прийнятого за 100 %, але ефект дефіциту глюкози та глутаміну у клітинах з пригніченим ERN1 порівнювали з клітинами (dnERN1), що росли за присутності глюкози та глутаміну. Представлені середні значення $\pm m$ чотирьох експериментів.

Результати дослідження та їх обговорення. Як видно із даних, приведених у табл. 1 рівень експресії генів *NEK2* та *NEK4* за умов дефіциту глутаміну у середовищі суттєво не змінюється у клітинах гліоми лінії U87 з функціонально активним сенсорно-сигнальним ензимом ERN1 (контрольні клітини (вектор)). У той же час, у клітинах гліоми з пригніченою активністю кінази та ендорибонуклеази ERN1 (клітини dnERN1) спостерігається зниження рівня експресії лише гена *NEK2* за цих умов, причому майже вдвічі ($p < 0,05$) у порівнянні з клітинами, трансфікованими dnERN1 (табл. 2). Більше того, пригнічення ензиматичних активностей сенсорно-сигнального ензиму ERN1 призводить до зниження рівня експресії генів *NEK2* та *NEK4* у клітинах гліоми лінії U87 у порівнянні з контрольними клітинами (вектор), трансфікованими вектором pcDNA3.1 (-33 та -35 %, відповідно; $p < 0,05$ для обох генів) за нормальних умов інкубації (табл. 1). Встановлено також, що експресія генів *NEK2* та *NEK4* є чутливою до дефіциту глюкози, причому в обох типах клітин гліоми. Так, за умов дефіциту глюкози виявлено зниження рівня експресії генів *NEK2* та *NEK4* на 30 та 25 %, відповідно, ($p < 0,05$ для обох генів) у контрольних клітинах гліоми (вектор), але у клітинах з пригніченою функцією сигнального ензиму ERN1 (клітини dnERN1) ефект дефіциту глюкози суттєво посилюється, оскільки рівень експресії гена *NEK2* за цих умов зменшується на 52 % ($p < 0,05$), а гена *NEK4* на 41 % ($p < 0,05$) (табл. 1 і 2).

Таблиця 1. Рівень експресії генів *NEK2*, *NEK4*, *PIM1*, *EIF2AK1* та *MEST* у клітинах гліоми лінії U87, трансфікованих вектором pCDNA3.1 (Вектор) за даними кількісної полімеразної ланцюгової реакції: вплив дефіциту глутаміну та глюкози. Рівень експресії цих мРНК нормалізували за рівнем експресії гена бета-актину і представляли у відсотках від контролю (контрольні клітини з вектором), прийнятого за 100 %; $n = 4$; * – $p < 0,05$ при порівнянні з контролем

№ п/п	Ген	Контроль (вектор)	Дефіцит глутаміну	Контроль (вектор)	Дефіцит глюкози	Контроль (вектор)	Пригнічення ERN1 (dnERN1)
1	<i>NEK2</i>	100	104 ± 4,92	100	70 ± 4,36 *	100	67 ± 3,75 *
2	<i>NEK4</i>	100	110 ± 5,08	100	75 ± 3,84 *	100	65 ± 3,5 *
3	<i>PIM1</i>	100	96 ± 5,02	100	76 ± 4,14 *	100	71 ± 3,88 *
4	<i>EIF2AK1</i>	100	120 ± 6,24 *	100	101 ± 3,97	100	49 ± 3,92 *
5	<i>MEST</i>	100	27 ± 2,02 *	100	110 ± 5,31	100	832 ± 39,6 *

Таблиця 2. Рівень експресії генів *NEK2*, *NEK4*, *PIM1*, *EIF2AK1* та *MEST* у клітинах гліоми лінії U87, стабільно трансфікованих домінант-негативною конструкцією ензиму ERN1 (dnERN1), за даними кількісної полімеразної ланцюгової реакції: вплив дефіциту глутаміну та глюкози. Рівень експресії цих мРНК нормалізували за рівнем експресії гена бета-актину і представляли у відсотках від контролю (контрольні клітини з dnERN1), прийнятого за 100 %; $n = 4$; * – $p < 0,05$ при порівнянні з контролем

№ п/п	Ген	Контроль (dnERN1)	Дефіцит глутаміну	Контроль (dnERN1)	Дефіцит глюкози
1	<i>NEK2</i>	100	52 ± 4,75 *	100	48 ± 4,29 *
2	<i>NEK4</i>	100	99 ± 4,74	100	60 ± 5,12 *
3	<i>PIM1</i>	100	86 ± 5,06 *	100	77 ± 4,54 *
4	<i>EIF2AK1</i>	100	192 ± 9,48 *	100	222 ± 13,4 *
5	<i>MEST</i>	100	65 ± 3,26 *	100	63 ± 3,62 *

Із даних, приведених у табл. 1 і 2 також видно, що рівень експресії гена *PIM1* за умов дефіциту глутаміну у середовищі суттєво не змінюється у контрольних клітинах (вектор), але у клітинах гліоми з пригніченою активністю кінази та ендорібонуклеази ERN1 за цих умов виявляється зниження рівня експресії гена *PIM1* на 14 % ($p < 0,05$) у порівнянні з клітинами (dnERN1). У той же час, рівень експресії гена *EIF2AK1* за умов дефіциту глутаміну збільшується у контрольних клітинах (вектор) на 20 % ($p < 0,05$), а у клітинах (dnERN1) на 92 % ($p < 0,05$), що свідчить про підвищену чутливість експресії гена *EIF2AK1* до дефіциту глутаміну за умов пригнічення ERN1 (табл. 1 і 2). Показано також, що дефіцит глюкози призводить до зниження рівня експресії гена *PIM1* в обох типах клітин гліоми, але пригнічення функції сигнального ензиму ERN1 істотно не змінює ефект дефіциту глюкози на його експресію: -24 та -22 %, відповідно, ($p < 0,05$ для обох типів клітин). Разом з тим, рівень експресії гена *EIF2AK1* за умов дефіциту глюкози збільшується, але лише у клітинах з пригніченою активністю ERN1 (+122 %; $p < 0,05$) у порівнянні з клітинами (dnERN1) (табл. 1 і 2). Для генів *PIM1* та *EIF2AK1* також виявлено зниження рівня їх експресії у клітинах гліоми з пригніченою активністю сенсорно-сигнального ензиму ERN1 за нормальних умов інкубації у порівнянні з контрольними клітинами (вектор) на 29 та 51 %, відповідно ($p < 0,05$ для обох генів) (табл. 1).

Дослідження експресії гена *MEST* показало, що рівень його експресії у контрольних клітинах гліоми різко зменшується (-73 %; $p < 0,05$) за умов дефіциту глутаміну, але пригнічення функції сигнального ензиму ERN1 послаблює цей ефект дефіциту глутаміну (табл. 1 і 2). Так рівень експресії гена *MEST* у клітинах (dnERN1) знижується за умов дефіциту глутаміну лише на 35 % ($p < 0,05$). Разом з тим, за умов дефіциту глюкози рівень експресії гена *MEST* істотно не змінюється у контрольних клітинах (вектор), а у клітинах (dnERN1) зменшується на 37 % ($p < 0,05$) за цих експериментальних умов. Більше того, пригнічення функції ERN1 змінює рівень експресії гена *MEST* у клітинах гліоми і за стандартних умов їх вирощування. Так, рівень експресії гена *MEST* у клітинах без функціонально активного ERN1 підвищується на 732 % ($p < 0,05$) (табл. 1).

Таким чином, отримані нами результатами про зниження рівня експресії всіх чотирьох досліджених проте-

їнкіназ у клітинах гліоми за умов пригнічення ERN1-опосередкованого сигнального шляху стресу ендоплазматичного ретикулуму узгоджується з даними літератури про те, що протеїнкінази родини NEK (*NEK2*, *NEK4* та *PIM1*), а також протеїнкіназа *EIF2AK1*, відіграють важливу роль у регуляції клітинного циклу та проліферації пухлинних клітин, а збільшена їх експресія корелює з посиленням ростом злоякісних пухлин [15 – 18]. Більше того, раніше було показано, що пригнічення ERN1 у клітинах гліоми супроводжується зменшенням інтенсивності їх проліферації та росту пухлин з таких клітин [13, 14, 19]. Відомо, що ці протеїнкінази реалізують свою дію на клітинний цикл шляхом фосфорилування низки регуляторних протеїнів, а з іншого боку, їх експресія контролюється факторами росту та пухлинними супресорами, в тому числі і пухлинним супресором TP53 [15]. Крім того, протеїнкіназа *EIF2AK1* є залежним від стресу ендоплазматичного ретикулуму ензимом, що приймає участь у виключенні трансляції за стресових умов [17] і виявлене нами зниження експресії цього гена за умов пригнічення сигнального ензиму ERN1 повністю узгоджується з функціональним значенням цієї протеїнкінази. Нами також показано значне підвищення рівня експресії фактора *MEST*, що узгоджується з його анти-проліферативною активністю і зниженим рівнем його експресії у деяких типах злоякісних пухлин [18]. Отримані нами результати розкривають можливі молекулярні основи пригнічення росту гліом за умов інгібування сигнального ензиму ERN1 через пригнічення важливих для регуляції клітинного циклу протеїнкіназ та механізми регуляції їх експресії за дефіциту поживних речовин, зокрема глюкози та глутаміну, а також залежність експресії всіх досліджених генів від стресу ендоплазматичного ретикулуму, опосередкованого сигнальним шляхом ERN1.

Таким чином, результати даної роботи вказують на те, що експресія генів *NEK2*, *NEK4*, *EIF2AK1*, *PIM1* та *MEST* у клітинах гліоми лінії U87 контролюється опосередкованою ERN1 сигнальною системою стресу ендоплазматичного ретикулуму і може бути причетною до регуляції процесів проліферації у цих клітинах, оскільки білкові продукти цих генів є ключовими у регуляції клітинного циклу та процесів проліферації. За умов дефіциту глюкози та глутаміну рівень експресії генів *NEK2*, *NEK4*, *PIM1* та *MEST* у клітинах гліоми знижується, а

гена *EIF2AK1* збільшується в залежності від функції сигнального ензиму ERN1.

Висновки

1. Встановлено, що рівень експресії генів *NEK2*, *NEK4* та *PIM1* за умов дефіциту глутаміну у середовищі суттєво не змінюється у клітинах гліоми лінії U87 з функціонально активним сенсорно-сигнальним ензимом ERN1, але у клітинах гліоми з пригніченою активністю кінази та ендорибонуклеази ERN1 дефіцит глутаміну знижує рівень експресії генів *NEK2* та *PIM1*.

2. Показано, що рівень експресії гена *EIF2AK1* за умов дефіциту глутаміну збільшується, а гена *MEST* зменшується, в обох типах клітин гліоми, причому пригнічення ERN1 значно посилює цей ефект на експресію гена *EIF2AK1*.

3. Встановлено також, що за умов дефіциту глюкози рівень експресії генів *NEK2*, *NEK4* та *PIM1* знижується в обох типах клітин гліоми, але пригнічення функції сигнального ензиму ERN1 посилює ефект дефіциту глюкози на гени *NEK2* та *NEK4*. Разом з тим, рівень експресії гена *EIF2AK1* збільшується, а гена *MEST* зменшується за умов дефіциту глюкози лише у клітинах з пригніченою активністю ERN1.

4. Показано, що пригнічення функції ERN1 змінює рівень експресії досліджуваних генів і за стандартних умов їх вирощування, посилюючи експресію *MEST* і знижуючи експресію генів *NEK2*, *NEK4*, *EIF2AK1* та *PIM1*.

5. Результати даної роботи вказують на опосередкований ERN1 характер експресії генів *NEK2*, *NEK4*, *EIF2AK1*, *PIM1* та *MEST* у клітинах гліоми, чутливість їх експресії до дефіциту глюкози і глутаміну в залежності від функції сигнального ензиму ERN1 та на можливу причетність зазначених генів до регуляції процесів проліферації у цих клітинах.

Список використаних джерел

- Johnson A. Hypoxia induces a novel signature of chromatin modifications and global repression of transcription. / A. B. Johnson, N. Denko, M. C. Barton // *Mutation Research*. – 2008. – Vol. 640, N1-2. – P. 174–179.
- Clarke H.J. Endoplasmic reticulum stress in malignancy. / H. J. Clarke, J. E. Chambers, E. Liniker, S.J. Marciniak // *Cancer Cell*. – 2014. – Vol. 25, N 5. – P. 563–573.
- Lee J. Unfolded protein response signaling and metabolic diseases. / J. Lee, U. Ozcan // *Journal Biological Chemistry*. – 2014. – Vol. 289, N 3. – P. 1203–1211.
- Sakaki K. Interaction between quality control systems for ER protein folding and RNA biogenesis. / K. Sakaki, R. J. Kaufman // *Worm Journal*. – 2013. – Vol. 2, N 2. – P. e23005.

5. Ferris S. P. Glycoprotein folding and quality-control mechanisms in protein-folding diseases. / S. P. Ferris, V. K. Kodali, R. J. Kaufman // *Disease Models & Mechanisms*. – 2014. – Vol. 7, N 3. – P. 331–341.

6. Hetz C. Targeting the unfolded protein response in disease. / C. Hetz, E. Chevet, H. P. Harding // *Nature Reviews Drug Discovery*. – 2013. – Vol. 12, N 9. – P. 703–719.

7. Aragón T. Messenger RNA targeting to endoplasmic reticulum stress signalling sites. / T. Aragón, E. van Anken, D. Pincus [et al.] // *Nature*. – 2009. – Vol. 457, N 7230. – P. 736–740.

8. Taouji S. Oligomerization in endoplasmic reticulum stress signaling. / S. Taouji, S. Wolf, E. Chevet // *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. – 2013. – Vol. 117. – P. 465–484.

9. Moenner M. Integrated endoplasmic reticulum stress responses in cancer. / M. Moenner, O. Pluquet, M. Boucchereilh, E. Chevet // *Cancer Research*. – 2007. – Vol. 67, N 22. – P. 10631–10634.

10. Acosta-Alvear D. XBP1 controls diverse cell type- and condition-specific transcriptional regulatory networks. / D. Acosta-Alvear, Y. Zhou, A. Blais [et al.] // *Molecular Cell*. – 2007. – Vol. 27, N 1. – P. 53–66.

11. Hollien J. Regulated Ire1-dependent decay of messenger RNAs in mammalian cells. / J. Hollien, J. H. Lin, H. Li [et al.] // *Journal Cell Biology*. – 2009. – Vol. 186, N 3. – P. 323–331.

12. Lee J. p38 MAPK-mediated regulation of Xbp1s is crucial for glucose homeostasis. / J. Lee, C. Sun, Y. Zhou [et al.] // *Nature Medicine*. – 2011. – Vol. 17, N 10. – P. 1251–1260.

13. Drogat B. IRE1 signaling is essential for ischemia-induced vascular endothelial growth factor-A expression and contributes to angiogenesis and tumor growth in vivo. / B. Drogat, P. Auguste, D. T. Nguyen [et al.] // *Cancer Research*. – 2007. – Vol. 67, N 14. – P. 6700–6707.

14. Auf G. Inositol-requiring enzyme 1α is a key regulator of angiogenesis and invasion in malignant glioma. / G. Auf, A. Jabouille, S. Guérin [et al.] // *Proceeding of National Academy of Sciences U.S.A.* – 2010. – Vol. 107, N 35. – P. 1555–15558.

15. Nabilsi N. H. Local depletion of DNA methylation identifies a repressive p53 regulatory region in the NEK2 promoter. / N. H. Nabilsi, D. J. Ryder, A. C. Peraza-Penton [et al.] // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2013. – 288, N 50. – P. 35940–35951.

16. Goldberg L. Genome-scale expression and transcription factor binding profiles reveal therapeutic targets in transgenic ERG myeloid leukemia. / L. Goldberg, M. R. Tijssen, Y. Birger [et al.] // *Blood*. – 2013. – 122, N 15. – P. 2694–2703.

17. Acharya P. Hepatic heme- Goldberg L., regulated inhibitor (HRI) eukaryotic initiation factor 2α kinase: a protagonist of heme-mediated translational control of CYP2B enzymes and a modulator of basal endoplasmic reticulum stress tone. / P. Acharya, J. J. Chen, M. A. Correia // *Molecular Pharmacology*. – 2010. – 77, N 4. – P. 575–592.

18. Dohi O. Epigenetic silencing of miR-335 and its host gene MEST in hepatocellular carcinoma. / O. Dohi, K. Yasui, Y. Gen [et al.] // *International Journal Oncology*. – 2013. – 42, N 2. – P. 411–418.

19. Minchenko D. O. The effect of hypoxia and ischemic condition on the expression of VEGF genes in glioma U87 cells is dependent from ERN1 knockdown. / D. O. Minchenko, K. I. Kubajchuk, O. V. Hubenia [et al.] // *Advances in Biological Chemistry*. – 2011. – Vol. 2, N 2. – P. 198–206.

20. Auf G. High epiregulin expression in human U87 glioma cells relies on IRE1α and promotes autocrine growth through EGF receptor. / Auf G., Jabouille A., Delugin M. [et al.] // *BMC Cancer*, 2013, Vol. 13(1), 597.

Надійшла до редколегії 26.01.15

Т. Бакалець, асп., Д. Цимбал, вед. инж., И. Кривдюк, асп., Д. Минченко, канд. мед. наук
Институт биохимии имени А.В. Палладина, Киев, Украина

ЕКСПРЕСІЯ ГЕНОВ *NEK2*, *NEK4*, *EIF2AK1*, *PIM1* И *MEST* В КЛЕТКАХ ГЛИОМЫ ЛИНИИ U87 ПРИ ДЕФИЦИТЕ ГЛЮТАМИНА И ГЛЮКОЗЫ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ФУНКЦИИ СИГНАЛЬНОГО ЭНЗИМА ERN1

В статье рассмотрена экспрессия генов, кодирующих протеинкиназы *NEK2*, *NEK4*, *EIF2AK1* и *PIM1* и фактор *MEST*, вовлеченных в регуляцию процессов деления клеток и их пролиферацию в клетках глиомы линии U87 с угнетением функции ERN1.

Ключевые слова: экспрессия генов, протеинкиназы, клетки глиомы, дефицит глюкозы и глутамина, ERN1.

T. Bakalets, PhD stud., D. Tsymbal, leading engin., I. Kryvdiuk, PhD stud., D. Minchenko, PhD.
Palladin Institute of Biochemistry, Kyiv, Ukraine

EXPRESSION OF *NEK2*, *NEK4*, *EIF2AK1*, *PIM1* AND *MEST* GENES IN U87 GLIOMA CELLS UPON GLUTAMINE AND GLUCOSE DEPRIVATION DEPENDING ON ERN1 SIGNALING ENZYME FUNCTION

The article examined the expression of genes encoding protein kinase *NEK2*, *NEK4*, *EIF2AK1* and *PIM1* factor and *MEST*, involved in the regulation of cell division and their proliferation in glioma cell lines U87 with full suppression ERN1.

Key words: gene expressions, protein kinases, glioma cells, glucose and glutamine deprivations, ERN1.

УДК 616.329-001.37-053

Я. Раєцька, канд. біол. наук, Т. Ішук, асп.,
Т. Галенова, канд. біол. наук, О. Джус, асп., Л. Остапченко, д-р біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

ДИНАМІКА ВМІСТУ МОЛЕКУЛ СЕРЕДНЬОЇ МАСИ В ПЛАЗМІ КРОВІ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІЙ ОПІКОВІЙ ХВОРОБІ

Дослідження молекул середньої маси в плазмі крові щурів за умов експериментального моделювання хімічного опіку стравоходу свідчить, що в стадії опікового шоку зростає концентрація молекул середньої маси порівняно з контролем, а в стадії септикотоксемії дещо знижується, але залишається вище контрольних значень.

Ключові слова: хімічний опік стравоходу, молекули середньої маси, центральна нервова система.

Вступ. Один з найбільш поширених видів опіків – хімічний, в даний час набуває все більшої актуальності [1,2]. Особливий інтерес медиків складають діти, число яких становить до 52,3% постраждалих внаслідок опіку стравоходу кислотомісними та луговмісними речовинами (чистячі та миючі засоби) [3,4]. Порушення функціонування центральної нервової системи (ЦНС), як ускладнення опікової хвороби, відзначають усі без винятку фахівці, пов'язані з вивченням і лікуванням цієї недуги [5,6,7]. Важливим патогенетичним фактором порушення функціонування ЦНС є підвищення в крові молекул середньої маси (МСМ).

Вважається, що значне підвищення вмісту МСМ у крові при різних видах патології є прогностично несприятливим показником, тому що продукти деградації біополімерів можуть чинити виражений нейротоксичний вплив на структуру головного мозку [8]. МСМ порушують фізико-хімічні властивості клітинних мембран і роблять їх більш доступними для різного роду пошкоджуючих впливів [9].

Порушення функціонування ЦНС у дітей вивчені недостатньо повно, найчастіше відбувається механічне перенесення закономірностей перебігу опікової хвороби у дорослих в дитячу клініку [5]. Тому однією з наших задач було розробити модель хімічного опіку стравоходу, яка б відповідала тій, що є характерною для дітей від 1 до 8 років. Традиційно, при створенні моделі опіку стравоходу використовують статевозрілих щурів, що за віком, як правило, відповідають дорослій людині [10,11].

Таким чином, метою даної роботи було вивчення концентрації МСМ у плазмі крові щурів за умов моделювання хімічного опіку стравоходу II-го ступеню.

Матеріали і методи. У досліді використовували білих нелінійних статевонезрілих щурів (1-місячних) масою 90-110г, яких утримували на стандартному раціоні віварію. Тваринам експериментально моделювали

опік стравоходу II-го ступеню розчином 30% CCl_3COOH та 20% NaOH [11].

Тварин декапітували на 1, 7, 15, і 21-шу доби, що відповідає стадіям шоку, ранньої і пізньої токсемії та септикотоксемії опікової хвороби [12]. Отриманий стравохід розрізали поздовжньо, промивали холодним фізіологічним розчином. Для морфологічного дослідження використовували шматочки стравоходу довжиною близько 1,5 см. Їх фіксували в розчині 12% формаліну і заливали в парафін. Депарафіновані зрізи товщиною 5 мкм фарбували гематоксилін-еозином за Ван Гізоном. Біохімічні показники визначали в сироватці крові, яку отримували центрифугуванням крові при $2000g \times 40$ хв. Показники крові (концентрацію загального білка, альбуміну) визначали за допомогою біохімічного аналізатора Humalyser 3000 з використанням відповідних наборів. Дослідження плазми крові щурів проводили на 1 та 7, 15, 21 добу після введення хімічних розчинів. Вміст МСМ у плазмі крові визначали за методом Ніколайчика [13]. Результати дослідження вмісту МСМ у сироватці крові виражали в умовних одиницях оптичної щільності. Статистичну обробку отриманих результатів проводили за допомогою методів варіаційної статистики та кореляційного аналізу з використанням комп'ютерної програми Excel. Для визначення достовірності відмінностей між двома вибірками використовували критерій Стюдента (t). При цьому достовірними вважалися різниці $P < 0,05$.

Результати та їх обговорення. Гістологічне дослідження стану слизової оболонки стравоходу свідчило, що за умов експериментального моделювання лужного та кислотного опіків відбувався фібринозний, ерозивний езофагіт (пошкодження слизової та підслизового шару) виражений набряк (рис.1).

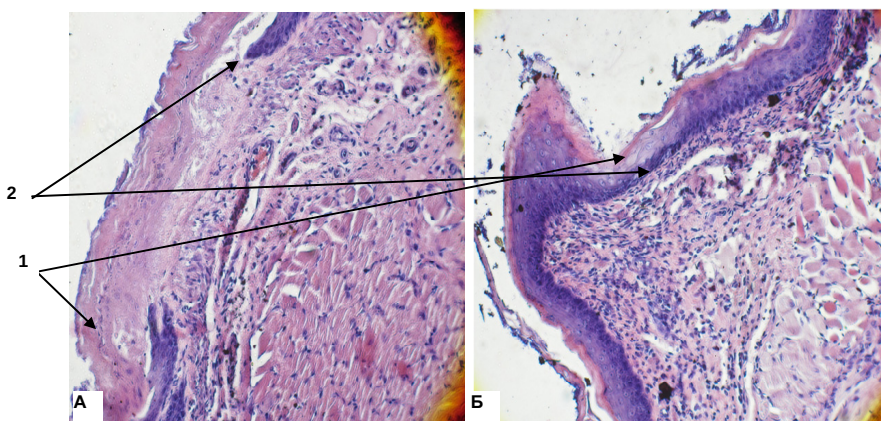


Рис. 1. Мікрофотографія слизової оболонки стравоходу щурів за умов експериментального моделювання А) кислотного опіку стравоходу 30% CCl_3COOH ; Б) лужного опіку стравоходу 20% NaOH .

Примітки: 1 – пошкодження слизової, 2 – пошкодження підслизового шару

Порівняння виявлених уражень та досліджень стану слизової оболонки стравоходу дітей з лужним та кислотним опіком II-го ступеню показало відповідність експериментальних моделей (за С.Д. Терновський, 1963, і за Э.Н. Ванцян, Р.А. Тошakov, 1991).

Опік супроводжується тривалими порушеннями білкового обміну, що призводить до патологічних змін у функціонуванні різних органів та систем [12]. Тому одним з основних діагностичних критеріїв тяжкості хімічного опіку є визначення рівня загального білка та аль-

буміну, що є основними біохімічними показниками сироватки крові, за якими можна охарактеризувати функціональний стан організму та оцінити ступінь метаболічних порушень за умов досліджуваної патології.

Нами було визначено концентрацію загального білка в сироватці крові щурів з кислотним опіком (30% CCl_3COOH) стравоходу, в ході дослідження були отримані наступні дані, які подані на рис 2.

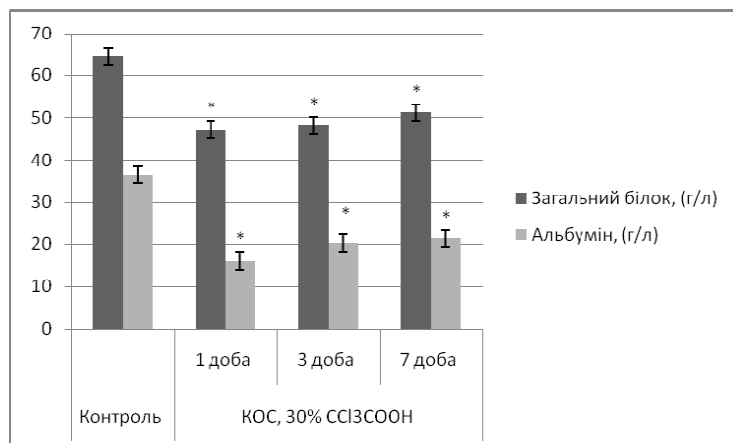


Рис. 2. Біохімічні параметри сироватки крові щурів за умов експериментального моделювання хімічного опіку стравоходу 30% CCl_3COOH

* – $P < 0,05$ по відношенню до контролю

Встановлено, що КОС призводить до значних змін вмісту загального білка. На 1, 3 і 7 добу спостережень його вміст знижувався, відповідно, в 1,4; 1,3 та в 1,2 рази, порівняно з контрольними значеннями. Показано, що на 1, 3 і 7 добу відбувається зниження вмісту альбуміну, відповідно, в 2,3; 1,8 і 1,7 разів порівняно з контрольними значеннями.

Також нами було визначено концентрацію загального білка в сироватці крові щурів з ЛОС (20% NaOH), в ході дослідження були отримані наступні дані, які подані на рис.3. Встановлено, що експериментальний опік стравоходу 20% NaOH також призводить до значних змін вмісту загального білка. На 1, 3 і 7 добу спостережень його вміст знижувався, відповідно, в 1,5, 1,3 та в 1,2 рази, порівняно з контрольними значеннями. По-

зано, що на 1,3,7 добу відбувається зниження вмісту альбуміну, відповідно, в 1,8, 1,6 і 1,5 разів порівняно з контрольними значеннями. Отже, має місце гіпопротеїнемія, яка виникає переважно за рахунок зменшення кількості альбумінів. Встановлено, що експериментальний опік стравоходу 20% NaOH також призводить до значних змін вмісту загального білка. На 1, 3 і 7 добу спостережень його вміст знижувався, відповідно, в 1,5, 1,3 та в 1,2 рази, порівняно з контрольними значеннями. Показано, що на 1,3,7 добу відбувається зниження вмісту альбуміну, відповідно, в 1,8, 1,6 і 1,5 разів порівняно з контрольними значеннями. Отже, має місце гіпопротеїнемія, яка виникає переважно за рахунок зменшення кількості альбумінів.

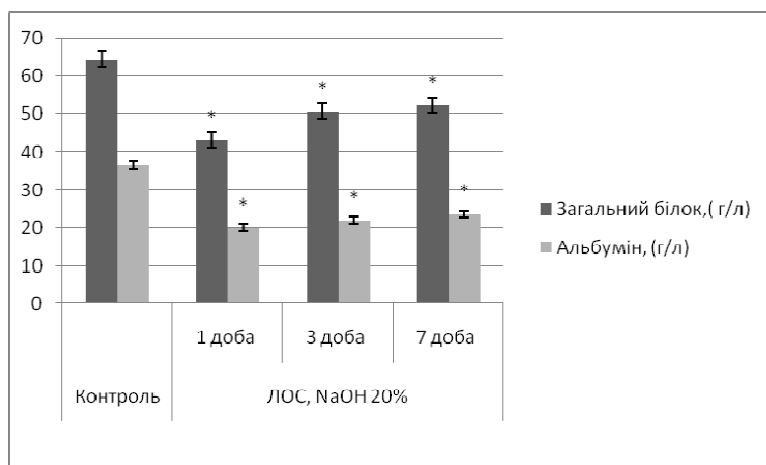


Рис. 3. Біохімічні параметри сироватки крові щурів за умов експериментального моделювання лужного опіку стравоходу 20% NaOH

* – $P < 0,05$ по відношенню до контролю

Таким чином, за умов моделювання КОС та ЛОС II-го ступеню – рівень загального білка та альбуміну змінювався найбільшою мірою вже на 1-шу добу досліджень, що відповідає стадії шоку.

При визначенні вмісту МСМ у плазмі крові щурів за умов експериментального моделювання кислотного опіку

стравоходу (КОС) 30% CCl_3COOH нами було встановлено, що максимальне підвищення досліджуваного показника в плазмі крові більш ніж в 2,3 рази, порівняно з контролем, спостерігалось на 1-у добу після розвитку КОС II-го ступеню, що відповідає стадії шоку (Таблиця 3).

Таблиця 3. Вміст молекул середньої маси (ум. од.), у плазмі крові щурів за умов експериментального моделювання кислотного опіку стравоходу 30% CCl_3COOH ($M \pm m$, $n=10$)

Група тварин при КОС II-го ступеню, (30% CCl_3COOH)	Молекули середньої маси, (ум. од.)
Контроль	0,113±0,013
стадія шоку (1-ша доба)	0,261±0,027*
стадія ранньої токсемії (7-ма доба)	0,204±0,047*
стадія пізньої токсемії (15-та доба)	0,257±0,063*
стадія септикотоксемії (21-ша доба)	0,145±0,042*

* – $P < 0,05$ по відношенню до контролю.

Вмісту МСМ у плазмі крові щурів за умов експериментального моделювання лужного опіку стравоходу (ЛОС)

20% NaOH підвищувався більш ніж в 1,4 рази на 1-у добу досліджень, що відповідає стадії шоку (Таблиця 4).

Таблиця 4. Вміст молекул середньої маси (ум. од.), у плазмі крові щурів за умов експериментального моделювання лужного опіку стравоходу 20% NaOH ($M \pm m$, $n=10$)

Група тварин при КОС II-го ступеню, (20% NaOH)	Молекули середньої маси, (ум. од.)
Контроль	0,113±0,013
стадія шоку (1-ша доба)	0,160±0,012*
стадія ранньої токсемії (7-ма доба)	0,120±0,041*
стадія пізньої токсемії (15-та доба)	0,154±0,023*
стадія септикотоксемії (21-ша доба)	0,144±0,06*

* – $P < 0,05$ по відношенню до контролю.

Цей період можна вважати проявом найбільшої нейротоксикації, як при кислотному так і при лужному опіках стравоходу. В подальші терміни дослідження (що відповідають стадіям ранньої і пізньої токсемії та септикотоксемії опікової хвороби) спостерігали поступове зниження, але досліджуваний показник залишався вище контрольних значень.

За умов експериментального моделювання КОС було встановлено, що на 7-му добу вміст МСМ підвищувався в 1,8 разів, на 15-ту добу ми спостерігали підвищення 2,2 разів, на 21-шу добу відбувалось незначне підвищення 1,08 разів, порівняно з контрольними значеннями. При ЛОС на 7-му добу вміст МСМ підвищувався в 1,06 рази, на 15-ту добу в 1,36 рази, на 21-шу в 1,27 рази, порівняно з контрольними значеннями.

Підвищення концентрації МСМ може пояснюватись, як фрагментацією білкових молекул внаслідок посилення окиснювальної модифікації білків, так і як компенсаторна реакція організму на патологічний процес [14,15]. Підвищення вмісту середніх молекул у крові щурів з КОС та ЛОС стравоходу є показником розвитку ендогенної інтоксикації і може вказувати на порушення мозкової діяльності. Рівень МСМ може мати прогностичні критерії в з'ясуванні порушення мозкової діяльності у хворих, як з лужним так і кислотним опіками стравоходу II-го ступеню, на підставі виявлених нами змін МСМ.

Висновки. Дослідження концентрації молекул середньої маси в плазмі крові щурів на етапах розвитку експериментального моделювання кислотного опіку стравоходу 30% CCl_3COOH та лужного опіку стравоходу 20% NaOH свідчать, що в стадії опікового шоку значно зростає концентрація молекул середньої маси порівняно з контролем, а в стадії септикотоксемії дещо знижується, але залишається вище контрольних значень.

Список використаних джерел

- Kilincaslan H. The effects of dimethyl sulfoxide on the acute phase of experimental acid and alkali corrosive esophageal burns. / H. Kilincaslan, H. Ozbey, V. Olgac. // European Review for Medical and Pharmacological Sciences. – 2013. – №19. – P. 2571-2577. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- Ruhl D.S. Emergent treatment of button batteries in the esophagus: evolution of management and need for close second-look esophagoscopy. / D.S., Ruhl, B.B. Cable, K.K. Rieth. // Annals of Otolaryngology, Rhinology & Laryngology – 2014. – №3. – P.206-213. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- Hwang J.C. Esophageal stricture induced by an ultraslim upper endoscopy in a novel rabbit model of corrosive injury. / J.C. Hwang, B. Jin, J.H. Kim, S.G. Lim [et al.] // Scandinavian Journal of Gastroenterology – 2014. – №1. P.30-34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- Bustamante T.F. The use of mitomycin C in caustic esophagitis in rats. / T.F. Bustamante, P.L. Lourenção, K.L. Higa, A.P. Silva [et al.] // Acta Cirurgica Brasileira. – 2013. – №2: – P.136-141. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- Хрулёв С.Е. Поражение головного мозга у детей с тяжёлой термической травмой в анамнезе. / С.Е. Хрулёв. // Нижегородский мед. журн. Прил. "Травматология, ортопедия, комбустиология". – 2006. – С.139-141.
- Воробьев А.В. Медико-экономические аспекты лечения тяжело обожженных. / А.В. Воробьев, С.П. Перетягин, С.А. Бухвалов, и др. // III съезд комбустиологов России, 2-5 июня 2008 г.: сб. науч. тр. – М., 2008. – С.15-17.
- Дмитриев Г.И. Новая концепция реабилитации обожженных. / Г.И. Дмитриев, А.В. Воробьев, С.П. Перетягин. // III съезд комбустиологов России, 2-5 июня 2008 г.: сб. науч. тр. – М., 2008. – С.188-189.
- Пирадов М.А. Сравнительная оценка эффективности методов определения осмоляльности и средних молекул в прогнозе течения инсульта. / М.А. Пирадов // Лабораторное дело. – 1999. – № 5. – С.10-12.
- Николайчик В.В. Влияние пептидов на осмотическую устойчивость эритроцитов. Труды III Всесоюз. межунив. конф. / В.В. Николайчик // Физико-химической биологии Тбилиси. -1982. – № 2. -С. 364-365.
- Гелашвили О. А. Вариант периодизации биологических сходных стадий онтогенеза человека и крысы. / О. А. Гелашвили // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2008. – Т. 22, № 4. – С. 125-126.
- Ряецкая Я.Б. Відтворення експериментальної моделі хімічного опіку стравоходу у щурів I-го ступеню. / Я.Б. Ряецька, Т.В. Ішук, О.М. Савчук, Л.І. Остапчук // Медицина. – 2013. – Т.15, №4. – С. 116-120.
- Вітер В.С., Волков К.С. Субмікроскопічні зміни мікроциркуляторного русла міокарда при експериментальній термічній травмі. / В.С. Вітер, К.С. Волков // Клінічна анатомія та оперативна хірургія. – 2011. – Т. 10, № 4. – С. 29-31.

13. Николайчик В.В. Способ определения средних молекул. / В.В. Николайчик. // Лабораторное дело. – 1991. – № 10. – С.13-18

14. Нетюхайло Л.Г. Влияние препарата "криохор" на уровень молекул средней массы в условиях экспериментальной ожоговой болезни. / Л.Г. Нетюхайло. // Медицинская химия. – 2004. – Т.6, № 3. – С. 126-128.

15. Нетюхайло Л.Г. Молекулы средней массы-маркеры эндогенной интоксикации при экспериментальной ожоговой болезни. / Л.Г. Нетюхайло. // Современные проблемы токсикологии. – 2005. – №3. – С.57-58.

Надійшла до редколегії 05.12.14

Я. Раецкая, канд. биол. наук, Т. Ишук, асп., Т. Галенова, канд. биол. наук, Е. Джус, асп., Л. Остапченко, д-р биол. наук
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

ДИНАМИКА СОДЕРЖАНИЯ МОЛЕКУЛ СРЕДНЕЙ МАССЫ В ПЛАЗМЕ КРОВИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ОЖГОВОЙ БОЛЕЗНИ

Исследование молекул средней массы плазмы крови крыс в условиях экспериментального моделирования химического ожога пищевода свидетельствует, что в стадии ожогового шока возрастает концентрация молекул средней массы по сравнению с контролем, а в стадии септикотоксемии несколько снижается, но остается выше контрольных значений.

Ключевые слова: химический ожог пищевода, молекулы средней массы, центральная нервная система.

Ya. Raetska, PhD., T. Ischuk, PhD stud., T. Galenova, PhD., O. Dzhus PhD stud., L. Ostapchenko, DSc
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

DYNAMICS OF MIDDLE MASS MOLECULES IN BLOOD PLASMA AFTER EXPERIMENTAL MODELING BURN DISEASE

We made investigation of middle mass molecules in the rats plasma after experimental modeling of an acid esophagus burns. These data suggest that the on stage of burn shock the concentration middle mass molecules significantly increased of compared with the control, and on the stage septicotoxemia slightly decreases, but remains above control values.

Key words: an acid esophageal burn, middle mass molecules, central nervous system.

УДК 616.128

О. Калмикова, студ., О. Джус, асп., Н. Сенчило, канд. биол. наук, Г.Островська, д-р биол. наук,
Л. Гарманчук, д-р биол. наук.
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ТРАНСФОРМОВАННЫХ КЛЕТЧНЫХ КУЛЬТУР ПРИ ДЕЙСТВИИ АКТИВАТОРОВ ТА ИНГИБИТОРОВ РЕЦЕПТОРОВ С ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Досліджено морфо-функціональні зміни клітин ліній Hela та Her G2 за умов впливу активатора Toll-like рецептора тейхоевої кислоти, активатора рецептора епідермального фактора росту (EGF) та інгібітора цього рецептора Герцептину.

Ключові слова: трансформовані клітини, ядерно-цитоплазматичне співвідношення, рецептори з ферментативною активністю, епітеліально-мезенхімальний перехід.

Вступ. У зв'язку зі зростаючим рівнем захворюваності на злоякісні новоутворення актуальним на сьогодні є вивчення біологічних характеристик пухлинних клітин. Однією з характеристик трансформованих клітин є підвищена експресія рецепторів з ферментативною активністю, які задіяні в регуляції росту і проліферації цих клітин.

Для вивчення біологічних особливостей трансформованих клітин найчастіше використовують лінії культивованих клітин певного походження [1]. Ці клітини є іморталізованими ("безсмертними"), тобто вони здатні до поділу необмежену кількість разів за деяких умов експресії фермента теломери та експресії ракових ембріональних генів (NANOG, Oct-4, Sox-2, CD44) [2]. Важливою характеристикою трансформованих клітин є зниження експресії "рецепторів смерті" Fas (CD95) – що обумовлює резистентність клітин до проапоптичних стимулів [3]. Всі ці фактори стимулюють епітеліально-мезенхімальний перехід (ЕМП) – явище, під час якого клітини втрачають свою епітеліальну морфологію та характеристики (зниження полярності, підвищення рухливості) [4], та набувають мезенхімального фенотипу (збільшується експресія тирозинкіназ, фібронектину, матриксних металопротеїназ) і здатності до міграції [5]. Виділяють 3 типи ЕМП, 2 з яких відбуваються у нормальному організмі, а останній є онкогенним. Перший тип ЕМП спостерігається під час ембріогенезу (гастродуоденального) і супроводжується зворотнім процесом – мезенхімально-епітеліальним переходом (МЕР). Другий тип ЕМП має місце в постнатальному періоді: під час ушкодження тканин генеруються фіброblastи для їх відновлення.

Ці процеси стимулюються імунними клітинами, що виділяють цитокіни та прозапальні фактори у відповідь на потрапляння патоген-асоційованих молекул бактерій, які стимулюють ЕМП-МЕР. ЕМП третього типу надає можливість пухлинним клітинам епітеліального походження набувати інвазивних мезенхімальних характеристик, що відіграє ключову роль в метастазуванні. Цей тип ЕМП є менш впорядкованим, і тому в результаті часто можуть виникати клітини з гібридним фенотипом, що володіють властивостями як епітеліальних так і мезенхімальних клітинних типів [6].

Основними сигнальними ланками, які задіяні у реалізації епітеліально-мезенхімального переходу є STAT3 (signal transducers and activators of transcription, білки-активатори транскрипції), MAPK (мітоген-активуючі протеїнкінази), Akt [7, 8]. Спільною рисою для них є часткова трансдукція сигналу через рецептори з ферментативною активністю (тирозинкінази), серед яких рецептор епідермального фактора росту (EGF), Toll-like рецептори [9, 10].

Мета дослідження полягала у порівнянні морфо-функціональних характеристик (площі клітин, ядерно-цитоплазматичного співвідношення, спорідненості до барвників, морфології відростків, форми клітин, включень в клітині) трансформованих адгезивних клітинних культур Hela та Her G2 під впливом активаторів (EGF, тейхоева кислота) та інгібітора (герцептин) рецепторів з ферментативною активністю (рецептор епідермального фактора росту HER і Toll-like рецептор).

Об'єкт і методи дослідження. В якості експериментальної моделі було використано адгезивні лінії пухлинних клітин – Hela та Hep G2, які за своїм походженням належать до аденокарциноми шийки матки та гепатокарциноми людини відповідно. Клітини вирощували моношаром в культуральному середовищі Ігла в модифікації Дюльбекко (Hela) (DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium, "Sigma", США) або в RPMI-1640 (Hep G2) ("Sigma", США) із додаванням 10% ембріональної телячої сироватки ("Sigma", США), 2 мМ L-глутаміна ("Sigma", США) та 40 мкг/мл гентаміцину (Біофарма, Україна). Інкубація проводилась за стандартних умов культивування (5% CO₂, 100% вологості, 37 °C) в 6-ти лункових планшетах, в об'ємі культурального середовища рівному 3 мл. Клітини вносили в однакових концентраціях по 100 000 клітин на лунку. Герцептин вносили по 100 мкл до кінцевої концентрації 5 мкг/мл, EGF та тейхоеву кислоту – по 100 мкл до кінцевої концентрації 50 нг/мл та інкубували впродовж 72 години. Термін культивування був обраний у зв'язку з урахуванням мітотичного циклу досліджуваних клітин та їхнього переходу до стану проліферативного спокою. Після експозиції культур з діючими речовинами клітини фіксувалися 4 % розчином нейтрального формаліну, фарбували гематоксиліном Бемера і еозином (Hela) або залізним гематоксиліном (Hep G2) з модифікаціями [11, 12], і заливали у водорозчинне консервуюче середовище гліцерин-желатин (1:1). Морфологічний аналіз проводили за допомогою світлової мікроскопії. Морфометричні параметри вимірювали за допомогою програм Axiovision та ImageJ 1.45 на цифрових мікрофотографіях, які були зроблені з використанням камери Canon та інвертованого мікроскопа Axiovert 40.

Статистичний аналіз одержаних результатів проводили з використанням програм статистичного пакету аналізу даних Microsoft Excel 2010. Для оцінки достовірності виявлених змін застосовували t-критерій Стюдента, достовірність значень приймалася при $p < 0.05$. Отримані результати представлені як середнє значення $\pm$ стандартна похибка середнього.

Результати та їх обговорення. Під впливом діючих речовин на трансформовані клітини відмічали зміни їх морфології (рис.1, 2).

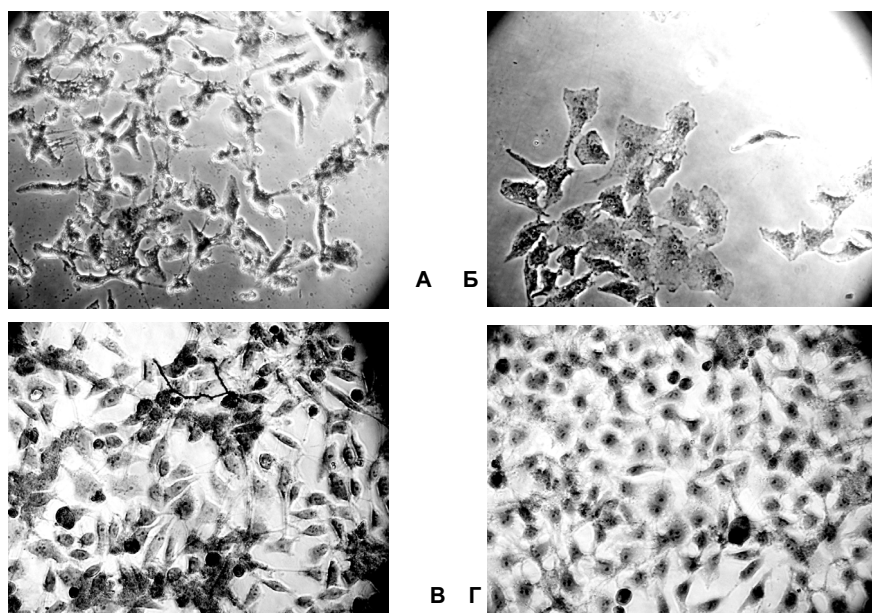


Рис. 1. Культура клітин Hela, гематоксилін-еозин, $\times 320$: А – інтактна культура (контроль), Б – при дії Герцептину, В – при дії EGF, Г – при дії тейхоевої кислоти

У культурі інтактних клітин Hela (рис.1. А) переважали кулясті клітини, проте деякі з них мали відростки, зіставні по довжині з розміром клітин. Відростки не звужувались на дистальному кінці, а мали такий же діаметр, як і на проксимальному кінці. Поодинокі або об'єднані в групи клітини добре прикріплені до дна пластикового флакону, мали типову мезенхімальну морфологію. Після впливу Герцептину (рис.1. Б) спостерігали значне розпластання клітин та прояв адгезивних властивостей, що свідчить про зниження проліферативної активності і втрату деяких рис пухлинних культур. Згідно візуальних морфологічних ознак фенотип клітин нагадував типові епітеліальні ознаки. Клітини, стимульовані EGF (рис.1. В), за морфологією нагадували епітеліоцити, оскільки на відміну від клітин контрольної групи, втрачали веретеноподібну форму, та мали чис-

ленні тонкі відростки. Після впливу тейхоевої кислоти (рис.1. Г) клітини слабше прикріплювались до поверхні порівняно з контролем, зменшувалась їх площа, втягувались відростки, моношар клітин ущільнювався.

В контрольній групі клітини культури Hep G2 (рис.2. А) мали правильну полігональну форму з чітко окресленими краями та потовщеними відростками. При дії герцептину (рис.2. Б) моношар клітин ставав нещільним, але добре розпластаним по поверхні, з'являлися клітини з малою кількістю відростків. Після впливу EGF (рис.2. В), спостерігали зміну морфології клітин, вони набували кулястої форми, а також реєстрували їх ущільнення в моношарі, що свідчить про активацію проліферативних процесів. Подібні зміни морфології спостерігали і при дії тейхоевої кислоти (рис.2. Г).

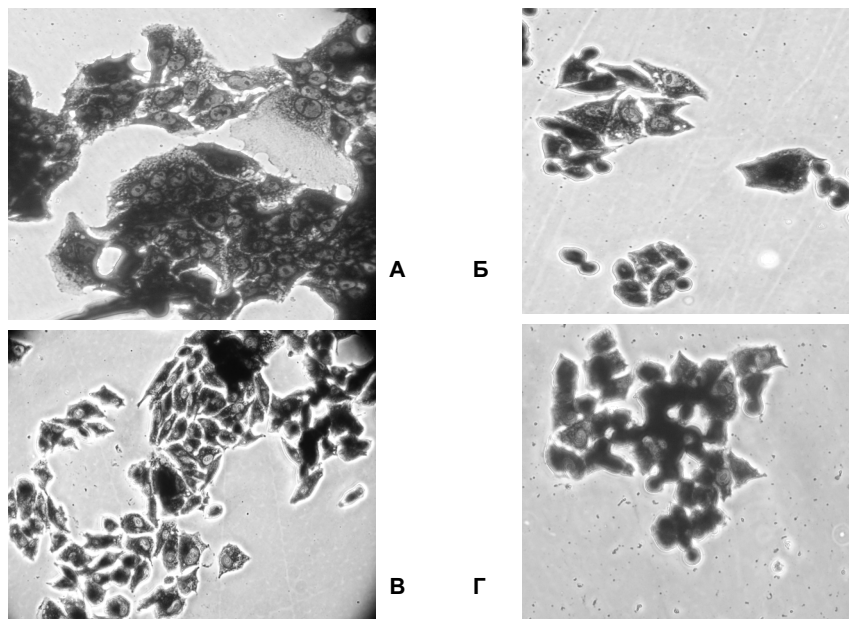


Рис. 2. Культура клітин Нер G2, залізний гематоксилін, х 320: А – інтактна культура (контроль), Б – при дії Герцептину, В – при дії EGF, Г – при дії тейхоєвої кислоти

Також, відмічали зміну спорідненості цитоплазми клітин до барвників після впливу тейхоєвої кислоти – цитоплазма яскраво зафарбовується еозином. Очевидно, це обумовлене підвищенням синтетичної активності (через Toll-like рецептори, які активують NF- κ B і продукцію прозапальних цитокінів, хемокінів, антиапоптичних білків, що сприяють проліферації пухлинних клітин через активацію p38 MAPK, c-Jun N-кінцевої кінази, трансформуючого фактора росту β); перебудовою білків цитоскелету (деполімеризацією фібрилярного актину, переходу тубуліну у глобулярну форму), зміною метаболізму (зростання ацидофільності цитоплазми, її алкалозом при накопиченні речовин з лужною реакцією). В

інтактних трансформованих культурах клітин основний метаболічний шлях отримання енергії – гліколіз, тобто у цитоплазмі розвивається ацидоз, і, як наслідок, еозин слабо зафарбовує її. Проте, при включенні окисного фосфорилювання цитоплазма стає більш ацидофільною і тому зафарбовується яскравіше у рожевий колір.

Показано достовірну різницю ядерно-цитоплазматичного співвідношення (ЯЦС) в культурі Hela (рис.3. А) при дії тейхоєвої кислоти (зростає до $0,33 \pm 0,02$), Герцептину (зменшується до $0,20 \pm 0,01$) проти контролю із значенням ЯЦС – $0,28 \pm 0,02$; та в культурі Нер G2 (рис.4. А) – EGF (зростає до $0,23 \pm 0,02$) і тейхоєвої кислоти (зростає до $0,24 \pm 0,03$), проти контролю ($0,18 \pm 0,01$).

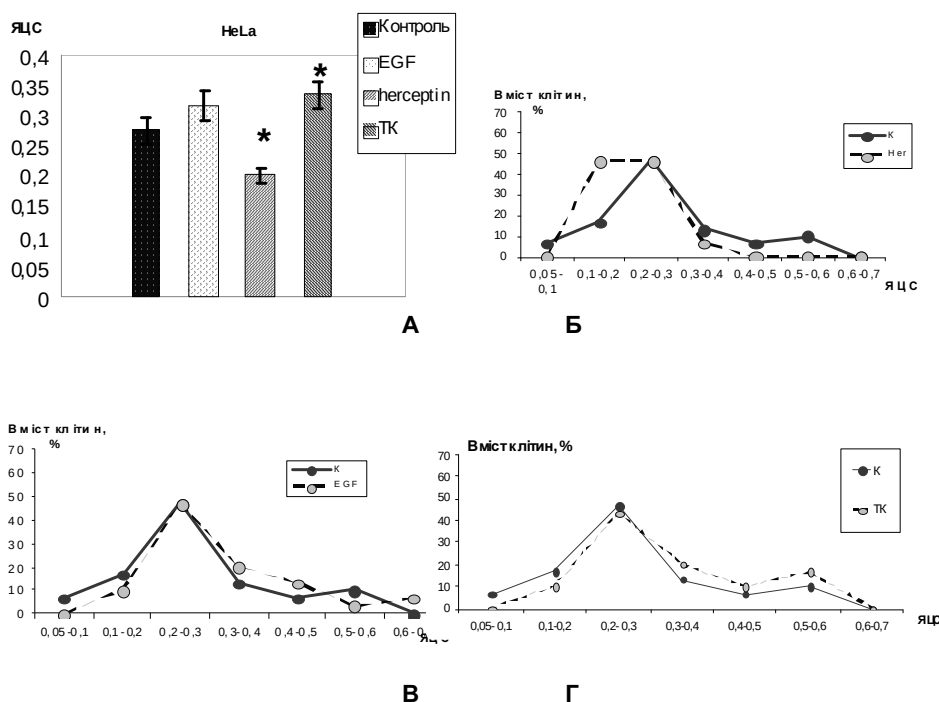


Рис.3. А – Значення ЯЦС культури клітин Hela при дії EGF, Герцептину, тейхоєвої кислоти; Варіаційна крива розподілу клітин з різним ЯЦС в культурі клітин Hela при дії: Б – Герцептину, В – EGF, Г – тейхоєвої кислоти

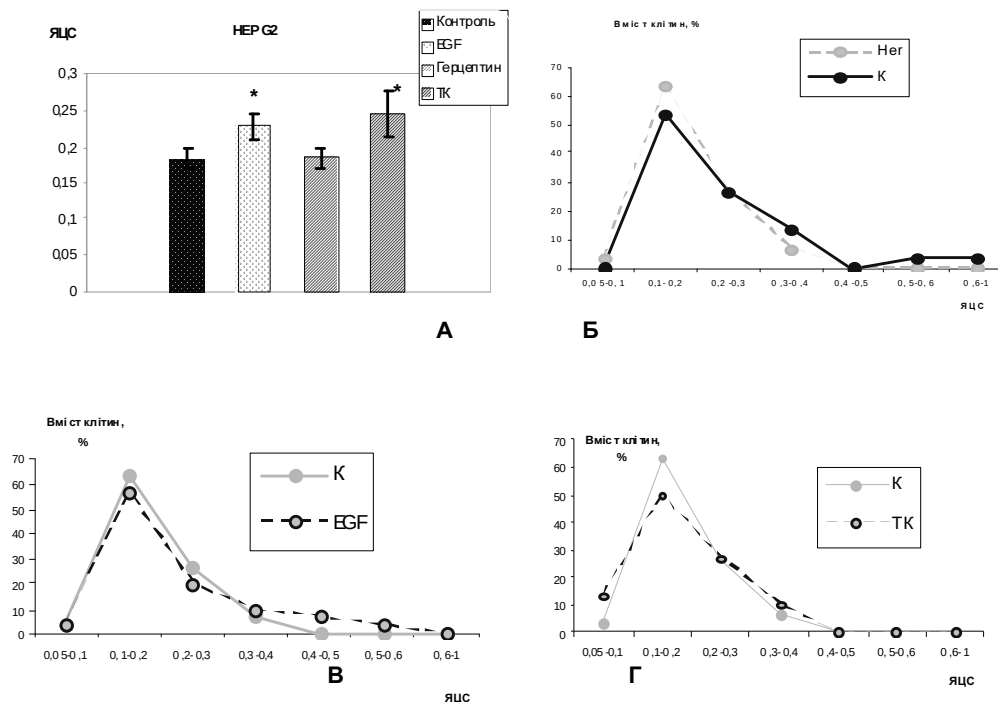


Рис.4. А – значення ЯЦС культури клітин Нер G2 при дії EGF, Герцептину, тейхоевої кислоти; Варіаційна крива розподілу клітин з різним ЯЦС в культурі клітин Нер G2 при дії: Б – Герцептину, В – EGF, Г – тейхоевої кислоти

Ранжування даних вказувало на більш чітку характеристику стану популяції клітин, оскільки середнє значення ЯЦС може нівелювати крайні показники ЯЦС – 0,05 (G_0 стадія) і 0,7 (мітоз). Найбільша кількість клітин Hela у контрольній групі мала показник ЯЦС в діапазоні 0,2-0,3, що вказує на знаходження переважної більшості клітин популяції (понад 50 %) на початку синтетичної стадії клітинного циклу ($G_1 \rightarrow S$). Очевидно, вказані морфо-функціональні характеристики клітин асоційовані з їх високою транскрипційною активністю. При дослідженні значення ЯЦС клітин Нер G2 у контролі зазначені показники коливаються в межах 0,1-0,2 (понад 60% клітин у популяції), що свідчить про їх послаблену синтетичну активність та перебування клітин на G_1 стадії.

Після впливу Герцептину в культурах клітин Hela і Нер G2 (рис.3. Б; рис.4. Б) спостерігали зростання (з частки популяції клітин (45% і 65%), з низьким значенням ЯЦС (0,1-0,2). Таке зростання популяції клітин імовірно вказує на низьку проліферативну активність клітин за дії Герцептину. Встановлено також зростання адгезивних властивостей клітин після впливу Герцептину, про що свідчить збільшення площі прикріплення клітин до субстрату та формування значної кількості відростків досліджуваних культур клітин. Після дії EGF та тейхоевої кислоти (рис.3. В, Г; рис.4. В, Г) навпаки збільшувалась частка популяції клітин (25% і 10%) з високим ЯЦС (0,4-0,6), та зі зменшеною площею клітин, прикріплених до субстрату. Подібний ефект, очевидно пов'язаний з періодом входження клітин у стадію мітозу.

Висновки. Отримані експериментальні дані вказують на пригнічення проліферативної активності трансформованих клітинних культур інгібітором рецептора епідермального фактора росту Герцептином, що свідчить про формування мезенхімально-епітеліального переходу у клітин. Після впливу EGF та тейхоевої кислоти спостерігається збереження пухлинних характеристик клітин, їх морфології, зростає показник ЯЦС (стимулюється настання мітозу). Тейхоева кислота підвищує спорідненість пухлинних клітин до еозину. Очевидно, тейхоева кислота впливає на морфо-функціональний стан цитоскелету,

підвищуючи синтетичну активність та змінюючи метаболічні процеси в пухлинних клітинах

Список використаних джерел

1. Данченко Е.О. Оценка цитотоксичности фармацевтических субстанций с использованием клеточных культур / Е.О. Данченко // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – № 2. – 2012. – С. 22 – 31.
2. White D.E. Addressing the role of cell adhesion in tumor cell dormancy / D.E. White, J.H. Rayment, W.J. Muller // Cell Cycle. – 2006. – Vol. 5, № 16. – P.1756 – 1759.
3. Bhutia S.K. Tumour escape mechanisms and their therapeutic implications in combination tumour therapy / S.K. Bhutia, S.K. Mallick, T.K. Maiti // Cell Biol. Int. – 2010. – Vol. 34, № 5. – P.553 – 563.
4. Sipos F. Epithelial-to-mesenchymal and mesenchymal-to-epithelial transitions in the colon / F. Sipos, O. Galamb // World J Gastroenterol. – 2012. – Vol. 18, № 7. – P. 601 – 608.
5. Lee J. The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease / J. Lee, S. Dedhar, R.Kalluri, E.Thompson // J Cell Biol. – 2006. – Vol. 172. – P. 973-981.
6. Samatov T.R. The epithelial-mesenchymal transition: focus on metastatic cascade, alternative splicing, non-coding RNAs and modulating compounds / T.R. Samatov, A.G. Tonevitsky, U. Schumacher // Molecular cancer. – 2013. – Vol. 12. – P. 107-119.
7. Zhu Q-C. Epithelial-mesenchymal Transition and Its Role in the Pathogenesis of Colorectal Cancer / Q-C. Zhu, R-Y. Gao, W. Wu. // Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. – 2013. – Vol. 14, № 5. – P. 2689 – 2698.
8. Conidi A. Aptamers and their potential to selectively target aspects of EGF, Wnt/ β -catenin and TGF- β -Smad family signaling / A.Conidi,van den V.Berghe, D. Huylebroeck // Int J Mol. – 2013. – Vol. 14. – P. 6690 – 6719.
9. Yao D. Mechanism of the Mesenchymal-Epithelial Transition and Its Relationship with Metastatic Tumor Formation / D.Yao, C. Dai, S. Peng // Mol Cancer Res. – 2011. – Vol. 9, № 12. – P. 1608 – 1620.
10. Yates C.C. Co-culturing human prostate carcinoma cells with hepatocytes leads to increased expression of E-cadherin / C.C. Yates, C.R. Shepard, D.B. Stolz, A. Wells. // British Journal of Cancer. – 2007. – Vol. 96, № 8. – P. 1246 – 1252.
11. Модифікація методу оглядового забарвлення прикріплених клітинних культур гематоксином Бемера та еозином // "Сучасні проблеми викладання та наукових досліджень біології у ВНЗ України" – І Міжнар. наук. конф. – 8-9 жовтень 2014р. – тези доповідей – Дніпропетровськ. – 2014. – С. 41-42.
12. Модифікація методу зафарбування клітинних культур залізним гематоксином за Гейденгайном // "Біологія: від молекули до біосфери" – VIII Міжнар. наук. конф. – 3-6 грудня 2013 р. – тези доповідей. – Харків. – 2013. – С. 40-41.
13. Bonner J. Continued response following treatment with IMCQ225: an EGFR MoAB, combined with RT in advanced head and neck cancer / J.Bonner, M.Ezekiel, F. Robert // Proc. ASCO. – 2000. – Vol.19. – 5F.
14. Wee P. The EGF receptor is activated during mitosis and its cell signaling is mediated differently than in interphase (802.13) / P. Wee, H. Shi, J. Jiang, X. Chen, Z. Wang // The FASEB Journal. – 2014. – vol. 28. – №.1. – p.803-813.

О. Калмыкова, студ., Е. Джус, асп., Н.Сенчило, канд. биол. наук, Г. Островская, д-р биол. наук, Л. Гарманчук, д-р биол. наук
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР ПРИ ДЕЙСТВИИ АКТИВАТОРОВ И ИНГИБИТОРОВ РЕЦЕПТОРОВ С ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Исследованы морфо-биохимические изменения клеток линий Hela и Hep G2 при условиях воздействия активатора Toll-like рецептора тейхоевой кислоты, активатора человеческого рецептора эпидермального фактора роста и ингибитора этого рецептора Герцептина.

Ключевые слова: трансформированные клетки, ядерно-цитоплазматические соотношения, рецепторы с ферментативной активностью, эпителиально-мезенхимальный переход.

O. Kalmukova, stud., O. Dzhus, PhD stud., N. Senchylo, PhD., G. Ostrovska, DSc., L. Garmanchuk, DSc.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

MORPHO-FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF TRANSFORMED CELL CULTURES UNDER THE ACTION OF ACTIVATORS AND INHIBITORS OF RECEPTORS WITH ENZYMATIC ACTIVITY

Morphological and biochemical changes are investigated in cell lines Hela and Hep G2 under exposure of activator Toll-like receptor teichoic acid, activator of human epidermal growth factor receptor, and inhibitor of this receptor Herceptin.

Keyword: transformed cells, nuclear-cytoplasmic ratio, receptors with enzymatic activity, epithelial-mesenchymal transition.

УДК:581.14:635.93:581.522.4(477.60)

И. Крохмаль, канд. биол. наук
Институт эволюционной экологии Национальной Академии Наук Украины, Киев

ОСОБЕННОСТИ ОНТОГЕНЕЗА ВИДОВ РОДА *CAMPANULA* L., ИНТРОДУЦИРОВАННЫХ В СТЕПНУЮ ЗОНУ УКРАИНЫ

В статье рассмотрены особенности онтогенеза, структуры подземных органов видов рода Campanula в условиях интродукции в степной зоне Украины, уточнение их жизненной формы; выявление адаптивных признаков растений к новым условиям произрастания.

Ключевые слова: онтогенез, строение корневой системы, жизненная форма, адаптация, степная зона.

Вступление. Реализация жизненной стратегии растений связана с формированием защитно-приспособительных механизмов, обеспечивающих функциональную пластичность и эффективное потребление ресурсов среды [40; 43]. В настоящее время многочисленные данные по онтогенезу растений позволяют утверждать, что особи одного и того же вида, находящиеся в одинаковых или разных условиях обитания, могут иметь разные варианты онтогенеза [16]. П.Е. Булах [4] в своих работах рассмотрел принцип смены функционирования растений в ответ на экстремальные внешние воздействия среды на примере аннидации, эффекта Болдуина, преадаптации; смены функционирования на популяционном уровне (поливариантности онтогенеза, квазисекулярности). Изменение жизненных форм или формирование нескольких вариантов биоморф у растений при интродукции отмечались М.Т. Мазуренко [2001а; 2001б]. Работы многих исследователей посвящены анализу морфолого-биологических адаптаций растений разных систематических и экологических групп [5; 17; 31]. Травянистые растения характеризуются большим разнообразием биоморфологических структур, сформировавшихся в процессе эволюции под действием климатических, почвенных и ценологических факторов. Морфологическая эволюция подземных органов высших растений проходила по пути увеличения разнообразия форм, усложнения ветвления и тканевой дифференциации органов в связи с выполнением ими специфических функций – поглощение воды, минеральных веществ и прикрепления растений к субстрату. Формирование подземных побегов – специализированных органов вегетативной репродукции является важным адаптивным признаком, возникшим в процессе эволюции как приспособление к перенесению неблагоприятных периодов года [7; 8; 20; 22; 29]. Корневые системы и подземные побеги участвуют в динамическом взаимодействии растительных организмов со средой, обеспечивают их вегетативное размножение и расселение,

играют ключевую роль в устойчивости растений. Изучению биологических особенностей, онтогенеза, эволюции и распространению жизненных форм видов рода *Campanula* европейской части России посвящены многочисленные работы Т.В. Шулькиной [32-38]. Онтогенез некоторых редких видов рода *Campanula* в условиях культуры изучен И.Н. Аллаяровой [1; 2], Т.И. Фоминой [31], но это не охватывает всего разнообразия декоративных видов рода *Campanula* разной экологии, которые могут значительно расширить ассортимент многолетников для озеленения региона. С этих позиций большой интерес представляет изучение поливариантности их онтогенеза и способности к изменению строения корневой системы в условиях интродукции, что позволит выяснить уровень их адаптации, устойчивость и продолжительность существования в культуре, обосновать научные основы выращивания и размножения для включения в ассортимент растений для зеленого строительства в степной зоне Украины.

Цель работы – изучение особенностей онтогенеза, структуры подземных органов видов рода *Campanula* в условиях интродукции в степной зоне Украины, уточнение их жизненной формы; выявление адаптивных признаков растений к новым условиям произрастания.

Материалы и методы. Изучен онтогенез 14 видов рода *Campanula* разных эколого-ценотических групп, интродуцированных в Донецкий ботанический сад Национальной академии наук Украины: *C. thyrsoides* L., *C. rhomboidalis* Schur (альпийцы); *C. dolomitica* E.A. Busch, *C. bayerniana* Rupr., *C. baumgartenii* Becker, *C. komarovii* Maleev, *C. pyramidalis* L. (петрофиты среднегорного и субальпийского поясов), *C. grossheimii* Kharadze, *C. rotundifolia* L., *C. gieseckeana* Vest, *C. patula* L. (сильвопатанты), *C. takesimana* Nakai, *C. grossekii* Neuff. (сильванты), *C. sibirica* L. (пратостепанты). Онтогенез видов изучали согласно методике И.П. Игнатьевой [10]. Использовали классификацию возрастных состояний Т.А. Работнова [18] с дополне-

ниями А.А. Уранова [23]. Терминология периодов онтогенеза и возрастных состояний особей приведена согласно "Ценопопуляции растений" [30], морфологическая терминология – в соответствии с атласами по описательной морфологии высших растений [24; 25]. Характеристика листа приведена согласно морфологическим шкалам [39]. По способности к вегетативному размножению в условиях региона интродукции виды классифицировали согласно М.Т. Мазуренко, А.П. Хохрякову [12]. Систематика видов рода *Campanula* приведена по Т. Lammers [42].

Результаты и обсуждение.

Проросток (р). Появление всходов отмечено на 12-й (*C. rotundifolia*, *C. thyrsoides*), 15-й (*C. dolomitica*), 18-й (*C. grossekii*, *C. takesimana*), 24-й (*C. gieseckeana*), 26-й (*C. pyramidalis*, *C. sibirica*, *C. baumgartenii*, *C. patula*, *C. rhomboidalis*, *C. komarovii*), 31-й (*C. grossheimii*) день после посева семян. Самый длительный период всхожести наблюдали у *C. bayerniana* (44 дня). Наиболее короткий период от всходов до появления первого листа отмечен у *C. grossheimii* (5 дней), *C. takesimana* (9 дней), *C. baumgartenii*, *C. patula*, *C. rhomboidalis*, *C. komarovii* (11 дней), средний – *C. grossekii* (18 дней), длительный – *C. dolomitica*, *C. sibirica* (21 день), *C. rotundifolia* (24 дня), *C. thyrsoides* (25 дней). Количество листьев в розетке у проростков 1-2, исключение составляли *C. rotundifolia*, *C. dolomitica*, некоторые растения которых на этой стадии развития формировали 4 листа. Высота проростков колебалась от 0,8 см до 4,5 см (табл. 1). Форма семядолей разнообразная: овальная (*C. grossekii*, *C. rotundifolia*, *C. dolomitica*, *C. pyramidalis*, *C. sibirica*, *C. patula*, *C. komarovii*), яйцевидная (*C. gieseckeana*, *C. thyrsoides*, *C. bayerniana*, *C. baumgartenii*), эллиптическая

(*C. takesimana*) и широкояйцевидная (*C. grossheimii*). Крупные семядоли у *C. bayerniana*, *C. komarovii*, *C. grossheimii*. Форма первого листа округлая (*C. gieseckeana*, *C. baumgartenii*, *C. patula*), яйцевидная (*C. thyrsoides*, *C. bayerniana*, *C. sibirica*, *C. komarovii*). У проростков некоторых видов встречались листья разной формы: *C. grossekii*, *C. rotundifolia* – округлой и сердцевидной; *C. takesimana* – яйцевидной и широкояйцевидной; *C. dolomitica* – яйцевидной, широкояйцевидной и сердцевидной. Основание первого листа у большинства видов сердцевидное, у *C. thyrsoides*, *C. sibirica* клиновидное, у *C. gieseckeana*, *C. patula* плоское. Верхушка листа тупая, исключение составлял *C. takesimana*, у которого верхушка первого листа тупая или острая. Край листовой пластинки цельный, городчатый, пильчатый, реже выемчатый. Листья *C. rotundifolia*, *C. gieseckeana*, *C. baumgartenii*, *C. patula*, *C. rhomboidalis* не опушены, остальных изученных видов покрыты волосками. Длина листа варьировала от 0,4 до 2,0 см, ширина – от 0,3 до 1,7 см. Длина черешка листа колебалась от 0,3 до 2,0 см. Длина главного корня варьировала от 1,0 до 6,5 см. У большинства изученных видов он ветвился до 1-го порядка, у некоторых проростков *C. grossekii*, *C. rotundifolia*, *C. gieseckeana*, *C. sibirica* – до 2-го, *C. takesimana* – 3-го порядка. Насчитывалось от 4 до 20 боковых корней первого порядка, длина которых варьировала в пределах 0,4-5,0 см.

Итак, появление всходов отмечено на 12-44 день после посева семян. В течение 5-25 дней происходило формирование настоящего листа. Диагностическими признаками проростков являются: появление 1-2 настоящих листьев и боковое ветвление главного корня. Проростки *C. rotundifolia*, *C. dolomitica*, *C. takesimana*, *C. grossekii* отличались полиморфизмом.

Таблица 1. Морфометрические особенности проростков (р) и ювенильных растений (j) видов рода *Campanula* L. при интродукции в степной зоне Украины

Вид	Высота растения, см	Размер семядоли, см		Размер листа, см			Длина главного корня, см	Боковые корни		Длина гипокотыля, см
		длина	ширина	длина	ширина	длина черешка		количество, шт.	длина, см	
проросток (р); M±m (среднее арифметическое±ошибка)										
Campanula thyrsoides	0,8±0,2	0,3	0,2	0,5±0,2	0,3±0,1	1,0±0,1	2,7±1,2	8±3	0,4±0,1	1,0
C. rhomboidalis	1,0±0,1	0,2	0,2	0,3±0,1	0,3±0,1	0,9±0,3	1,5±0,3	2±1	0,4±0,1	0,5
C. dolomitica	3,5±0,5	0,5	0,4	2,1±0,4	2,0±0,3	2,3±0,3	5,0±0,9	20±3	5,0±2,0	1,0
C. bayerniana	3,4±0,4	0,5	0,4	0,7±0,3	2,0±0,7	2,0±0,1	1,6±0,5	4±1	0,5±0,1	0,7
C. baumgartenii	2,7±0,3	0,4	0,3	0,6±0,2	1,5±0,4	1,5±0,3	1,8±0,3	4±1	0,4±0,1	0,8
C. komarovii	2,0±0,1	0,6	0,4	0,9±0,2	1,2±0,3	1,2±0,2	2,2±0,7	7±2	0,6±0,3	1,0
C. pyramidalis	2,5±0,6	0,3	0,5	1,0±0,3	1,0±0,1	2,0±0,2	1,5±0,7	5±1	0,5±0,1	1,0
C. grossheimii	4,5±0,2	0,5	0,5	1,0±0,5	1,5±0,2	1,5±0,3	2,5±0,6	9±3	1,4±0,5	2,0
C. rotundifolia	3,0±0,1	0,4	0,3	1,3±0,2	1,3±0,1	2,5±0,4	6,0±1,8	6±1	0,6±0,2	1,0
C. gieseckeana	3,0±0,5	0,3	0,2	0,3±0,1	0,3±0,1	0,3±0,1	1,0±0,3	2±1	0,4±0,2	0,5
C. patula	1,0±0,1	0,2	0,2	0,3±0,1	1,6±0,2	1,6±0,2	2,0±0,2	4±1	0,4±0,2	0,8
C. takesimana	3,1±0,3	0,3	0,3	0,4±0,1	0,4±0,1	0,5±0,1	2,9±1,1	7±2	1,2±0,2	0,6
C. grossekii	2,2±0,2	0,3	0,3	1,0±0,1	1,1±0,1	1,5±0,2	6,5±2,1	14±2	2,3±0,5	1,0
C. sibirica	3,8±0,3	0,3	0,4	0,8±0,2	0,8±0,3	0,8±0,1	2,0±0,4	5±1	0,4±0,2	1,0
ювенильное растение (j); M±m (среднее арифметическое±ошибка)										
C. thyrsoides	4,0±0,2	-	-	0,11±0,1	0,6±0,1	0,5±0,1	3,2±0,4	12±5	1,1±0,2	1,0
C. rhomboidalis	3,6±0,7	-	-	0,7±0,1	0,75±0,2	2,9±0,5	5,0±0,9	6±1	0,9±0,2	1,0
C. dolomitica	3,5±1,0	-	-	2,1±0,4	2,0±0,4	2,3±0,3	5,0±0,4	20±5	4,5±1,3	1,0
C. bayerniana	4,0±0,3	-	-	2,2±0,3	2,15±0,6	5,4±0,6	14,3±2,1	10±2	7,1±1,2	1,5
C. baumgartenii	3,0±0,4	-	-	1,0±0,1	1,1±0,2	2,0±0,3	5,0±0,4	7±2	1,5±0,6	1,0
C. komarovii	2,0±0,2	-	-	1,8±0,2	1,75±0,3	2,7±0,4	11,3±1,7	20±5	5,9±0,9	2,0
C. pyramidalis	2,6±0,6	-	-	0,7±0,1	0,9±0,1	2,0±0,4	2,0±0,1	5±1	1,3±0,3	0,5
C. grossheimii	4,0±0,4	-	-	2,15±0,5	2,2±0,4	6,0±0,7	15,8±1,2	16±4	7,0±1,4	1,7
C. rotundifolia	9,0±1,7	-	-	1,3±0,1	1,3±0,1	2,5±0,4	6,0±0,5	6±2	0,6±0,2	1,0
C. gieseckeana	1,0±0,1	-	-	0,55±0,1	0,55±0,3	0,8±0,1	2,5±0,5	6±1	1,0±0,1	0,7
C. patula	3,5±0,3	-	-	1,25±0,3	1,35±0,3	4,2±0,5	2,25±0,2	4±1	1,3±0,8	1,2
C. takesimana	3,9±0,5	-	-	2,0±0,5	1,65±0,4	1,9±0,2	9,5±1,2	19±3	6,6±1,1	1,9
C. grossekii	2,2±0,5	-	-	1,0±0,2	1,1±0,2	1,5±0,2	6,5±0,7	14±4	2,3±0,6	1,0
C. sibirica	4,0±0,2	-	-	1,35±0,2	1,0±0,1	2,7±0,7	3,0±0,2	11±2	1,9±0,8	0,5

Ювенильное возрастное состояние (j) у исследованных видов рода *Campanula* наступало на 34-74 день от высева семян. Короткий период от всходов до наступления ювенильного возрастного состояния у *C. dolomitica* (19 дней); средний – у *C. patula*, *C. grossheimii*, *C. komarovii*, *C. rhomboidalis*, *C. grossekii*, *C. rotundifolia*, *C. thyrsoides*, *C. bayerniana*, *C. sibirica* (28-30 дней), длительный – у *C. takesimana*, *C. gieseckeana*, *C. baumgartenii*, *C. pyramidalis* (40 дней). Высота растений варьировала от 1,0 до 9,0 см. В розетке насчитывалось 3-4 листа, у некоторых растений *C. rhomboidalis* – 3-5 листьев. Семядоли у большинства исследованных видов на данной стадии развития сохранялись, исключение составляли *C. pyramidalis*, *C. bayerniana*, *C. sibirica*, *C. grossheimii*, *C. komarovii*. Форма ювенильных листьев большинства видов округлая, у *C. takesimana* яйцевидная, *C. grossheimii* округлая и широкояйцевидная, *C. thyrsoides*, *C. grossekii*, *C. rotundifolia* округлая и сердцевидная, *C. dolomitica* яйцевидная, широкояйцевидная и сердцевидная, *C. sibirica* яйцевидная и овальная. Основание ювенильных листьев изученных видов сердцевидное, за исключением *C. thyrsoides* – клиновидное. Верхушка ювенильных листьев изученных видов тупая. Край листовой пластинки у большинства видов пильчатый, городчатый, волнистый. У ювенильных растений *C. pyramidalis* отмечены листья с волнистым и городчатым краем, *C. gieseckeana* – цельным и выемчатым, *C. sibirica*, *C. komarovii* – городчатым и пильчатым. Длина главного корня варьировала от 2,0-3,2 до 9,5-17,5 см (табл. 1). Главный корень ветвился у большинства видов до 2-го порядка, у некоторых ювенильных растений *C. bayerniana* – до 3-го, *C. takesimana* – 4-го порядка. Больше количество боковых корней 1-го порядка отмечено у *C. grossekii*, *C. dolomitica*, *C. takesimana*, *C. grossheimii*, *C. komarovii* (15-20 штук). Длина боковых корней варьировала от 0,6 до 7,1 см. Длина гипокотыла исследованных видов составляла 0,5-2,0 см.

Итак, наступление ювенильного возрастного состояния отмечено на 34-74 день от высева семян. Диагностические признаки ювенильных растений: формирование 4-х листьев j-типа, увеличение порядка ветвления главного корня, удлинение гипокотыля. На данной стадии развития растения *C. takesimana*, *C. rhomboidalis*, *C. bayerniana* отличались морфологической поливариантностью онтогенеза.

Имматурное возрастное состояние (im) наступало на 60-90 день от высева семян. У *C. dolomitica* на 44-й, *C. grossekii*, *C. rotundifolia*, *C. thyrsoides*, *C. patula*, *C. komarovii*, *C. bayerniana*, *C. sibirica* – 55-й, *C. takesimana*, *C. gieseckeana* – 64-66-й, *C. rhomboidalis*, *C. grossheimii*, *C. baumgartenii* – 70-й день после появления всходов.

В розетке насчитывалось 6-8 листьев, исключение составляли *C. komarovii*, *C. rotundifolia* – 4 листа и

C. rhomboidalis – 8 листьев. Семядоли у всех исследованных видов отпадали. Высота растений составляла 2,5 – 13,0 см (табл. 2). На растениях большинства видов отмечены листья j- и im- типа: *C. grossekii* – яйцевидной, широкояйцевидной и округлой форм, *C. dolomitica* – сердцевидной, широкояйцевидной и округлой, *C. takesimana* – яйцевидной и широкояйцевидной, *C. grossheimii* – яйцевидной и округлой, *C. patula* – овальной и эллиптической. У некоторых видов на данной стадии развития отмечены только листья im-типа: *C. thyrsoides* – лопатчатой формы, *C. sibirica* ланцетной, *C. rhomboidalis* яйцевидной. У *C. gieseckeana*, *C. bayerniana*, *C. komarovii* форма листовой пластинки у листьев j- и im- типа одинакова. Основание листа у большинства исследованных видов сердцевидное, у *C. takesimana* сердцевидное и неравнобокое, у *C. thyrsoides*, *C. bayerniana*, *C. sibirica*, *C. patula*, *C. rhomboidalis* клиновидное. Верхушка листа тупая, исключение составляет *C. takesimana* с острой верхушкой. У большинства изученных видов край im-листа городчатый, у *C. grossekii* – городчатый или двоякогородчатый, *C. takesimana* – двоякопильчатый, *C. rotundifolia*, *C. gieseckeana* – волнистый, *C. rhomboidalis* – выемчатый или цельный. У большинства видов главный корень ветвился до 3-го порядка (*C. grossekii*, *C. dolomitica*, *C. takesimana*, *C. thyrsoides*, *C. bayerniana*, *C. komarovii*, *C. rhomboidalis*), у остальных до 2-го порядка. Длина главного корня варьировала от 3,5 до 18,0 см. У некоторых видов формировались придаточные корни, которые ветвились до 1-го (*C. grossekii*, *C. dolomitica*, *C. komarovii*) и 2-го порядка (*C. grossheimii*, *C. sibirica*, *C. pyramidalis*). Длина придаточных корней составляла от 3,0 до 11,0 см.

Итак, имматурное возрастное состояние (im) наступало на 60-90 день от высева семян. Диагностические признаки имматурных растений: формирование 6-7 листьев, усыхание семядолей, формирование придаточных корней, утолщение гипокотыля. Отмечена морфологическая поливариантность онтогенеза у *C. grossekii*, *C. dolomitica*, *C. komarovii*, *C. grossheimii*, *C. sibirica*, *C. pyramidalis*, которая проявлялась в том, что у некоторых особей формировались придаточные корни, которые ветвились до 1-2 порядка, корневая система их смешанного типа; другие особи характеризовались наличием только главного корня, корневая система их стержневая. В регионе интродукции глубокая корневая система формировалась у петрофитов субальпийских лугов, за исключением *C. grossekii*, который произрастает в кустарниках у подножия гор.

Виргинильное возрастное состояние (V) у исследованных видов наступало на 82-154 день от высева семян. Например, у *C. dolomitica* на 70-й, *C. grossekii* 78-й, *C. takesimana* 87-й, *C. rotundifolia* 120-й, *C. gieseckeana* 130-й день от появления всходов.

Таблица 2. Морфометрические особенности имматурных (im) и виргинильных (v) растений видов рода *Campanula* L. при интродукции в степной зоне Украины

Вид	Высота растения, см	Размер листа, см			Длина главного корня, см	Боковые корни		Придаточные корни		Гипокотиль, см	
		длина	ширина	длина черешка		количество, шт.	длина, см	количество, шт.	длина, см	длина	ширина
имматурное растение (im); max-min											
Campanula thyrsoides	3,2-3,5	2,9-3,0	1,4-1,6	-	15,0-17,0	18-20	4,0-6,5	-	-	1,9-2,1	0,3
C. rhomboidalis	7,5-8,5	0,6-0,7	0,6-0,7	0,5-0,6	17,0-19,0	10-20	3,0-20,0	-	-	0,6-0,7	0,2
C. dolomitica	7,4-7,8	3,0-3,9	3,2-4,0	4,0-4,5	12,5-14,5	25-35	6,0-8,0	3-4	3,0-10,0	1,3-1,5	0,3
C. bayerniana	7,0-9,0	2,7-3,7	3,2-3,8	10,0-13,0	11,0-12,0	15-25	8,0-15,0	-	-	0,9-1,1	0,2
C. baumgartenii	4,0-5,0	2,0-2,2	1,4-1,6	1,8-2,0	7,0-8,0	5-10	4,0-5,0	-	-	0,6-0,7	0,1
C. komarovii	5,0-6,0	1,8-2,2	2,4-3,4	3,0-4,5	8,0-10,0	15-25	4,0-7,0	1	4,5-5,5	0,9-1,0	0,2

Закінчення табл. 2

Вид	Высота растения, см	Размер листа, см			Длина главного корня, см	Боковые корни		Придаточные корни		Гипокотиль, см	
		длина	ширина	длина черешка		количество, шт.	длина, см	количество, шт.	длина, см	длина	ширина
<i>C. pyramidalis</i>	8,0-8,5	1,2-2,0	1,4-2,1	3,7-7,2	3,5-4,0	5-6	1,5-2,0	1	3,0-3,5	0,9-1,0	0,2
<i>C. grossheimii</i>	11,0-12,0	2,7-3,5	2,9-3,0	9,0-10,0	12,5-14,5	7-12	7,0-10,0	2	7,5-8,0	1,9-2,1	0,4
<i>C. rotundifolia</i>	2,5-2,7	0,8-0,9	0,8-1,0	2,3-2,5	4,0-5,0	5-15	2,0-4,0	-	-	0,4-0,6	0,1
<i>C. gieseckeana</i>	7,0-8,0	1,3-1,8	1,4-1,9	3,9-4,7	2,5-4,5	6-7	1,5-2,0	-	-	0,7-0,9	0,2
<i>C. patula</i>	4,2-4,7	1,5-1,6	0,9-1,2	2,3-3,5	4,5-6,5	5-6	3,5-4,7	-	-	0,5-0,7	0,1
<i>C. takesimana</i>	12,0-13,0	4,4-5,0	3,9-4,1	6,0-7,6	6,0-8,0	18-20	3,5-5,0	-	-	1,2-1,4	0,3
<i>C. grossekii</i>	11,2-11,5	3,5-4,9	4,0-4,6	5,8-7,8	10,5-11,5	25-30	5,0-7,0	2	7,0-7,5	1,8-2,2	0,3
<i>C. sibirica</i>	7,5-8,1	4,3-4,7	2,9-3,0	8,0-8,7	7,5-9,5	20-30	6,0-8,0	5-7	5,0-11,0	0,7-0,9	0,2
виргинильное растение (V); max-min											
<i>C. thyrsoides</i>	6,5-7,0	7,5-8,4	2,8-3,4	-	12,0-14,0	5-7	7,0-11,0	-	-	1,9-2,1	0,4
<i>C. rhomboidalis</i>	8,4-9,2	0,7-0,8	0,6-0,7	0,7-0,8	19,0-20,0	6-7	5,5-7,5	-	-	1,3-1,5	0,2
<i>C. dolomitica</i>	7,7-8,7	2,9-3,5	3,1-3,5	1,3-2,0	20,5-22,5	25-30	7,0-11,0	5-7	6,5-7,0	1,4-1,6	0,5
<i>C. bayerniana</i>	9,0-9,5	3,0-4,0	3,5-3,9	11,0-14,0	10,0-11,0	12-17	6,5-12,0	-	-	1,9-2,1	0,3
<i>C. komarovii</i>	6,5-7,0	2,0-3,0	2,4-3,4	3,0-4,5	8,0-10,0	4-5	4,0-7,0	1-2	4,0-6,0	1,9-2,1	0,2
<i>C. pyramidalis</i>	8,7-8,9	1,6-1,8	2,0-2,2	6,5-6,8	6,0-8,0	10-15	5,0-10,0	2-4	3,5-7,0	0,9-1,2	0,4
<i>C. grossheimii</i>	11,8-13,0	3,0-3,8	3,0-3,4	9,5-10,5	14,0-15,0	10-15	8,0-12,0	3-4	8,5-9,5	2,1-2,3	0,4
<i>C. rotundifolia</i>	10,0-12,0	1,2-1,6	1,8-2,0	4,0-8,2	13,0-15,0	10-20	5,0-12,0	-	-	1,5-1,6	0,4
<i>C. gieseckeana</i>	8,0-9,0	1,5-1,7	2,0-2,1	3,4-3,6	14,5-16,5	6-8	3,0-13,0	-	-	1,6-1,7	0,4
<i>C. patula</i>	5,0-6,0	1,5-1,8	1,0-1,4	2,9-3,6	5,0-7,0	7-9	7,5-10,0	-	-	1,6-1,9	0,2
<i>C. takesimana</i>	13,5-14,0	5,3-7,6	4,7-6,0	8,5-9,0	13,0-15,0	20-25	7,0-11,0	6-8	5,0-12,5	2,0-2,1	0,4
<i>C. grossekii</i>	10,0-12,0	3,0-3,5	2,8-3,0	6,7-8,0	8,3-8,7	25-35	4,0-5,0	3-5	6,5-7,5	1,4-1,6	0,3
<i>C. sibirica</i>	8,2-8,6	4,0-5,0	2,8-3,2	8,3-9,0	11,0-13,0	10-14	6,5-11,0	6-7	5,0-12,0	1,7-1,9	0,2

Молодые вегетативные растения (V₁). Высота растений колебалась от 5,0 см до 14,0 см (табл. 2). Количество листьев в розетке 8-10. Форма листовой пластинки у большинства исследованных видов округлая, у остальных яйцевидная, широкояйцевидная, лопатчатая. Основание листовой пластинки у большинства видов сердцевидное, у остальных клиновидное. Верхушка листа v-типа тупая, край листа у некоторых видов городчатый, у других двоякогородчатый (*C. grossekii*), пильчатый (*C. rotundifolia*), двоякозубчатый (*C. takesimana*), выемчатый (*C. gieseckeana*). Длина листа варьировала в пределах 1,2 – 8,4 см. Длина черешка листа исследованных видов колебалась от 1,3 до 14,0 см. Главный корень ветвился до 3-го, *C. gieseckeana* и *C. thyrsoides* – до 4-го порядка. Длина корня составляла 5,0 – 22,5 см. Боковых корней 1-го порядка насчитывалось от 5 до 35 штук, их длина 4,0-13,0 см. У *C. takesimana* встречались особи с придаточными корнями, не считая тех видов, у которых формирование придаточных корней происходило уже на иматурной стадии. У большинства видов придаточные корни ветвились до 2-го порядка, исключение составлял *C. komarovii* – до 1 порядка. Длина придаточных корней варьировала от 4,0 до 12,5 см.

Взрослые вегетативные растения (V₂). У *C. gieseckeana*, *C. rotundifolia*, *C. rhomboidalis* и *C. takesimana* отмечено боковое ветвление. На концах плагиотропных побегов, длина которых 1,0-2,0 см, образовывались 3-6 розеток с листьями v-типа. Причем у этих видов функционировал стержневой корень, но, благодаря плагиотропным подземным побегам они были способны к вегетативному естественному размножению в виргинильном возрастном состоянии в условиях региона интродукции. Вегетативное размножение, при котором образование и увеличение числа особей обычно происходит посредством отделения (партикуляция, сарментация) части вегетативного тела материнского растения с почкой, имеет большое значение для возобновления популяций многих видов. Если при споровом и семенном воспроизведении необходим целый ряд спе-

цифических экологических факторов, то вегетативное размножение проявляется даже при наличии минимальных условий для роста организма [11]. Вегетативная репродукция не связана с такими энергозатратами, которые приводят к изыманию части энергии из бюджета поддержания и прироста биомассы [3]. Преобладание вегетативного размножения над генеративным часто отмечается у ряда многолетних травянистых растений по сравнению с однолетними. Это зависит не только от неблагоприятных климатических условий, складывающихся в течение года, но и от биологических факторов [44]. Следовательно, сохранение способности вида к вегетативному размножению в новых условиях обитания на ранних стадиях развития является, по нашему мнению, одним из его адаптивных признаков.

У видов со смешанной корневой системой *C. grossekii*, *C. dolomitica*, *C. komarovii*, *C. grossheimii*, *C. sibirica*, *C. pyramidalis*, *C. takesimana* увеличивалось количество придаточных корней до 7-14 штук. В виргинильном возрастном состоянии для *C. patula*, *C. bayerniana*, *C. thyrsoides*, *C. gieseckeana*, *C. rotundifolia*, *C. rhomboidalis* характерна стержневая корневая система, придаточных корней на данной стадии развития у этих видов не образовывалось.

Итак, виргинильное возрастное состояние наступало на 82-154 день от посева семян. Диагностические признаки виргинильных растений: формирование 8-10 листьев, увеличение количества и ветвление придаточных корней, боковое ветвление надземных осей. В виргинильном возрастном состоянии у *C. grossekii*, *C. dolomitica*, *C. komarovii*, *C. grossheimii*, *C. sibirica*, *C. pyramidalis*, *C. takesimana* смешанная корневая система, *C. patula*, *C. bayerniana*, *C. thyrsoides*, *C. gieseckeana*, *C. rotundifolia*, *C. rhomboidalis* – стержневая. Эволюционный ряд изменения жизненных форм, построенный на основе структуры подземных органов и способности к вегетативному размножению, имеет следующее направление: стержнекорневые – кистекорневые – рыхлокустовые – длиннокорневищные – столонообразующие [6; 8; 9]. Формирование системы

придаточных корней обеспечивает увеличение питания растений, в некоторых случаях накопление запасных питательных веществ. Кроме того, почвы в новых условиях выращивания семян более плотные, и стрелковой корень не имеет возможности развиваться, поэтому на ранних стадиях развития формируются более мощные придаточные корни. Формирование придаточных корней на ранних стадиях развития особей, по нашему мнению, является адаптивным признаком видов рода *Campanula* в степной зоне Украины.

Генеративный период (g). В условиях степной зоны Украины большинство видов на второй год жизни вступают в генеративный период. Особи *C. pyramidalis* во второй вегетационный период не вступают в фазу цветения. Хотя, по данным некоторых авторов [28] *C. pyramidalis*, являющийся поликарпиком в природе, в культуре становится монокарпиком. Для *C. dolomitica*, *C. thyrsoidea*, *C. komarovii*, *C. takesimana*, *C. grossekii* характерна динамическая поливариантность онтогенеза, которая проявляется в том, что некоторые особи этих видов переходят к фазе цветения во второй вегетационный период, другие остаются в виргинильном возрастном состоянии. На второй год жизни боковое ветвление отмечено у *C. dolomitica*, *C. thyrsoidea*, *C. bayerniana*, *C. grossekii*, *C. grossheimii*, не считая *C. gieseckeana*, *C. rotundifolia*, *C. rhomboidalis* и *C. takesimana*, у которых оно отмечено в первый вегетационный период. Растения этих видов способны к медленному естественному вегетативному размножению в условиях региона интродукции, за исключением *C. gieseckeana*, *C. rhomboidalis*, у которых дочерние розетки не укореняются из-за сухости воздуха. В генеративном периоде отмирание главного корня характерно для *C. baumgartenii*, *C. thyrsoidea*, *C. bayerniana*, *C. grossekii*, *C. grossheimii*, *C. sibirica*, *C. rotundifolia*. У этих видов, за исключением *C. thyrsoidea*, *C. sibirica* формируются плагиотропные корневища. Смешанная корневая система, состоящая из главного и придаточных корней, отмечена у *C. dolomitica*, *C. takesimana*, *C. gieseckeana* и *C. rhomboidalis*. Корневая система *C. baumgartenii*, *C. dolomitica*, *C. komarovii*, *C. patula*, *C. bayerniana*, *C. grossekii*, *C. grossheimii*, *C. rhomboidalis*, *C. rotundifolia* ветвится до 3-го порядка, *C. thyrsoidea*, *C. gieseckeana*, *C. sibirica* – до 4-го, *C. takesimana* – до 5-го. В генеративном периоде у *C. komarovii*, *C. patula* выявлена морфологическая поливариантность онтогенеза, которая проявляется в строении корневой системы: у некоторых особей она кистевая, у других – стержневая.

***C. baumgartenii*.** В генеративный период на второй год развития вступили 100% растений. Во время цветения розеточные листья отмирали. На одном растении насчитывалось 20-22 генеративных неопушенных восходящих побега, на каждом из которых располагалось 22-34 цветка. Высота генеративных побегов составляла 41,0-54,5 см. Диаметр растения 15,0-16,0 см. Цветки синей окраски. Длина цветка 2,0-2,3 см, диаметр 2,2-2,5 см. Чашечка не опушена, длина ее 0,8 см. Длина трубки чашечки 0,4 см. Стеблевые срединные листья линейные или ланцетные, сидячие, цельнокрайние. Верхушка листьев острая, основание клиновидное.

Размер 6,3 x 0,5 см. Стеблевые верхушечные листья отличались такими же характеристиками, только были мельче, размер 4,2 x 0,25 см. Главный корень отмирал. Длина корневой системы 13,8 см, диаметр 5,0 см, ветвилась она до 3-го порядка. Придаточные корни образовывались в количестве 15 штук, длина их 8,0-14,0 см. На гипокотиле формировались тонкие плагиотропные корневища. Корневая система корневищно-кистевая (рис. 1). Жизненная форма – полурозеточный корневищно-кистевой гемикриптофит, монофит партикулирующий приподнимающийся.



Рис. 1. Генеративное растение *Campanula baumgartenii* Rupr

***C. dolomitica*.** Во второй вегетационный период 15-20% растений вступили в генеративный период. У растений наблюдали наличие бокового ветвления. На материнских растениях образовывалось 5-6 дочерних розеток. Высота растения 13,0-15,0 см, диаметр 25,0-27,0 см. На растении формировалось 1-2 генеративных побега, на каждом из которых располагалось 25-30 цветков белой окраски. Высота генеративного побега 21,0-28,0 см. Длина цветка 3,3-3,4 см, диаметр 1,8 см. Чашечка опушена, ее длина 1,5 см. Розеточные листья черешковые, треугольные или широкояйцевидные, опушены редкими короткими мягкими волосками. Основание листа сердцевидное, верхушка острая, край двоякогородчатый. Размер розеточного листа 5,5 x 5,5 см. Стеблевые листья сидячие, опушенные, узкопродолговато-яйцевидные, верхушка острая, основание плоское, край двоякогородчатый. Главный корень ветвился до 3-го порядка, длина его составляла 13,0 см. На главном корне насчитывалось 7-10 боковых корней 1-го порядка длиной 7,5-9,5 см. На гипокотиле формировалось 4-5 придаточных корней, которые ветвились до 3-го порядка, длина их 13,0-14,0 см. Корневая система смешанная. Длина корневой системы 14,0 см, диаметр 9,0 см. Размер гипокотиля 1,0 x 1,2 см (рис. 2). Жизненная форма – полурозеточный стержне-кистевой гемикриптофит, монофит партикулирующий.

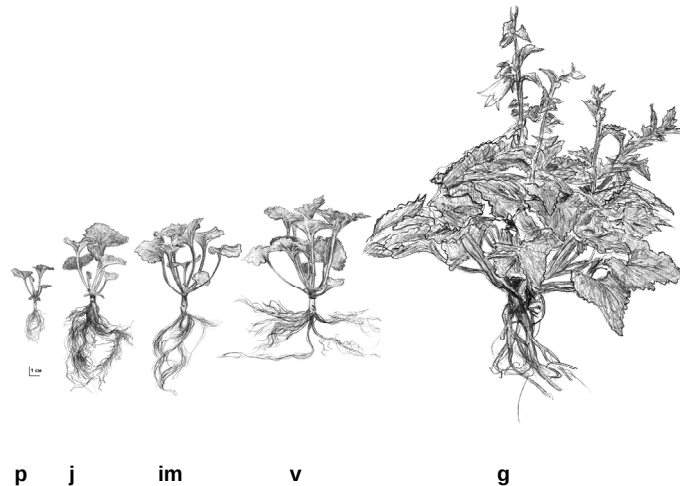


Рис. 2. Онтогенез *Campanula dolomitica* E.A. Busch в условиях степной зоны Украины: p – проросток, j – ювенильное возрастное состояние, im – имматурное возрастное состояние, v – виргинильное возрастное состояние, p-v – виргинильный период, g – генеративный период

C. thyrsoidea. В регионе интродукции на второй год жизни зацвели 10 % особей. Известно, что этот вид монокарпик, розеткообразующий "раз в два года", однако прегенеративный период у растений в естественных условиях обитания может растягиваться на 3-4 года или на 8-10 лет [41]. Динамическая поливариантность онтогенеза является естественной стратегией выживания вида в природе, так как в холодные годы на больших высотах при коротком вегетационном периоде цветущие растения погибают, не завершив полностью фенологический цикл, и не сформировав полноценные семена. В регионе интродукции естественная стратегия вида сохраняется, способствуя адаптации его к новым условиям. У особей *C. thyrsoidea* на второй год жизни отмечали наличие бокового ветвления, на растении формировались 4-5 дочерних розеток. На второй год развития у 10 % особей отмечено стеблевание – образование побега, в пазухах стеблевых листьев которого располагались побеги с цветками или отдельные цветки. Высота растений составляла 32,0-35,0 см. Стебель прочный, покрыт длинными, белыми, густыми волосками. Розеточные листья сидячие, опушенные, ланцетные или удлинненно-ланцетные, с пильчатым краем, заостренной верхушкой, плоским основанием, размером 11,8 x 1,5 см. Розеточные листья у генеративных растений отмирали. Нижние и верхние стеблевые листья узкояйцевидные, по всем другим характеристикам такие же, как и розеточные. Размер верхних стеблевых листьев 11,5 x 2,0 см, нижних 7,5 x 1,7 см. На растении насчитывалось 70-90 цветков. Цветки белой окраски, диаметр их 1,9-2,0 см, длина 2,0-2,5 см. Чашечка опушена, длина ее 1,0 см. Длина корневой системы 12,0 см, диаметр 10,0 см. Корневая система кистевая. Отмечено, что в новых условиях существования у молодых генеративных особей *C. thyrsoidea* происходит изменение строения типа корневой системы от стержневой в естественных местах обитания [41] к кистевой в условиях культуры в степной зоне Украины. Гипокотиль утолщенный, деревянистый, размером 3,0 x 1,3 см. От гипокотыля отходят 8-10 придаточных корней. Длина их составляет 6,0-7,0 см, ветвятся они до 4-го порядка (рис. 3). Жизненная форма – полурозеточный кистекорневой гемикриптофит, монофит партикулирующий.

C. komarovii. Весной второго года 80% растений вступили в фазу цветения. Высота растений 24,0-34,0 см. Стебель и листья опушены короткими, белыми, мягкими, редкими волосками. Розеточные листья в

период цветения отмирали. Стеблевые листья яйцевидные или удлинненно-яйцевидные, черешковые, с пильчатым краем, заостренной верхушкой, клиновидным основанием (рис. 4). Длина листовой пластинки 4,4-5,2 см, ширина 3,6 см, длина черешка 1,0-1,2 см. Чашечка цветка почти голая. Цветки синей окраски. Длина корневой системы 6,0-12,0 см, диаметр 4,0-8,0 см. Главный корень ветвился до 3-го порядка. Насчитывалось 8-12 боковых корней 1-го порядка, длина их 5,0-6,0 см. Размер гипокотыля 2,0 x 0,4 см. У *C. komarovii* наблюдали морфологическую поливариантность онтогенеза, которая проявлялась в разном строении корневой системы. У одних особей на гипокотыле образовывалось 1-2 придаточных корня длиной 6,0-7,0 см, которые ветвились до 3-го порядка, корневая система их смешанная, у других особей функционировал стержневой корень, придаточных корней не образовывалось, корневая система стержневая. После плодоношения растения отмирали, у некоторых особей до следующего года сохранялись открытые боковые почки. Жизненная форма – полурозеточный стержне-кистекорневой гемикриптофит, не способный к вегетативному размножению.



Рис. 3. Онтогенез *Campanula thyrsoidea* L. в условиях степной зоны Украины: j – ювенильное возрастное состояние, im – имматурное возрастное состояние, v – виргинильное возрастное состояние, g – генеративный период



Рис. 4. Онтогенез *Campanula komarovii* Maleev в условиях степной зоны Украины: j – ювенильное возрастное состояние, im – имматурное возрастное состояние, v – виргинильное возрастное состояние, g – генеративный период

C. patula. На второй год в генеративный период вступило 100% растений. На растении насчитывалось 3-4 генеративных побега. Высота растений составляла 27,0-55,0 см. Стебель и листья опушены короткими, редкими, белыми волосками. В генеративном периоде розеточные листья отмирали. Стеблевые листья сидячие, линейные, ланцетные, с выемчатым или зубчатым краем, заостренной верхушкой, стеблеобъемлющим основанием. Размер листа 3,5 x 0,7 см. На генеративном побеге насчитывалось 14-16 цветков сиреневой окраски. Диаметр их 1,8-2,8 см, длина 2,0-2,2 см. У *C. patula* отмечена морфологическая поливариантность онтогенеза, которая выражается в разном строении корневой системы, встречаются особи со стержневой и смешанной корневыми системами. Длина корневой системы 9,0-13,0 см, диаметр – 3,5-4,0 см. Длина гипокотили составляла 1,8-2,7 см, ширина 0,4-0,7 см. На некоторых особях формировались 2-6 придаточных корней длиной 6,5-11,5 см, которые ветвились до 3-го порядка (рис. 5). Растения после цветения отмирали. В редких случаях несколько боковых розеток сохранялись. По данным некоторых авторов [33], в условиях Петербурга у некоторых особей *C. patula* из пазух нижних листьев, а также из гипокотили развивались боковые побеги с короткой плагиотропной корневищной частью. В условиях степной зоны Украины этот вид в молодом генеративном состоянии утратил способность к вегетативному размножению. Жизненная форма – полурозеточный стержне-кистекорневой монокарпик.

C. giesseckiana. В генеративный период вступило 100% растений. Высота растения 32,0-69,0 см, диаметр 6,0-9,0 см. На растении 10-17 восходящих генеративных побегов. Стеблевые листья сидячие, линейные, голые, цельнокрайние, верхушка заостренная, основание нисходящее. На генеративном побеге насчитывалось 12-30 цветков голубой окраски. Длина цветка 1,5 см, чашечки 0,9 см. У некоторых особей *C. giesseckiana* из гипокотили развивались боковые побеги с короткой плагиотропной корневищной частью, и на расстоянии 4,0-5,0 см от материнского растения формировались дочерние розетки. Корневая система смешанная, ветвится до 5-го порядка. Длина ее 10,0 см, диаметр 5,0 см. На главном корне насчитыва-

лось 8-10 боковых корней 1-го порядка. Придаточных корней 4-5 штук, длина их 4,0-6,0 см, ветвились они до 4-го порядка. Растения способны к естественному вегетативному размножению (рис. 6).

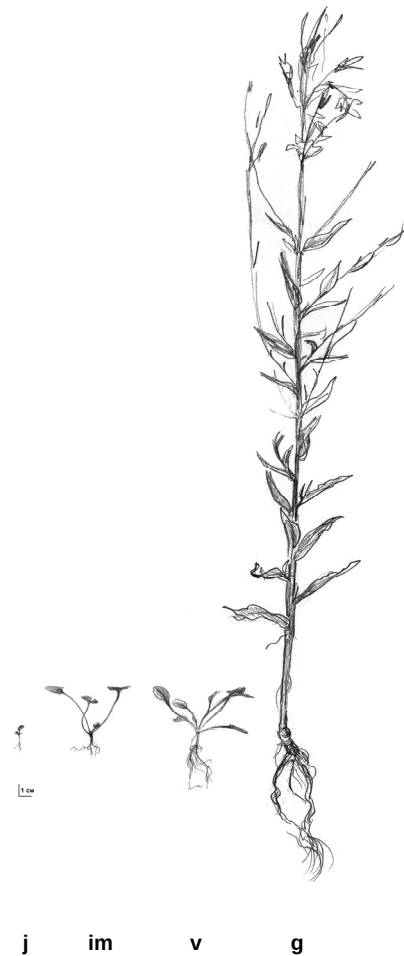


Рис. 5. Онтогенез *Campanula patula* L. в условиях степной зоны Украины: j – ювенильное возрастное состояние, im – имматурное возрастное состояние, v – виргинильное возрастное состояние, g – генеративный период

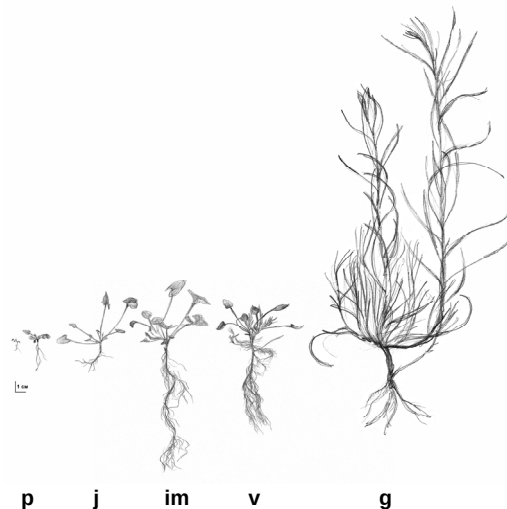


Рис. 6. Онтогенез *Campanula giesseckiana* Vest в условиях степной зоны Украины: p – проросток, j – ювенильное возрастное состояние, im – имматурное возрастное состояние, v – виргинильное возрастное состояние, p-v – виргинильный период, g – генеративный период

C. takesimana. В фазу цветения вступили 15% особей. Стебель и листья опушены короткими, редкими, белыми волосками. Розеточные листья отмирали. Нижние стеблевые листья черешковые, яйцевидные, верхушка заостренная, край двоякопильчатый, основание клиновидное. Размер 5,2 x 3,2 см, длина черешка 3,3 см. Верхние стеблевые листья сидячие, узко-яйцевидные, верхушка заостренная, край двоякопильчатый, основание стеблеобъемлющее, размер 6,5 x 2,8 см. Нижняя сторона листовых пластинок опушена гуще, чем верхняя, особенно по жилкам. Цветоносные побеги или отдельные цветки располагались в пазухах стеблевых листьев. Околоцветник крупный, сиренево-малиновой окраски, с точками бордового цвета внутри. Внутренняя поверхность венчика покрыта волосками. Длина цветка составляла 3,7 см, диаметр 1,5-1,7 см.

Длина чашечки 2,0 см. На второй год развития на растении формировался один генеративный побег, на котором располагались 20-22 цветка. Корневая система смешанная. Длина корневой системы 12,0 см, диаметр 10,0 см. Придаточных корней 8-10 штук, длина их 6,5-11,0 см, ветвились они до 5-го порядка. Размер гипокотили 1,5 x 1,1 см. Длина главного корня 9,8-10,0 см, ветвился он до 3-го порядка. Насчитывалось 9-10 боковых корней 1-го порядка, длина которых 7,5-8,0 см (рис. 6). Появление бокового ветвления у некоторых особей этого вида отмечено еще в прегенеративном периоде в первый год жизни, дочерние растения располагались на плагиотропных корневищах. Жизненная форма – полурозеточный стержне-корневищно-кистекорневой гемикриптофит с относительно медленным занятием территории.



Рис. 7. Онтогенез *Campanula takesimana* Nakai в условиях степной зоны Украины: p – проросток, j – ювенильное возрастное состояние, im – имматурное возрастное состояние, v – виргинильное возрастное состояние, p-v – виргинильный период, g – генеративный период

C. bayerniana. На второй год развития в фазу цветения вступили 80% растений. Высота растений 88,0-92,0 см. Стебель антоциановой окраски, опушен. Отмечено боковое ветвление, на растении формировалось 3-4 дочерних розетки с 3-6 листьями. Растения способны к естественному вегетативному размножению в регионе интродукции. Розеточные листья в период цветения сохранялись, узко-яйцевидные, опушенные короткими редкими волосками, более жесткими на нижней стороне, край листа двоякопильчатый, верхушка заостренная, основание сердцевидное. Размер 7,4 x 4,1 см, длина черешка 8,6 см. Стеблевые листья сидячие, край двоякопильчатый, верхушка заостренная, основание клиновидное. Нижние стеблевые листья узко-яйцевидные, размер их 7,5 x 4,0 см, верхние – удлинено-яйцевидные, размер их 4,1 x 1,5 см. На генеративном побеге насчитывалось 86-90 цветков, одновременно раскрытых 9-10. Цветки фиолетовой окраски, длина их 2,2 см. Длина чашечки 1,2 см. Чашечка опушена корот-

кими волосками. На плагиотропных корневищных побегах формировались дочерние розетки. Корневая система корневищно-кистевая. На растении насчитывалось 6-7 придаточных корней, которые ветвились до 3-го порядка. Длина их составляла 16,5-20,0 см, толщина 0,5-0,6 см. Длина корневой системы 23,0-25,0 см, диаметр 14,0-15,0 см. (рис. 7). Жизненная форма – полурозеточный корневищно-кистекорневой гемикриптофит с относительно медленным занятием территории.

C. grossekii. На второй год 90% растений вступили в генеративный период. Высота генеративного побега 102,0-105,0 см. Диаметр растений 21,0-22,0 см. Генеративный побег антоциановой окраски, разветвленный, цветоносные оси располагались в пазухах стеблевых листьев. На одном генеративном побеге насчитывалось 150 цветков, одновременно раскрытых 11-15. Цветки темно-сиреневой окраски, длина их 2,7-2,9 см, диаметр 2,5-2,7 см. Чашечка опушена, длина ее 1,2 см. Длина трубки чашечки 0,5 см. Листья покрыты корот-

ми, жесткими, редкими волосками. Стеблевые листья гуще опушены по жилкам нижней стороны листа. В фазе цветения розеточные листья функционировали. Они длинночерешковые, яйцевидные, основание сердцевидное, верхушка заостренная, край двоякозубчатый. В розетке насчитывалось 13-15 листьев. Размер листа 7,7 x 5,2 см, длина черешка 12,5 см. Нижние стеблевые листья яйцевидные, основание клиновидное, верхушка острая, край двоякозубчатый, размер их 7,3 x 4,0 см. Верхние стеблевые листья ланцетные, основание клиновидное, верхушка заостренная, край двоякопильчатый, размер 5,5 x 1,8 см. Отмечено боковое ветвление, на плагиотропных корневищных побегах образовывалось 2 дочерних розетки. Растения способны к медленному вегетативному размножению. Корневая система корневищно-кистекорневая, длина ее 15,0 см, диаметр 8,0 см, ветвится до 3-го порядка. Количество придаточных корней 15-16 штук, длина их 11,0-14,5 см. Размер гипокотила 1,5 x 1,2 см (рис. 8). Жизненная форма – полурозеточный корневищно-кистекорневой гемикриптофит с относительно медленным занятием территории.

C. grossheimii. На второй год развития 100% растений вступили в генеративный период. Высота растений 62,0-65,0 см. Стебель антоциановой окраски, опушен. Листья опушены короткими, жесткими, редкими волосками, особенно на жилках нижней стороны. В период цветения розеточные листья функционировали. Они длинночерешковые, яйцевидные, с сердцевидным основанием, заостренной верхушкой, двоякопильчатым

краем, размер их 8,5 x 5,2 см. Длина черешка листа 13,2-13,5 см. Стеблевые листья сидячие, узко-яйцевидные, основание клиновидное, верхушка заостренная, край двоякопильчатый. Размер стеблевого листа 7,0 x 3,0 см. Количество цветков на генеративном побеге 37-40 штук. Цветки темно-сиреневой окраски. Длина цветка 2,3 см, диаметр 2,2 см. Длина чашечки 1,1 см. Прицветники и чашечка опушены. Отмечено боковое ветвление, на плагиотропных подземных побегах формировалось 2 дочерних розетки с 5-7 листьями. Растения способны к медленному вегетативному размножению. На дочерних розетках образовывались придаточные корни в количестве 2-7, длиной 9,0-10,0 см, толщиной 0,2 см, ветвящиеся до 3-го порядка. Корневая система корневищно-кистевая, ветвилась до 3-го порядка. Длина ее составляла 16,5 см, диаметр 8,5 см. Количество придаточных корней 8-10 штук, длина их 14,0-15,0 см, толщина 0,5 см (рис. 9). По данным Т.В. Шулькиной [33] растения *C. grossheimii* в условиях Петербурга отличались быстрым развитием, большинство особей зацветало в первый год. Фаза розетки длилась всего 3-4 месяца. После цветения монокарпический побег отмирал, а в его базальной части у поверхности почвы закладывались закрытые почки возобновления. В условиях степной зоны Украины особи *C. grossheimii* массово зацветали на второй год жизни. Жизненная форма – полурозеточный корневищно-кистекорневой гемикриптофит с относительно медленным занятием территории.



Рис. 8. Онтогенез *Campanula bayerniana* Rupr. в условиях степной зоны Украины: im – имматурное возрастное состояние, v – виргинильное возрастное состояние, g – генеративный период



Рис. 9. Онтогенез *Campanula grossekii* Neuff. в условиях степной зоны Украины: p – проросток, j – ювенильное возрастное состояние, im – имматурное возрастное состояние, v – виргинильное возрастное состояние, p-v – виргинильный период, g – генеративный период



Рис. 10. Онтогенез *Campanula grossheimii* Kharadze в условиях степной зоны Украины: j – ювенильное возрастное состояние, im – имматурное возрастное состояние, v – виргинильное возрастное состояние, g – генеративный период

C. pyramidalis. В условиях степной зоны Украины на второй год жизни растения не вступали в фазу цветения. В розетке насчитывалось 9-12 листьев. Высота розетки 8,2-9,3 см, диаметр 8,2-9,0 см. Главный корень веретенообразно утолщен. Длина корневой системы 7,0-10,0 см, диаметр 4,0-5,5 см. Толщина корня 1,0 см. Размер веретеновидного утолщения 2,2-2,5 x 0,8-1,0 см. Длина стержневого корня 6,5-8,0 см, ветвился

он до 4-го порядка. Насчитывалось 2-5 придаточных корней, длина которых 3,0-7,7 см. На придаточных корнях также образовывались веретеновидные утолщения размером 1,7-1,8 x 0,4-0,5 см. Розеточные листья длинночерешковые, голые, эллиптические, основание плоское, верхушка заостренная, край пильчатый. Размер их 2,4-3,0 x 2,0-2,5 см (рис. 10).

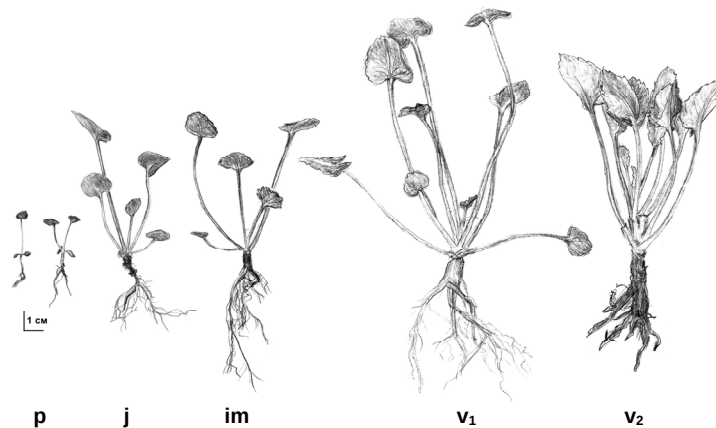


Рис. 11. Онтогенез *Campanula pyramidalis* L. в условиях степной зоны Украины: p – проросток, j – ювенильное возрастное состояние, im – имматурное возрастное состояние, v – виргинильное возрастное состояние, v₁ – молодые вегетативные растения, v₂ – взрослые вегетативные растения, p-v – виргинильный период

***C. rhomboidalis*.** На второй год 80% растений вступили в генеративный период. На растении насчитывалось 16 генеративных восходящих побегов. Диаметр растения 12,0-13,0 см. Розеточные листья слегка опушены, черешковые, округлые или широкояйцевидные, цельнокрайние, основание листовой пластинки сердцевидное, верхушка заостренная. Размер листа 2,3 x 0,4 см. Высота генеративного побега 21,0-25,0 см. Генеративные побеги опушены редкими короткими волосками. На одном генеративном побеге 11-14 цветков. На растении одновременно раскрыты 7-8 цветков. Цветки синей окраски, длина их 1,5 см, диаметр 1,4 см. Длина

чашечки 0,8 см, длина трубки чашечки 0,2 см. Отмечено боковое ветвление, на плагитропных побегах образовывалось 5 дочерних розеток на расстоянии 1,8-5,0 см от материнского растения (рис. 11). Корневая система смешанная, длина ее 14,0 см, диаметр 5,0 см. Длина стержневого корня 10,0 см. Главный корень тонкий, ветвился до 3-го порядка, на нем располагались боковые корни в количестве 25-30 штук, длина которых 1,0-4,0 см. На гипокотиле образовывались придаточные корни в количестве 24-26 штук, ветвящиеся до 3-го порядка. Длина их составляла 12,0-13,0 см.



Рис. 12. Генеративное растение *C. rhomboidalis* Schur

***C. sibirica*.** На второй год жизни 100% растений вступили в генеративный период. Наиболее сильные экземпляры имели боковые открытые почки. Из открытой терминальной почки розеточного побега и боковых почек развились репродуктивные побеги. На этих растениях насчитывалось 5-6 репродуктивных побегов. Высота генеративных побегов 61,0-65,0 см. Розеточные листья на материнском растении отмирали в фазе цветения, на боковых побегах функционировали. Розеточные листья овальные, с клиновидным основанием, тупой верхушкой, городчатым краем. Размер их 7,0 x 1,5 см. Стеблевые листья сидячие, ланцетные, со стеблеобъемлющим основанием, заостренной верхушкой, городчатым краем. Размер их 6,5-7,0 x 1,5-1,7 см. Листья обеих формаций опушены короткими редкими жес-

ткими волосками. На одном разветвленном генеративном побеге, развитом из терминальной почки, располагались 47-51 цветков. Продуктивность цветения в условиях региона интродукции выше в сравнении с местами естественного произрастания [15]. Размер цветка 2,2 x 1,4 см, окраска синяя. Чашечка опушена, длина ее 0,7 см. Длина корневой системы 9,0-10,0 см, диаметр 5,0-6,0 см. Размер гипокотиле 1,0 x 0,7 см. Корневая система кистевая, ветвилась до 4-го порядка. Количество придаточных корней 20-22, длина их 7,6-8,0 см (рис. 12). После плодоношения растения отмирали, у некоторых особей до следующего года сохранялись открытые боковые почки. Жизненная форма – полурозеточный кистекорневой монокарпик.

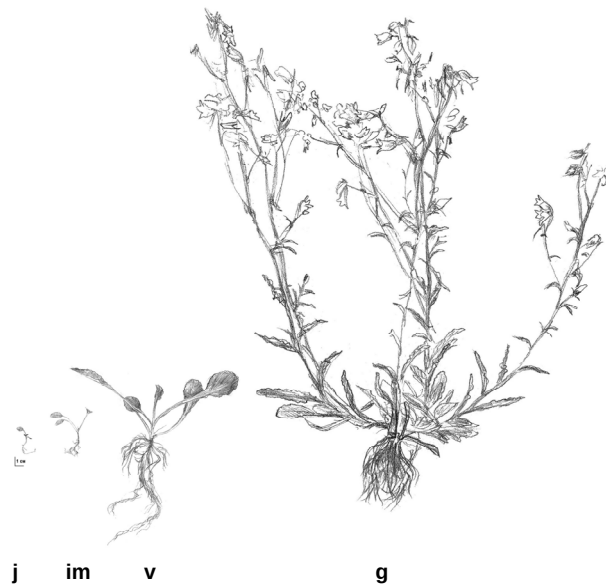


Рис. 13. Онтогенез *Campanula sibirica* L. в условиях степной зоны Украины: j – ювенильное возрастное состояние, im – имматурное возрастное состояние, v – виргинильное возрастное состояние, g – генеративный период

***C. rotundifolia*.** На второй год жизни 80% растений вступили в генеративный период. Стебли многочисленные, иногда одиночные, 15,0-40,0 см длиной, голые или иногда коротко и негусто опушенные. У *C. rotundifolia* розеточные листья функционировали только у молодых дочерних розеток, располагающихся на подземных побегах размножения. Розеточные листья длинночерешковые, почковидные, сердцевидно-округлые или сердцевидно-яйцевидные, крупнозубчатые или, реже, почти цельнокрайние; стеблевые листья узколанцетные, линейно-ланцетные, линейные или узколинейные, большей частью цельнокрайние, реже растрепанно-зубчатые, 4,5 см длиной, 0,3 см шириной. Цветки собраны в раскидистое метельчатое соцветие. Цветки голу-

бые, поникающие или наклоненные, 2,0-2,3 см в диаметре, с длинными цветоножками, до 2,0-2,5 см длиной. На одном растении развивалось до 25 цветков, из которых одновременно раскрыты 4-7. У генеративных растений формировались подземные плагиотропные побеги размножения – корневища с низовыми чешуевидными листьями и многочисленными придаточными корнями (рис. 13), на каждом из которых образовывалось 3-5 дочерних особей. Растения способны к естественному вегетативному размножению. Корневая система ветвилась до 5-го порядка. Стержневой корень отмирал. В условиях региона интродукции *C. rotundifolia* – полурозеточный кисте-корневищный гемикриптофит, монофит партикулирующий приподнимающийся.



Рис. 14. Онтогенез *Campanula rotundifolia* L. в условиях степной зоны Украины: j – ювенильное возрастное состояние, im – имматурное возрастное состояние, v – виргинильное возрастное состояние, g – генеративный период

По данным Т.В. Шулькиной [19] подземные органы *C. rotundifolia* представлены системой стержневого корня и многочисленными придаточными корнями, иногда образуются удлиненные корневища, надземные побеги которых часто не имеют розеточной части и сразу же формируют удлиненные междоузлия. По данным

Л.П. Рысина, Г.П. Рысиной [34] *C. rotundifolia* стержне-кистекорневой вид, для него характерно 2 основных типа системы подземных органов: 1) корневая система из глубоко идущего стержневого корня и ветвящихся плагиотропных тонких корневищ; 2) от корневищ вертикально вниз отходят многочисленные придаточные

корни до той же глубины, что и главный корень. Боковые корни ветвятся, длина корней 3-го и 4-го порядка обычно 0,5-1,0 см. В сосняках у *C. rotundifolia* сложная система неоднократно ветвящихся корневищ на глубине 2-3 см (в нижнем слое подстилки или в верхнем слое минеральной части почвы), всегда стержневой корень, уходящий на глубину 25-30 см (сосняк брусничный); на лугах 1 м и более, иногда на глубину до 180 см. На лугах на песчаной почве корень *C. rotundifolia* уходит на глубину 50-60 см, на суглинистой на 20 см. У *C. rotundifolia* строение корневой системы изменяется в зависимости от его ценотической приуроченности и характера почв в естественных местах обитания, лабильность корневой системы вида является адаптивным признаком и в новых условиях региона интродукции. Взрослые растения имеют полурозеточные моноциклические побеги, короткие и длинные корневища, кистевую корневую систему, но нередко и стержневой корень. У взрослых растений есть почки возобновления, закрытые специализированными чешуями, иногда наряду с открытыми незащищенными почками.

Выводы. Определено, что появление всходов исследованных видов рода *Campanula* наступало на 12-44 день после посева семян. В течение 5-25 дней происходило формирование настоящего листа. Ювенильное возрастное состояние наступало на 34-74 день после посева семян, имматурное – на 60-90 день, виргинильное – на 82-154 день. Диагностические признаки проростков видов рода *Campanula*: появление 1-2 настоящих листьев, боковое ветвление главного корня; ювенильных растений: формирование 4-х листьев j-типа, увеличение порядка ветвления главного корня, удлинение гипокотыля; имматурных растений: формирование 6-7 листьев, усыхание семядолей, формирование придаточных корней, утолщение гипокотыля; виргинильных растений: формирование 8-10 листьев, увеличение количества и ветвление придаточных корней, боковое ветвление надземных осей. Выявлено, что в условиях степной зоны Украины большинство видов рода *Campanula* на второй год жизни вступали в генеративный период.

Выявлена поливариантность онтогенеза некоторых видов рода *Campanula* в регионе интродукции, благодаря чему растения адаптируются к новым условиям произрастания. В виргинильном возрастном состоянии это морфологическая поливариантность онтогенеза у *C. grossekii*, *C. dolomitica*, *C. komarovii*, *C. grossheimii*, *C. sibirica*, *C. pyramidalis*, которая проявляется в различном строении корневой системы: у некоторых особей этих видов формировались придаточные корни, их корневая система смешанного типа; у других функционировал главный корень, их корневая система стержневая. В генеративном периоде – это морфологическая поливариантность онтогенеза у *C. komarovii*, *C. patula*, которая также проявлялась в различном строении корневой системы, и динамическая поливариантность у *C. dolomitica*, *C. thyrsooides*, *C. komarovii*, *C. takesimana*, *C. grossekii*, проявляющаяся в том, что некоторые особи этих видов на второй год жизни переходили в генеративный период, другие оставались на виргинильной стадии развития.

Определена жизненная форма и способность к вегетативному размножению видов рода *Campanula* при интродукции в степной зоне Украины. В генеративном периоде у *C. baumgartenii*, *C. thyrsooides*, *C. bayerniana*, *C. grossekii*, *C. grossheimii*, *C. sibirica*, *C. rotundifolia* происходило отмирание главного корня. Корневая система их корневищно-кистевая, за исключением *C. thyrsooides* и *C. sibirica*, у которых кистевого типа. Бо-

ковое ветвление отмечено у *C. dolomitica*, *C. thyrsooides*, *C. takesimana*, *C. bayerniana*, *C. grossekii*, *C. grossheimii*, *C. gieseckeana*, *C. rotundifolia* и *C. rhomboidalis*. Растения этих видов способны к медленному естественному вегетативному размножению в условиях региона интродукции, за исключением *C. gieseckeana*, *C. rhomboidalis*, у которых дочерние розетки не укоренялись из-за сухости воздуха. У *C. dolomitica*, *C. takesimana*, *C. gieseckeana*, *C. rhomboidalis*, наряду с придаточными корнями у всех видов и плагиотропными корневищами у трех последних, функционировал главный корень, их корневая система смешанного типа. Жизненная форма *C. baumgartenii*, *C. gieseckeana*, *C. rotundifolia*, *C. rhomboidalis* – полурозеточный корневищно-кистекорневой гемикриптофит, монофит партикулирующий, приподнимающийся; *C. bayerniana*, *C. grossekii*, *C. grossheimii* – полурозеточный корневищно-кистекорневой гемикриптофит с относительно медленным занятием территории; *C. takesimana* – полурозеточный стержне-корневищно-кистекорневой гемикриптофит с относительно медленным занятием территории; *C. dolomitica* – полурозеточный стержне-кистекорневой гемикриптофит, монофит партикулирующий; *C. thyrsooides* – полурозеточный кистекорневой гемикриптофит, монофит партикулирующий; *C. komarovii* – полурозеточный стержне-кистекорневой гемикриптофит, не способный к вегетативному размножению; *C. patula* – полурозеточный стержне-кистекорневой монокарпик; *C. sibirica* – полурозеточный кистекорневой монокарпик.

Выявлены адаптивные признаки видов рода *Campanula* в регионе интродукции: 1) формирование придаточных корней на ранних стадиях развития особей (*C. grossekii*, *C. dolomitica*, *C. komarovii*, *C. grossheimii*, *C. sibirica*, *C. pyramidalis*, *C. takesimana*); 2) динамическая (*C. dolomitica*, *C. thyrsooides*, *C. komarovii*, *C. takesimana*, *C. grossekii*) и морфологическая (*C. grossekii*, *C. dolomitica*, *C. komarovii*, *C. grossheimii*, *C. sibirica*, *C. pyramidalis*, *C. patula*) поливариантность онтогенеза; 3) сохранение способности вида к естественному вегетативному размножению (*C. dolomitica*, *C. thyrsooides*, *C. takesimana*, *C. bayerniana*, *C. grossekii*, *C. grossheimii*, *C. rotundifolia*); 4) изменение типа корневой системы со стержневой на кистевую, т.е. жизненной формы (*C. thyrsooides*); 5) сохранение в новых условиях естественной стратегии выживания вида, присущей ему в естественной среде обитания (*C. thyrsooides*).

Таким образом, при переносе в степную зону Украины отмечено изменение жизненной формы у альпийского *C. thyrsooides*, которое связано с модификацией структуры подземных органов. Этот процесс видоспецифичный. Нами не было отмечено зависимости изменения структуры подземных органов видов в зависимости от принадлежности их к определенной экологической группе. Виды *C. gieseckeana* и *C. rhomboidalis* в регионе интродукции утратили способность к естественному вегетативному размножению по сравнению с природными местообитаниями. Онтогенез изменился в новых условиях у *C. dolomitica*, *C. komarovii*, *C. takesimana*, *C. grossheimii*, *C. sibirica*, *C. pyramidalis*, *C. patula* (поливариантность).

Список использованных источников

1. Аллаярова И.Н. Начальный онтогенез редких видов колокольчика / И.Н. Аллаярова, Л.Н. Миронова // Вестник Омского государственного университета. – 2009. – № 6. – С. 32-34.
2. Аллаярова И.Н. Краткие итоги культивирования видов рода *Campanula* L. в Башкирии / И.Н. Аллаярова, Л.Н. Миронова // Бюллетень Главного ботанического сада. – 2014. – № 2. – С. 27-35.

3. Ахундова В.А. Морфогенез и продуктивность растений / В.А. Ахундова, З.А. Морозова, В.В. Мурашев, Е.А. Седова, Е.В. Туркова. – М., 1994. – 160 с.
4. Булах П.Е. Критерии устойчивости в интродукции растений / П.Е. Булах // Интродукция растений. – 2002. – № 2. – С. 43-53.
5. Волков И.В. Биоморфологические адаптации высокогорных растений / И.В. Волков. – Томск, 2007. – 412 с.
6. Голубев В.Н. О биологическом значении геофилии у травянистых растений / В.Н. Голубев // Ботанический журнал. – 1956. – Т.41, №2. – С. 236-242.
7. Голубев В.Н. Материалы к эколого-морфологической и генетической характеристике жизненных форм травянистых растений / В.Н. Голубев // Ботанический журнал. – 1957. – Т.42, №7. – С.1055-1072.
8. Голубев В.Н. О морфогенезе и эволюции жизненных форм травянистых растений лесостепной зоны / В.Н. Голубев // Бюллетень Московского общества испытателей природы. Отделение биологии. – 1957. – Т. LXII. – Вып.6. – С.35-57.
9. Голубев В.Н. О некоторых особенностях морфогенеза жизненных форм травянистых растений лесостепной зоны в связи с их эволюцией / В.Н. Голубев // Ботанический журнал. – 1959. – Т.44, №12. – С.1704-1716.
10. Игнатъева И.П. Онтогенетический морфогенез вегетативных органов травянистых растений / И.П. Игнатъева. – М., 1983. – 56 с.
11. Левина Р.Е. Репродуктивная биология семенных растений. (Обзор проблемы) / Р.Е. Левина. – М., 1981. – 96 с.
12. Мазуренко М.Т. Вегетативное размножение растений в связи с интродукцией / М.Т. Мазуренко, А.П. Хохряков // Бюллетень Главного ботанического сада АН СССР. – 1971. – Вып. 79. – С. 26-33.
13. Мазуренко М.Т. Направления изменений биоморф при интродукции / М.Т. Мазуренко // Бюллетень Главного ботанического сада. – 2001. – Вып. 182. – С. 87-96.
14. Мазуренко М.Т. Эволюционные перестройки онтогенеза растений / М.Т. Мазуренко // Гомологии в ботанике: опыт и рефлексия. – Труды IX школы по теоретической морфологии растений. – Санкт-Петербург, 2001б. – С. 236-243.
15. Мирошниченко Н.М. Деякі аспекти репродуктивної біології *Campanula sibirica* L., *C. taurica* Juz. та *C. talievii* Juz. в Криму / Н.М. Мирошниченко // Біологічні Студії / *Studia Biologica*. – 2014. – Том 8, №1. – С. 161-170.
16. Османова Г.О. Морфологические особенности особей и структура ценопопуляций *Plantago lanceolata* L. / Г.О. Османова. – Йошкар-Ола, 2007. – 184 с.
17. Пленник Р.Я. Стратегии биоморфологической микроэволюции полиморфного вида *Medicago falcata* L. в Сибири / Р.Я. Пленник. – Новосибирск, 2002. – 93 с.
18. Работнов Т.А. Жизненный цикл многолетних травянистых растений в луговых ценозах / Т.А. Работнов // Труды Ботанического института имени В. Л. Комарова АН СССР. – Сер. 3. Геоботаника. – М.; Л., 1950. – Вып. 6. – С. 77-204.
19. Рысин Л.П. Морфоструктура подземных органов лесных травянистых растений / Л.П. Рысин, Г.П. Рысина. – М., 1987. – 207 с.
20. Серебряков И.Г. Экологическая морфология растений / И.Г. Серебряков. – М., 1962. – 378 с.
21. Серебряков И.Г. О двух типах формирования корневищ у травянистых многолетников / И.Г. Серебряков, Т.И. Серебрякова // Бюллетень Московского общества испытателей природы. Отделение биологии. – 1965. – Т. 70. – Вып. 1. – С. 61-81.
22. Тахтаджян А.Л. Основы эволюционной морфологии покрытосеменных растений / А.Л. Тахтаджян. – М.;Л., 1964. – 301 с.
23. Уранов А.А. Возрастной спектр фитоценопопуляций как функция времени и энергетических процессов / А.А. Уранов // Биологические науки. – 1975. – № 2. – С. 7-34.
24. Федоров А.А. Атлас по описательной морфологии высших растений. Лист / А.А. Федоров, М.Э. Кирпичников, З.Т. Артюшенко. – М.; Л., 1956. – 302 с.
25. Федоров А.А. Атлас по описательной морфологии высших растений. Стебель и корень / А.А. Федоров, М.Э. Кирпичников, З.Т. Артюшенко. – М.; Л., 1962. – 352 с.
26. Фомина Т.И. Биоморфологические особенности *Campanula alliarifolia* Willd. (*Campanulaceae*) при интродукции в лесостепной зоне Западной Сибири / Т.И. Фомина // Растительный мир Азиатской России. – 2009. – № 2 (4). – С. 7-10.
27. Фомина Т.И. Биология некоторых видов рода *Campanula* L. в условиях культуры / Т.И. Фомина // Автореферат диссертации ученой степени на соискание степени кандидата биологических наук. – Новосибирск, 2002. – 18 с.
28. Халипова Г.И. Колокольчиковые / Г.И. Халипова. – М., 2006. – 99 с.
29. Хохряков А.П. Эволюция биоморф растений / А.П. Хохряков. – М., 1981. – 168 с.
30. Ценопопуляции растений (Основные понятия и структура). – М., 1976. – 217 с.
31. Черемушкина В.А. Биология луков Евразии / В.А. Черемушкина. – Новосибирск, 2004. – 280 с.
32. Шулькина Т.В. Морфология проростков у представителей рода *Campanula* L. флоры СССР / Т.В. Шулькина // Ботанический журнал. – 1974. – Т.59, № 3. – С. 321-331.
33. Шулькина Т.В. Типы жизненных форм и их значение для систематики *Campanula* L. / Т.В. Шулькина // Ботанический журнал. – 1977. – Т. 62, № 8. – С. 1102-1114.
34. Шулькина Т.В. Географическое распространение жизненных форм колокольчиков секции *Campanula* флоры СССР / Т.В. Шулькина // Бюллетень Московского общества испытателей природы. Отделение биологии. – 1980. – Т.85. – Вып. 1. – С. 73-87.
35. Шулькина Т.В. Основные направления эволюции жизненных форм в семействе *Campanulaceae* S. Str. / Т.В. Шулькина // Ботан. журн. – 1984. – Т.69, № 1. – С. 3-13.
36. Шулькина Т.В. О значении биоморфологических признаков в систематике растений / Т.В. Шулькина // Ботанический журнал. – 1986. – Т.71, № 5. – С. 569-579.
37. Шулькина Т.В. Архитектурные модели в семействе *Campanulaceae* S. Str., их география и возможные пути преобразования / Т.В. Шулькина // Ботанический журнал. – 1988. – Т.73, № 1. – С. 3-16.
38. Шулькина Т.В. Числа хромосом и жизненные формы некоторых критических видов рода *Campanula* (*Campanulaceae*) / Т.В. Шулькина, Е.А. Земскова // Ботанический журнал. – 1984. – Т.68, № 7. – С. 866-875.
39. Bazzaz F.A. The physiological ecology of plant succession / F.A. Bazzaz // Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics. – 1979. – №10. – P.351-371.
40. Kuss P. The biological flora of Central Europe. *Campanula thyrsoidea* L. / P. Kuss, H. Hafdis, J. Stocklin // Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics. – 2007. – Vol. 9. – P. 37-51.
41. Lammers T.G. World checklist and bibliography of *Campanulaceae* / Thomas G. Lammers. – Kew, 2007.
42. Larcher W. Physiological Plant Ecology / W. Larcher. – Berlin, Heidelberg, New York, 2003.
43. Muir A.M. The cost of reproduction to the clonal herb *Asarum canadense* (wild ginger) / A.M. Muir // Canadian Journal of Botany. – 1995. – V.73, №10. – P.1683-1686.

Надійшла до редколегії 15.03.15

I. Krokmal, PhD

Institute for evolutionary ecology of the National academy of sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

FEATURES OF ONTOGENESIS OF *CAMPANULA* L. SPECIES, THAT INTRODUCTION IN UKRAINE STEPPE

The article describes the features of ontogeny, the structures of underground species of Campanula in the conditions of introduction in the steppe zone of Ukraine, clarification of their life form; identification of adaptive traits of plants to new growing conditions.

Key words: ontogeny, structure of the root system, life form, adaptation, steppe zone.

I. Крохмаль, канд. біол. наук

Інститут еволюційної екології Національної Академії Наук України, Київ, Україна

ОСОБЛИВОСТІ ОНТОГЕНЕЗУ ВИДІВ РОДУ *CAMPANULA* L., ІНТРОДУКОВАНИХ В СТЕПОВУ ЗОНУ УКРАЇНИ

У статті розглянуто особливості онтогенезу, структури підземних органів видів роду Campanula в умовах інтродукції в степовій зоні України, уточнення їх життєвої форми; виявлення адаптивних ознак рослин до нових умов зростання.

Ключові слова: онтогенез, будова кореневої системи, життєва форма, адаптація, степова зона.

УДК 612.821.83; 612.821

А. Шестак, студ., Н. Філімонова, канд. фіз.-мат. наук,
І. Зима, канд. біол. наук

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

ВПЛИВ БІНАУРАЛЬНОГО РИТМУ НА АКТИВНІСТЬ ГОЛОВНОГО МОЗКУ ЛЮДИНИ

В результаті обстеження 20 осіб, віком 18-23 років, було виявлено, що 15-хв. прослуховування бінаурального звуку та бінаурального ритму по-різному впливають на активність головного мозку людини. Вплив бінаурального звуку був максимально вираженим на 9-12 хв. і в лівій півкулі з залученням фронтальних зон. Вплив бінаурального ритму значуще більшим був на 12-25 хв., причому задіяні були як ліва, так і права півкуля, при практично відсутній активації фронтальної зони.

Ключеві слова: бінауральний ритм, бінауральний звук, 200 Гц, 10 Гц, ЕЕГ, активність головного мозку.

Вступ. Бінауральний ритм був відкритий німецьким експериментатором В.Давом у 1839 році. Ефект бінаурального ритму виникає, коли звук різних, але близьких частот з стереонавушників, або динаміків надходить окремо в праве та ліве вухо. В цьому випадку мозок сприймає різницю частот як різницю фаз між сигналами, що надає інформацію про напрямок джерела надходження звуку. Як показав американський дослідник Роберт Монро на початку 50-х років XX ст., отримане накладання постійної різниці між вхідними сигналами викликає бінауральне биття на частоті, яка дорівнює різниці частот, якічують праве та ліве вухо. Таке биття можна відчувати, хоча частота биття знаходиться поза межами слухового порогу. Для того, щоб таке биття відчувалося, частота вхідних сигналів не повинна перевищувати 1000 Гц, а різниця частот повинна бути в інтервалі 1 – 30 Гц. Близько 30 Гц різниця частот може бути почута як деяка шорсткість, а коли різниця частот перевищує 30 Гц, два тона сприймаються окремо [1]. Бінауральний ритм краще сприймається, коли несуча частота не перевищує 440 Гц, бо вище цієї частоти він стає менш виразним, вище 1000 Гц зникає зовсім. На іншому кінці масштабу сигнали нижче 90 Гц обстежувати можуть плутати з тонами, які використовуються для створення бінаурального ритму [1]. Взаємодія сигналів від обох вух ймовірно відбувається в двох місцях слухового шляху – в superior olivary nucleus та в colliculus inferior і далі інформація надходить до ретикулярної формації середнього мозку, яка є активуючою системою, відповідальною за концентрацію уваги [2]. Таким чином, теоретично бінауральний ритм може впливати як на активацію мозку, так і безпосередньо навіязувати ритм, оскільки мозкова активність відбувається саме в діапазоні 1 – 30 Гц. Незважаючи на недостатньо дослідженні механізми впливу бінаурального ритму, з 1980 р. Інститутом Монро та їх послідовниками активно патентується та використовується бінауральна технологія впливу на психоемоційний стан людини. Наприклад, в [3] стверджується, що бінауральні ритми викликають синхронізацію півкулі головного мозку та покращують пам'ять, навчання, увагу, креативність та інші когнітивні функції. В [4] було встановлено, що несучі частоти 131 Гц, 147 Гц та 165-169 Гц можуть викликати сильну депресію, а бінауральні ритми 7 Гц, 14 Гц та 21 Гц на несучих частотах 257 Гц плюс 236 Гц (на ліве вухо) та 250 Гц плюс 243 Гц (на праве вухо) впродовж 20 хв. по 10 сеансів в першій місяць перебування матросів в підрозділі здатні компенсувати стресові аспекти адаптації. В [5] було виявлено, що вплив бінаурального ритму частотою 3 Гц менш виражений, ніж частотами 18 Гц та "резонансною", яка була близька до 10 Гц. Причому, сеанси в 20 с не призводили до значущих змін, а сеанси впродовж 10 хв. викликали зниження активності при прослуховуванні ритму з заплющеними очима та значуще покращували показники операторської діяльності в стані активного неспання. Активність мозку в альфа – діапазоні, яка є близькою до 10 Гц, пов'язують з релаксацією, станом спокою, але також і з

ефективним виконанням когнітивних завдань. Саме тому дослідження впливу бінаурального ритму в цьому діапазоні є актуальним. Так, в роботі [6] було показано значуще покращення когнітивних функцій під впливом бінаурального ритму 10,2 Гц впродовж 30 хв. Тобто, існують певні розбіжності в результатах, і головним залишається питання тривалості дії бінаурального ритму, яка викликає значущі зміни активності головного мозку людини. В якості несучої частоти ми вибрали 200 Гц, щоб уникнути негативних наслідків впливу частот до 200 Гц [4]. За мету ми обрали з'ясувати мінімальний час сприйняття бінаурального ритму, який призводить до значущих змін стану мозку людини. Також залишається відкритим питання наявності відмінностей у сприйнятті бінаурального звуку та бінаурального ритму. Тому **метою** роботи було дослідити вплив бінаурального звуку та ритму впродовж 15 хв. на активність головного мозку людини шляхом послідовного аналізу змін спектральних потужностей кожні 3 хв., та виявити на якому етапі вплив бінаурального ритму є найбільшим.

Об'єкт та методи досліджень. У дослідженні добровільно взяли участь 20 осіб, правші, віком 18-23 років, студенти 1-4 курсів КНУ імені Тараса Шевченка без музичальної освіти. За допомогою програми NCH Tone Generation v.3.07 (NCH Software, USA) було згенеровано два тони частотою 200 Гц та 210 Гц, які подавались в одній серії досліджень через навушники відповідно в праве та ліве вухо, а іншій – по 200 Гц в обидва вуха впродовж 15 хв. В усіх обстежуваних реєстрували електроенцефалограму (ЕЕГ) до початку обстеження (по 3 хв. фоновий запис з відкритими та закритими очима) та під час подачі звуків частотою 200 Гц та 210 Гц відповідно в різні вуха. Для реєстрації та аналізу ЕЕГ використовували комплекс "Нейрон-Спектр-4/ВП" (Нейро-Софт, Росія). Обстежуваних знаходились в звукоізолюваному приміщенні, з ними підтримувався аудіо-зв'язок. Запис ЕЕГ здійснювався монополярно, референтний електрод було розташовано на мочці вуха з кожної сторони, частота квантування ЕЕГ дорівнювала 500 Гц. Було використано мостикові посріблені електроди, які накладались за міжнародною системою 10-20 у 19 стандартних відведеннях. В кожному відведенні для частотних діапазонів ЕЕГ – дельта (0,5-3,9 Гц), тета (4,0-7,9 Гц), альфа (8-12,9 Гц), бета1 (13,0-19,9 Гц) та бета2 (20,0-35 Гц) обчислювались середня потужність спектру у відведенні – $S_{\text{середня}}$, $\text{мкВ}^2/\text{с}^2$. Статистичний аналіз даних проводили за допомогою пакету STATISTICA 6.0 (StatSoft, USA, 2008). Нормальність розподілів змінних перевірялась тестом Шапіро-Вілка. Оскільки всі субтести проходили одні і ті ж самі обстежувани в різні моменти часу (вибіркі є залежними), а розподіл практично всіх параметрів за критерієм Шапіро-Вілка був відмінний від нормального ($p < 0,05$), для порівняння двох груп було використано критерій Вілкоксона. Для опису вибіркового розподілу ненормально розподілених показників вказували медіану (M_e) і нижній (25%) та верхній (75%) квартилі: M_e [25%; 75%].

Результати та їх обговорення. В результаті проведеного аналізу було виявлено, що в дельта – діапазоні на 6 хв. прослуховування бінаурального звуку 200-200 Гц значуще підвищилась активність в правій фронтальній та правій тім'яній зонах, порівняно з результатами при закритих очах. Найбільші відмінності було виявлено на 9-12 хв., коли значуще зросла активність практично в обох півкулях головного мозку. На 12-15 хв. виявлено значуще пригнічення активності фронтальних зон (Рис. 1). Активність в дельта – діапазоні пов'язують з формуванням вхідного інформаційного потоку [7], таким чином, можна припустити, що при прослуховуванні бінаурального звуку на 3-6 хв. активувалась система уваги та розпізнавання слухових образів. Оскільки з монотонним ритмом важко було зв'язати якісь образи, задача не розв'язувалась, тому на 9-12 хв. вже були задіяні практично всі відділи головного мозку, що також не допомогло в монотонному звуку знайти якийсь сенс, тому на 12-15 хв. відбулась адаптація до вхідного інформаційного потоку, активність значуще знизилась. В тета – діапазоні не було виявлено значущих відмінностей, що можливо пояснюється тим, що перед обстежуваними не ставилась конкретна задача. В альфа-діапазоні на 3 хв. прослуховування бінаурального звуку порівняно з заплющеними очима значуще підвищилась

активність в правій скроневій зоні, а в подальшому поступово активність значуще підвищилась в фронтальній зоні та лівій та правій потиличних зонах, особливо на останніх 15 хв. (Рис. 1). Можливо, це можна пояснити залученням логіко – семантичного аналізу до почутих звуків та намаганням їх з чимось зв'язати, оскільки активність в альфа – діапазоні (десинхронізацію) пов'язують з пригніченням не релевантної інформації та ефективною розпізнавання [8]. Аналіз активності в бета1 – діапазоні виявив, що при прослуховуванні бінаурального звуку 200-200 Гц на 9 – 12 хв. значуще зростає активність в лівій тім'яній та скроневій зонах, а на 12 – 15 хв. підвищилась активність в потиличній зоні. (Рис. 1). Активність в бета1 – свідчить про активацію неспецифічної уваги [9] та логіко – семантичного аналізу на 9 – 12 хв., після чого активність значуще підвищилась в тім'яній та потиличній зонах, яка, можливо обумовлена була впливом ретикулярної формації. В бета2 – діапазоні найбільш значущі відмінності було виявлено на 9 – 12 хв. в лівій півкулі (Рис.1), що свідчило про активацію вербальних процесів логічного аналізу та пізнання "по-суті" [10]. Таким чином, при прослуховуванні бінаурального звуку найвища адаптаційна активність проявилась на 9 – 12 хв. з залученням вербального логіко – семантичного аналізу.

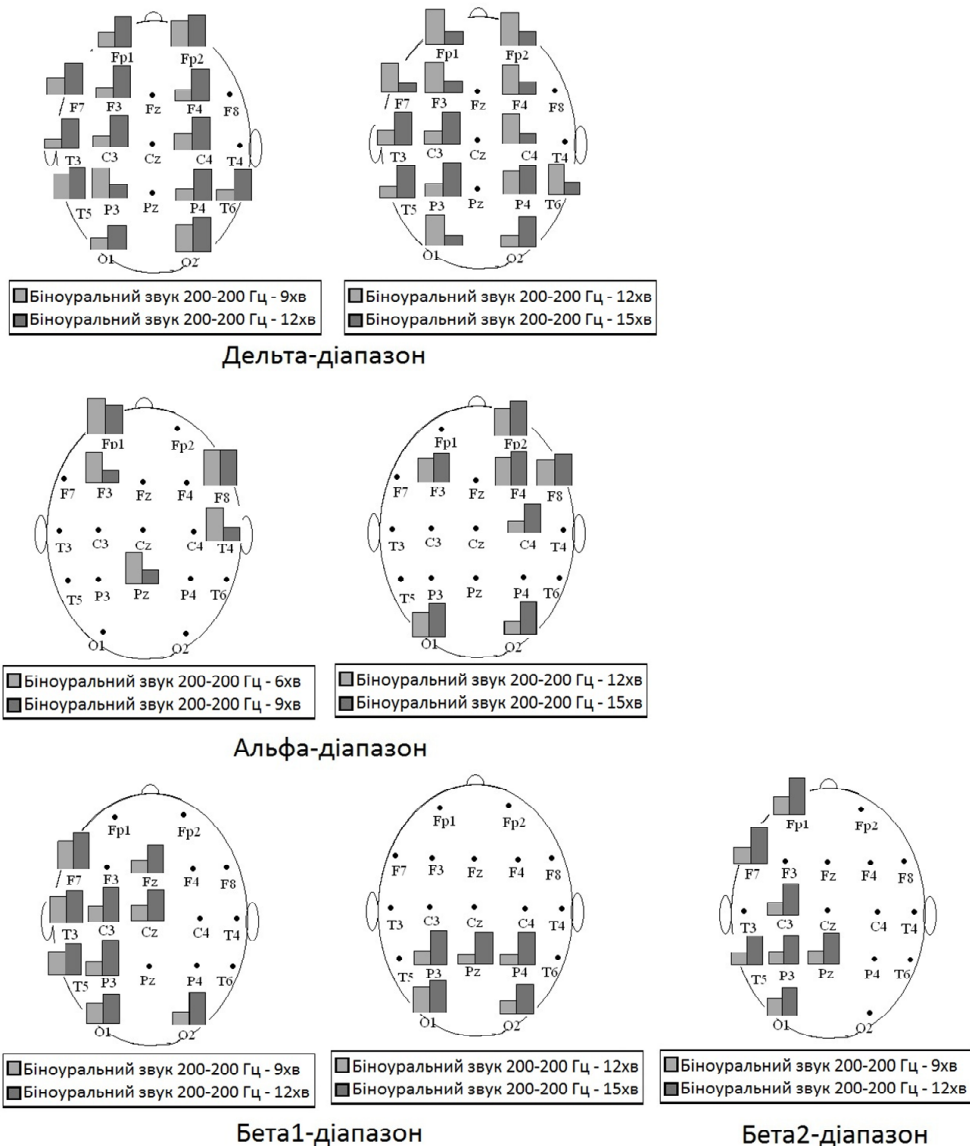


Рис.1. Значущі зміни спектральної потужності при сприйнятті бінаурального звуку 200-200 Гц, (n=10, $p \leq 0,05$)

Примітка: стовпчики на рисунку показують значення відповідних медіан

В роботі [11] показана роль фронтальних, скроневих та тім'яних зон в обробці звукової інформації, в т.ч. музики. Ці результати підтвердились і в нашій роботі. Однак, ми можемо уточнити динаміку адаптації до звукової інформації, так, в дельта – діапазоні активність значуще зросла практично в усіх зонах на 9 – 12 хв., а на

12-15 хв. – в лівих скроневій та тім'яній та правій потиличній зонах. В бета1 – діапазоні активність значуще підвищилась в лівій півкулі на 9 – 12хв, а в тім'яній зоні на 12-15 хв. В бета2 – діапазоні активність значуще підвищилась в лівій півкулі на 9-12 хв.

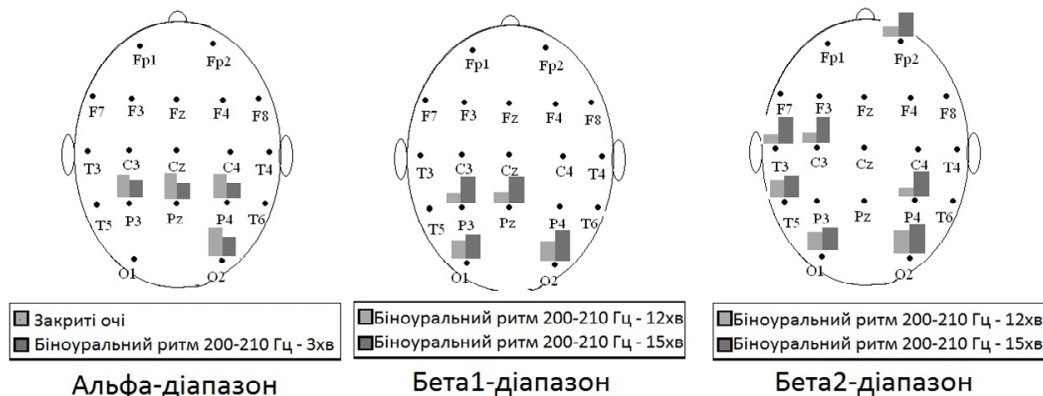


Рис.2. Значущі зміни спектральної потужності при сприйнятті бінаурального ритму 200-210 Гц, (n=10, p ≤ 0,05)

Примітка: стовпчики на рисунку показують значення відповідних медіан

Зазначимо, що обробка бінауральної слухової інформації 200 – 200 Гц та бінаурального ритму 200 – 210 Гц відбувалась зовсім по-різному. Значущих змін в активності головного мозку при прослуховуванні бінаурального ритму виявлено набагато менше. В дельта – та тета – діапазонах значущих відмінностей виявлено не було, що свідчить про незадіяність сенсорних каналів до сприйняття бінаурального ритму.

Було виявлено значуще зниження активності в альфа – діапазоні (синхронізація) на перших 3 хв. прослуховування бінаурального ритму в тім'яній та правій потиличній зонах, що може свідчити до залучення цих зон асоціативної кори до семантичного аналізу. В бета1 – діапазоні активність значуще підвищилась на 12 – 15 хв. в лівій та центральній тім'яній та потиличних зонах, що можливо пов'язано з активацією співставлення звуків різної частоти в superior olivary nucleus, colliculus inferior та ретикулярній формації. Результати активації в цьому діапазоні є схожими для ритму та звуку, в тому числі і для часових проміжків. В той час, як в бета2 – діапазоні при прослуховуванні ритму на відміну від звуку не були задіяні ліві фронтальні зони, а спостерігалась активація як лівої скроневої, так і правих пре фронтальної та тім'яної та потиличних зон.

Висновки. За результатами проведеного дослідження можна стверджувати, що 15-хв. прослуховування бінаурального звуку та бінаурального ритму по-різному впливають на активність головного мозку людини. Вплив бінаурального звуку був максимально вираженим на 9-12 хв. і в лівій півкулі з залученням фронтальних зон. Вплив бінаурального ритму значуще більшим був на 12-25 хв., причому задіяні були як ліва,

так і права півкуля, при практично відсутній активації фронтальної зони.

Список використаних джерел

1. Oster G. Auditory Beats in the Brain / Oster G. // Scientific American. – 1973. – V.229. – P. 94-102.
2. Kasprzak C. Influence of Binaural Beats on EEG Signal / Kasprzak C. // Acta Physica Polonica, A. – 2011. – V. 119. – P. 986-990.
3. Vesely. Brain balancing by binaural beat / Vesely, Michael A., Clemens, Nancy // United States Patent 7,769,439; Assignee: Infinite Z, Inc. (Campbell, CA) ; Family ID: 37024269; Appl. No.: 11/292,376. – August 3, 2010.
4. Асташко С. Э. Эффективность бинауральной синхронизации работы полушарий головного мозга в процессе психофизиологического сопровождения профессиональной адаптации корабельных специалистов / Асташко С. Э. Сысоев В. Н. // Журнал Экология Человека. – 2008. – № 6. – С.30 –34.
5. Калачев А.А. Динамика успешности операторской деятельности при бинауральном ритмическом воздействии / Калачев А.А. // Естественные и технические науки. – 2011. – №6. – С. 146-148.
6. Cruceanu V.D. Alpha brainwave entrainment as a cognitive performance activator / V. D. Cruceanu, V. S. Rotarescu // Cognition, Brain, Behavior. An Interdisciplinary Journal. – 2013. – V. XVII, No. 3. – P. 249-261.
7. Schroeder C.E. Low-frequency neuronal oscillations as instruments of sensory selection / C.E. Schroeder, P. Lakatos // Trends in Neurosciences. – 2009. – V.32 (1). – P.9-18.
8. Klimesch W. EEG alpha and theta oscillations reflect cognitive and memory performance: a review and analysis / W.Klimesch // Brain Research Reviews. – 1999. – Vol.29. – P.169-195.
9. Engel A.K. Beta-band oscillations—signalling the status quo / A.K.Engel, P.Fries // Current Opinion in Neurobiology. – 2010. – Vol.20. – P.156-165.
10. Kukleta M. Cognitive Network Interactions and Beta 2 Coherence in Processing Non-Target Stimuli in Visual Oddball Task / M.Kukleta, M.Brazdil, R.Roman and all. // Physiol. – 2009. – Res.58. – P.139-148.
11. Harris P.G. Frontal lobe contributions to perception of rhythmic group structure. An EEG investigation / P. G., R.B. Silberstein, G. E. Nield and A. Pipingas // Annals of the New York Academy of Sciences. – 2001. – V. 930, The biological foundations of music. – P. 414-417.

Надійшла до редколегії 12.05.15

А. Шестак, студ., Н. Филимонова, канд. физ.-мат. наук, И. Зима, канд. биол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

ВЛИЯНИЕ БИНАУРАЛЬНОГО РИТМА НА АКТИВНОСТЬ ГОЛОВНОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА

В результате обследования 20 человек, в возрасте 18-23 лет, было обнаружено, что 15 – мин. прослушивание бинаурального звука и бинаурального ритма по-разному влияют на активность головного мозга человека. Влияние бинаурального звука было максимально выраженным на 9-12 мин. и в левом полушарии с привлечением фронтальных зон. Влияние бинаурального ритма значимо больше было на 12-25 мин., причем задействованы были как левое, так и правое полушарие при практически отсутствующей активации фронтальной зоны.

Ключевые слова: бинауральный ритм, бинауральный звук, 200 Гц, 10 Гц, ЭЭГ, активность головного мозга.

A. Shestak, stud., N. Filimonova, Ph.D., I. Zima, Ph.D.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

INFLUENCE OF BINAURAL BEATS ON HUMAN BRAIN ACTIVITY

As a result of researches of 20 persons, aged 18-23 years, it has been found that 15 – min. listening to binaural sound and binaural beats have different effects on the activity of the human brain. Influence of binaural sound was the most expressed on 9-12 min. and in the left hemisphere involving the frontal zones. Influence of binaural beats was significantly larger in the 12-25 min. and have been involved as a left and right hemisphere in the substantial absence of activation of the frontal zone.

Keyword: binaural beats, binaural sound, 200 Hz, 10 Hz, EEG, brain activity.

УДК: 616-092.4

Т. Катрій, асп., Т. Вовк, канд. біол. наук, Н. Кравченко, канд. біол. наук, О. Савчук, д-р біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

РІВЕНЬ IGG ТА АДФ-ЗАЛЕЖНА АГРЕГАЦІЯ ТРОМБОЦИТІВ ЗА СИСТЕМНОГО ЧЕРВОНОГО ВОВЧАКА ТА РІЗНИХ ПІДТИПІВ ІШЕМІЧНОГО ІНСУЛЬТУ

Визначали концентрацію IgG у сироватці крові та АДФ-залежну агрегацію тромбоцитів. За атеротромботичного ішемічного інсульту не було виявлено змін сироваткової концентрації IgG. АДФ-залежна агрегація тромбоцитів була підвищена за системного червоного вовчака та атеротромботичного ішемічного інсульту.

Ключові слова: тромбоцити, IgG, атеротромботичний ішемічний інсульт, кардіоемболічний ішемічний інсульт, системний червоний вовчак.

Introduction. Systemic lupus erythematosus (SLE) is an immune-complex-mediated multi-systemic autoimmune condition of multifactorial etiology, which mainly affects young women. It is currently believed that the onset of SLE and lupus flares are triggered by various environmental factors in genetically susceptible individuals [1]. Patients with SLE exhibit a bimodal pattern of mortality, with those who have had the disease for 5 to 10 years being at increased risk of cardiovascular disease, particularly myocardial infarction. Elevated levels of conventional cardiovascular risk factors promote vascular damage resulting in impairment of normal endothelial function. In addition, autoantibodies directed against oxidized lipoproteins, along with chronic secretion of inflammatory cytokines and suppression of fibrinolytic parameters, are thought to increase atherogenesis [2]. Thromboembolic events are reported in approximately one third of antiphospholipid-positive patients. Antiphospholipid antibodies are a heterogeneous family of immunoglobulins that includes, among others, lupus anticoagulants and anticardiolipin antibodies [3].

Stroke is the second leading cause of death worldwide. One of the most common subtypes of ischemic stroke are atherothrombotic (34%) and cardioembolic (22%) strokes. It is known that antiphospholipid antibodies are an independent risk factor for initial occurrence of ischemic stroke, especially in young adults [4]. The most studied prothrombotic risk factors include deficiencies of natural coagulation inhibitors such as antithrombin III, protein C, and free protein S, and genetic polymorphisms encoding proteins that constitute the coagulation system: factor V Leiden (FVL) and factor II 20210A (FII 20210A). Furthermore, hyperhomocysteinemia, elevated lipoprotein (a) values, and the presence of antiphospholipid antibodies (APA) have been reported as additional prothrombotic risk factors (8-13). Although individual prothrombotic risk factors are less important, the presence of multiple prothrombotic factors may increase the risk of stroke. The distribution of prothrombotic risk factors may vary among different age groups, stroke subtypes, and different populations. Although modern technology allows accurate definition of the presence and type of stroke, in up to one third of the etiology still remains undetermined [5].

In both pathological conditions an important role plays dysfunction of blood coagulation, which is usually precedes thrombosis and thromboembolism. Such dysfunction can

occur due to changes in the concentration of factors affecting blood coagulation.

This study aimed to detect total IgG level in patients with systemic lupus erythematosus, atherothrombotic ischemic stroke and cardioembolic ischemic stroke with atrial fibrillation and to examine ADP-inducible platelet aggregation in patients with these pathologies.

Materials and Methods. The study involved 3 groups of patients – diagnosed with systemic lupus erythematosus, atherothrombotic ischemic stroke and cardioembolic ischemic stroke with atrial fibrillation.

The average age of patients with systemic lupus erythematosus (SLE) at the time of the study was 43.0 ± 2.1 years. The disease duration ranged from 3 to 20 years with an average of 10.8 ± 1.3 years. The diagnosis of SLE was based on the ACR criteria (1997) and formed according to the classification recommended by the Association of Rheumatologists of Ukraine (2002).

The average age of patients with atherothrombotic ischemic stroke (AIS) and cardioembolic ischemic stroke (CIS) at the time of the study was 73.62 ± 8.9 years. The diagnosis was formed on neuroimaging criteria. The study did not include patients in coma, patients with severe respiratory failure or suspected cancer. On the 1st day of hospitalization all patients received 325 mg of aspirin orally, followed by a daily 100 mg intake. On the 2nd day, patients received low molecular weight heparins (LMWH) in prophylactic doses.

The study also involved practically healthy donors of comparable age and sex with patients. All donors and patients or their families had been warned about the clinical research and provided written consent of participation.

Venous blood was collected by cubital vein puncture from 8 to 9 am on an empty stomach, in a test tube with a solution of sodium citrate (38 g/L) in a final ratio of 9:1.

IgG fractions were isolated from blood serum samples ($V=0.5$ ml) of patients and practically healthy donors as well as from serum samples ($V=0.5$ ml) of animals with chronic alcohol intoxication and animals of control group. IgG were obtained by affinity chromatography on protein A Sepharose. After elution with 100 mM glycine-HCl, pH 2.2 [6] fractions were loaded on Sephadex G75. Size-exclusion chromatography was carried out in 50 mM Na-phosphate buffer, pH 7.4 at a speed of 1 ml/min. The purity of IgG fraction was controlled by SDS-PAGE electrophoresis [7]. To restore the disulfide bonds 5% β -mercaptoethanol was used. Gels

were stained with 0.125% solution of coomassie g-250 in 25% isopropanol and 10% acetic acid. The concentration of IgG was presented as mean $\pm$ sd in mg per ml of blood serum.

The examination of ADP-inducible platelet aggregation was performed by platelet aggregometry on platelet-rich plasma, using 2.5 μ M ADP as agonist.

Results and Discussion. Pathological activation of the immune system occurs in many diseases. A number of antibodies that react with self-molecules referred to as natural autoantibodies occur in healthy subjects. These autoantibodies are mainly IgM. By contrast, IgG autoantibodies reflect a pathologic process and constitute a part of total pool of serum IgG [8].

Autoantibodies were detected in the serum of patients with systemic autoimmune diseases like systemic sclerosis, rheumatoid arthritis, diabetes, systemic lupus erythematosus, thyroiditis etc. [9, 10]. Under certain pathological conditions autoantibodies can serve as a predictor of the disease and its progression rate. For organ-specific autoimmune diseases such as type 1 diabetes and thyroiditis, autoantibodies can be detected in the peripheral blood years before damaging the hormone-

secreting cells [11, 12]. It is reported that autoantibodies against extracellular targets, such as circulating molecules or components of the extracellular matrix are the feature of diseases with a long latent period with no clinical manifestations [13]. Autoantibodies against cell surface receptors are clearly pathogenic and cause functional impairment of organs and body systems. The production of specific anti-platelet autoantibodies, mainly directed against GpIIb/IIIa, and their binding to platelet membrane plays an important role in the pathogenesis of SLE-associated thrombocytopenia [14]. As there might be a connection between total IgG level and and platelet function we have determined IgG concentration and ADP-inducible platelet aggregation in patients with SLE and different subtypes of stroke.

In patients with SLE we have observed substantial fluctuations of total IgG level among the individuals of the studied group. The average concentration was 7.45 $\pm$ 2.95 mg/ml, but a significant proportion of patients had higher level which reached 10.86 $\pm$ 1.99 mg/ml, exceeding donors by 43% (Table 1.).

Table 1. IgG concentration in serum of patients with systemic lupus erythematosus

Groups	IgG, mg/ml
Donors, n=30	7.58 $\pm$ 0.02
100% of SLE group (n=40)	7.45 $\pm$ 2.95
34% of SLE group (n=14)	10.86 $\pm$ 1.99*

* – P < 0.05 as compared to donors

In order to determine platelet function in patients with SLE we have detected ADP-inducible platelet aggregation (Tabl.2). It was shown that platelets of that group of patients had increased response to ADP by 40% relative to donors.

Table 2. ADP-inducible platelet aggregation in patients with SLE

Groups	Platelet aggregation, %
Donors, n=30	51.4 $\pm$ 1.3
SLE patients, n=40	72.3 $\pm$ 2.4*

* – P < 0.05 as compared to donors

In atherothrombotic ischemic stroke patients the increase in total IgG level was not detected, whereas cardioembolic ischemic stroke with atrial fibrillation was accompanied by the decreased activity of the immune system (Table 3.). On the 7th day after admission no significant quantitative fluctuations of IgG in serum of patients with atherothrombotic ischemic stroke was detected, while in patients with

cardioembolic ischemic stroke an increase in the concentration of IgG by 85% relative to the baseline (on admission to hospital) was observed. On our opinion, the registered elevation of antibody level in CIS on the 7th day on admission could not be referred to LMWH immunogenicity, as there was no significant changes in IgG level in AIS after the same treatment.

Table 3. IgG concentration in serum of patients with different types of ischemic stroke

Groups	IgG, mg/ml
Donors, n=20	7.58 $\pm$ 0.02
AIS (n=40) on admission to hospital	7.0 $\pm$ 0.5
AIS on the 7 th day	7.66 $\pm$ 0.71
CIS (n=40) on admission to hospital	5.0 $\pm$ 0.35*
CIS on the 7 th day	9.25 $\pm$ 0.34*

* – P < 0.05 as compared to donors

We have found significant elevation of platelet respond to ADP in patients with atherothrombotic ischemic stroke (table 4.). ADP-inducible platelet aggregation increased to 83.43 $\pm$ 8.93%, exceeding the norm by 25%. There was a

tendency towards increased platelet aggregation in patients with cardioembolic ischemic stroke, but significant difference was not detected.

Table 4. ADP-inducible platelet aggregation in patients with SLE

Groups	Platelet aggregation, %
Donors, n=15	66.28 $\pm$ 6.51
AIS, n=16	83.43 $\pm$ 8.93*
CIS, n=11	74.32 $\pm$ 11.11

* – P < 0.05 as compared to donors

Our data suggest that the development of cardioembolic ischemic stroke, as well as systemic lupus erythematosus, is accompanied by fluctuations in the level of total IgG in peripheral blood. However, no connection between total IgG level and ADP-inducible platelet aggregation was found.

Conclusions. We have shown that systemic lupus erythematosus as well as cardioembolic ischemic stroke was accompanied by fluctuations of IgG level in peripheral blood. For atherothrombotic ischemic stroke no significant changes of antibody concentration were detected. It was shown that patients with systemic lupus erythematosus and atherothrombotic ischemic stroke have elevated ADP-inducible platelet aggregation.

References

1. Mak A. Environmental factors, toxicants and systemic lupus erythematosus / Tay S.H. // International Journal of Molecular Sciences. – 2014. – Vol. 15, N 9. – P. 16043–16056. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
2. Thomas G.N. Accelerated atherosclerosis in patients with systemic lupus erythematosus: a review of the causes and possible prevention / Tam L.S., Tomlinson B., Li E.K. // Hong Kong Medical Journal. – 2002. – Vol. 8, N 1. – P. 26–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
3. Galli M. Lupus anticoagulants are stronger risk factors for thrombosis than anticardiolipin antibodies in the antiphospholipid syndrome: a systematic review of the literature / Luciani D., Bertolini G., Barbui T. // Blood. – 2003. – Vol. 101, N 5. – P. 1827–1832. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
4. Okuma H. Diagnosis and potential treatment of antiphospholipid syndrome-related mainly on ischemic stroke / Kitagawa Y. // Brain Nerve. – 2013. – Vol. 65, N 11. – P. 1319–1332. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
5. Lenicek Krljeza J. Multiple presence of prothrombotic risk factors in Croatian children with arterial ischemic stroke and transient ischemic attack /

Duranovic V., Bronic A., Coen Herak D. [et al.] // Croatian Medical Journal. – 2013. – 54(4). – P. 346–354. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

6. Huse K. Purification of antibodies by affinity chromatography / Böhme H.J., Scholz G.H. // Journal of Biochemical and Biophysical Methods. – 2002. – Vol. 51, N 3. – P. 217–231. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

7. Weber K. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis / Osborn M. // The Journal of Biological Chemistry. – 1969. – Vol. 244, N 16. – P. 4406–4412. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

8. Elkon K. Nature and functions of autoantibodies / Casali P. // Nature Clinical Practice Rheumatology. – 2008. – Vol. 4, N 9. – P. 491–498. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

9. Sharma S. Identification of Autoantibodies against Transthyretin for the Screening and Diagnosis of Rheumatoid Arthritis / Ghosh S., Singh L.K. [et al.] // PLoS One. – 2014. – Vol. 9, N 4. – P. 93905. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

10. Cozzani E. Serology of Lupus Erythematosus: Correlation between Immunopathological Features and Clinical Aspects / Drosera M., Gasparini G., Parodi A. // Autoimmune Diseases. – 2014. P.321–359. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

11. Wenzlau J.M. Novel Diabetes Autoantibodies and Prediction of Type 1 Diabetes / Hutton J.C. // Current Diabetes Reports. – 2013. – Vol. 13, N 5. – P. 608–615. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

12. Wang Y.P. Hemoglobin, iron, and vitamin B12 deficiencies and high blood homocysteine levels in patients with anti-thyroid autoantibodies / Lin H.P., Chen H.M., Kuo Y.S. [et al.] // The Journal of the Formosan Medical Association. – 2014. – Vol. 113, N 3. – P. 155–160. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

13. Leslie D. Autoantibodies as predictors of disease / Lipsky P., Notkins A.L. // Journal of Clinical Investigation. – 2001. – Vol. 108, N 10. – P.1417–1422. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

14. Michel M. Platelet autoantibodies and lupus-associated thrombocytopenia / Lee K., Piette J.C. [et al.] // British Journal of Haematology. – 2002. – Vol. 119, N 2. – P. 354–358. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Надійшла до редколегії 17.06.15

Т. Катрий, асп., Т. Вовк, канд. биол. наук, Н. Кравченко, канд. биол. наук, А. Савчук, д-р биол. наук
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

УРОВЕНЬ IgG и АДФ-ЗАВИСИМАЯ АГРЕГАЦИЯ ТРОМБОЦИТОВ ПРИ СИСТЕМНОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКЕ И РАЗЛИЧНЫХ ПОДТИПАХ ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА

Определяли концентрацию IgG в сыворотке крови и АДФ-зависимую агрегацию тромбоцитов. При атеротромботическом ишемическом инсульте не было выявлено изменений сывороточной концентрации IgG. АДФ-зависимая агрегация тромбоцитов была повышена при системной красной волчанке и атеротромботическом ишемическом инсульте.

Ключевые слова: тромбоциты, IgG, атеротромботический ишемический инсульт, кардиоэмболический ишемический инсульт, системная красная волчанка.

T. Katriy, PhD stud., T. Vovk, PhD., N. Kravchenko, PhD., O. Savchuk, DSc
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

THE LEVEL OF IgG AND ADP-INDUCIBLE PLATELET AGGREGATION IN PATIENTS WITH SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS AND DIFFERENT SUBTYPES OF ISCHEMIC STROKE

We have determined the concentration of IgG in the serum and ADP-inducible platelet aggregation. In atherothrombotic ischemic stroke patients no changes in serum concentrations of IgG were observed. ADP-inducible platelet aggregation was elevated in patients with systemic lupus erythematosus and atherothrombotic ischemic stroke.

Keywords: platelets, IgG, atherothrombotic ischemic stroke, cardioembolic ischemic stroke, systemic lupus erythematosus.

УДК 616.33-085.276.1.065-092.9

І. Фоменко, канд. біол. наук
Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, Львів

ВПЛИВ НЕСТЕРОЇДНИХ ПРОТИЗАПАЛЬНИХ ПРЕПАРАТІВ НА ПОКАЗНИКИ СИСТЕМНОЇ ТА H₂S В СЛИЗОВІЙ ОБОЛОНЦІ ТОВСТОЇ КИШКИ

Було досліджено вплив нестероїдних протизапальних препаратів різних механізмів дії на показники системного синтезу H₂S та NO в слизовій оболонці товстої кишки щурів.

Ключові слова: нестероїдні протизапальні препарати, гідрогену сульфід, нітрогену оксид, циклооксигеназа, слизова оболонка товстої кишки

Вступ. Нестероїдні протизапальні препарати (НПЗП) займають чільне місце у переліку факторів, що призводять до розвитку деструктивних змін органів травної системи [7, 13]. Найбільш виражений ульцерогенний вплив НПЗП чинять у шлунку, що, головним чином, пов'язано з інгібуванням синтезу простагландинів (ПГ) конститутивною ізоформою циклооксигенази (ЦОГ-1). Проте, слід зазначити, що хронічне вживання НПЗП є

одним з факторів ризику розвитку неспецифічного виразкового коліту і хвороби Крона [5]. Особливістю метаболізму ПГ в кишці є також те, що індукційна ізоформа циклооксигенази (ЦОГ-2) експресується в ентероцитах, а також ентеральних нейронах і гладких м'язах кишки не лише при патології, але й за фізіологічних умов [8]. При цьому продукти ЦОГ-1 і ЦОГ-2 регулюють не лише кровоплин, ангиогенез і продукування слизу,

© Фоменко І., 2015

але й регулюють моторику [9]. Роль систем синтезу газотрансмітерів, до яких належать нітрогену оксид (NO) та гідрогену сульфід (H_2S) в механізмах розвитку НПЗП-індукованих ентеропатій залишається недостатньо з'ясованою, при цьому переконливо доведено існування метаболічних взаємозв'язків між функціями газових медіаторів та системою ЦОГ/ПГ [11].

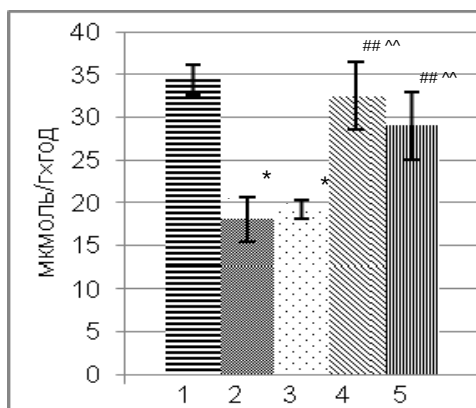
Матеріали і методи. Дослідження виконано на 40 щурах згідно з міжнародними умовами проведення експериментів з лабораторними тваринами. Щурів утримували на стандартному раціоні виварію, для проведення досліду тварин брали натще, забезпечували безперешкодний доступ до води.

Тварин було розподілено на 5 групи: 1) інтактні; 2) щурі, які отримували НПЗП індометацин (неселективний інгібітор циклооксигенази); 3) тварини, яким вводили НПЗП напроксен (неселективний інгібітор циклооксигенази); 4) щурі, які отримували АТВ-346 (H_2S -зв'язаний НПЗП); 5) тварини, яким вводили селективний інгібітор ЦОГ-2 целекоксиб. Усі досліджувані НПЗП вводили в дозі 10 мг/кг per os. Через 24 год тварин декапітували на тлі знеболювання тіопенталом натрію (40 мг/кг), виділяли товсту кишку, промивали фізіологічним розчином, відбирали механічно СОТК та гомогенізували її. У гомогенатах визначали концентрацію H_2S за реакцією з N,N-диметил-пара-фенілендіаміном у присутності $FeCl_3$ [2]. Рівень NO у гомогенатах СОТК оцінювали за вмістом суми нітрит-аніону (NO_2^-) та нітрат-аніону (NO^-) в реакції із використанням реактиву

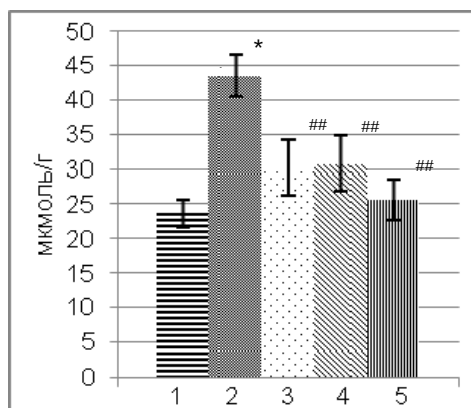
Грісса [1]. Активність NO-синтаз оцінювали за використанням $NADPH+H^+$ [12], активність аргінази визначали за методом [6], мієлопероксидази [4]. Інтенсивність процесів ліпопероксидації оцінювали на основі вмісту продуктів тіобарбітурової кислоти (ТБК) за методом Р.А. Тимирбулатова та Е.І. Селезнева [3].

Результати оброблено з використанням пакету Statistika 7,0 ANOVA з апостеріорним попарним порівнянням груп.

Результати та їх обговорення. Проведені нами дослідження впливу одноразового введення НПЗП не дозволили зафіксувати деструктивних макроскопічних змін поверхні СОТК, очевидно, для розвитку виразкових ушкоджень потрібен більш пролонгований період використання інгібіторів ЦОГ. Проте, вже навіть одноразове введення неселективних інгібіторів ЦОГ індометацину та напроксену суттєво (на 48 та 44 %, відповідно, $p \leq 0,01$) знижувало рівень H_2S (рис. 1-А). При застосуванні АТВ-346 концентрація останнього залишалась в межах норми, а селективне інгібування ЦОГ-2 спричиняло лише тенденцію до його зниження. Враховуючи те, що мікрофлора кишки приймає активну участь у формуванні пулу H_2S , а неселективні інгібітори чинять активний вплив на кількісний та видовий склад мікрофлори [10], зміни концентрації цього газового медіатора можуть бути наслідком, як інгібування його синтезу внутрішньоклітинними ферментами, так і зниження продукції мікрофлорою кишки.



А



В

Рис. 1. Концентрація H_2S – А та суми нітрит-аніону і нітрат-аніону (В) в гомогенатах СОТК за умов впливу НПЗП: 1 – контрольні тварини; 2 – індометацин; 3 – напроксен; 4 – АТВ-346; 5 – целекоксиб

Примітка: ** – $p < 0,01$ порівняно з показниками у тварин контрольної групи; ## – $p \leq 0,01$ порівняно з показниками при дії індометацину; ^^ – $p \leq 0,01$ порівняно з показниками при дії напроксену.

При неселективному інгібуванні ЦОГ індометацином вміст стабільних метаболітів обміну NO також зазнав змін, проте, скерованих на зростання його вмісту. Так концентрація суми нітрит-аніон + нітрат-аніон зростала на 90 %, $P \leq 0,05$ (рис. 1 – В). Використання інших НПЗП не спричиняло статистично достовірних змін концентрації стабільних метаболітів NO, можна відмітити лише

тенденцію до зростання вмісту суми нітрит-аніон + нітрат-аніон при введенні напроксену та АТВ-346.

Зміни активності NOS в гомогенатах СОТК при дії НПЗП у значній мірі пояснювали коливання вмісту нітрит- та нітрат-аніонів. Так вплив індометацину супроводжувався зростанням активності iNOS до $0,63 \pm 0,05$ нмоль/хв·г, тобто майже утричі ($p \leq 0,01$, табл. 1).

Таблиця 1. Активність ізоформ NOS та аргінази в СОТК за умов впливу НПЗП ($M \pm m$)

Групи тварин	Активність iNOS, нмоль/хв·г	Активність cNOS, нмоль/хв·г	Активність аргінази, мкмоль/хв·г
Контроль, n=8	$0,23 \pm 0,08$	$0,49 \pm 0,09$	$0,35 \pm 0,02$
Індометацин, n=8	$0,63 \pm 0,05^{**}$	$0,33 \pm 0,09$	$0,21 \pm 0,01^{**}$
Напроксен, n=8	$0,45 \pm 0,10^{**}$	$0,29 \pm 0,12^{**}$	$0,19 \pm 0,03^{**}$
АТВ-346, n=8	$0,34 \pm 0,13$	$0,26 \pm 0,15^{**}$	$0,20 \pm 0,02^{**}$
Целекоксиб, n=8	$0,38 \pm 0,07^{**}$	$0,18 \pm 0,54$	$0,18 \pm 0,02^{**}$

Примітка: ** $p < 0,01$ порівняно з показниками у тварин контрольної групи

Дія напроксену на АТВ-346 була односпрямованою і характеризувалась змінами перерозподілу ізоформ NOS. Так, хоч загальна активність NOS залишалась практично незмінною, але активність iNOS суттєво зростала, а активність cNOS значно знижувалась схоже у випадку впливу цих обидвох НПЗП. Вплив целекоксибу характеризувався тенденцією до зниження активності загальної NOS за рахунок зниження майже удвічі ($p \leq 0,01$) активності cNOS. Активність аргінази в СОТК

усіх груп тварин, що підлягали впливу НПЗП знижувалась в усіх досліджуваних групах.

Активність мієлопероксидази в СОТК проявляла тенденцію до зростання в усіх досліджуваних групах (рис. 2 – А). Інтенсивність процесів ліпопероксидації зростала у відповідь на інгібування ЦОГ (рис. 2 – В). Проте статистично достовірні зміни спостерігали виключно у випадку неселективного інгібування ЦОГ.

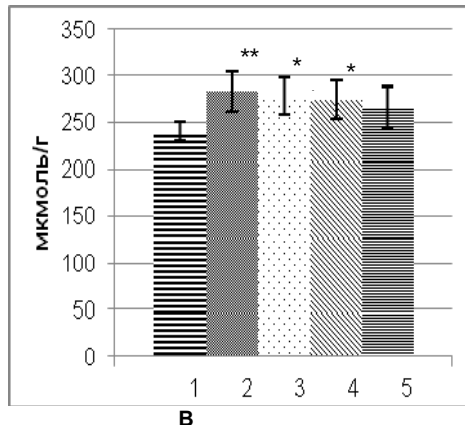
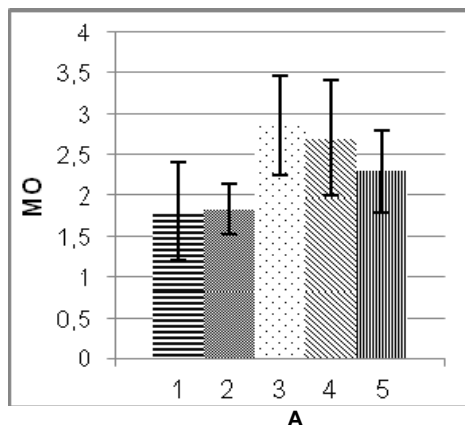


Рис. 2. Активність мієлопероксидази (А) та концентрація ТБК-активних продуктів в гомогенатах СОТК за умов впливу НПЗП: 1 – контрольні тварини; 2 – індометацин; 3 – напроксен; 4 – АТВ-346; 5 – целекоксиб

Примітка: ** – $P \leq 0,01$ – порівняно з показниками у інтактних тварин

Вміст ТБК-активних продуктів за умов дії індометацину підвищувався на 18 % ($p \leq 0,01$), напроксену на 15 % ($p \leq 0,01$), АТВ-346 на 14 % ($p \leq 0,05$); вплив целекоксибу зумовив тенденцію до зростання концентрації ТБК-активних продуктів. Активування процесів ліпопероксидації за умов впливу НПЗП є наслідком формування оксидативного стресу, що за умов підвищення продукції NO також зумовлює розвиток нітрозативного стресу. Втрата за таких умов антиоксидантного потенціалу H_2S , може служити передумовою для формування деструктивних ушкоджень СОТК.

Висновки. Отримані результати свідчать, що ключовими біохімічними подіями, що мають місце в СОТК при використанні неселективних інгібіторів ЦОГ є нітро-зо-оксидативний стрес та зниження концентрації H_2S . При введенні АТВ-346 за рахунок вивільнення H_2S , а целекоксибу за рахунок селективного блокування ЦОГ-2 біохімічні зміни були менш вираженими.

Список використаних джерел

1. Кіселик І.О. Особливості визначення нітратів та нітритів в периферичній крові у хворих на вірусні гепатити та при синдромі жовтяниці іншої етіології / І.О. Кіселик, М.Д. Луцик, Л.Ю. Шевченко // Лабораторна діагностика. – 2001. – № 3. – С. 43-45.
2. Ольховський О.С. Вплив пропаргілліцину та натрію гідрогенсульфіду на вміст H_2S і показники про-антиоксидантної системи в міокарді щурів різного віку / О.С. Ольховський, Н.В. Заїчко // Медична хімія. – 2013. – Т. 15, № 4. – С. 10-15.
3. Тимурбулатов М.А. Метод підвищення свободнорадикального окислення ліпидосодержащих компонентів крові и его диагностическое значение / М.А. Тимурбулатов, Е.И. Селезнев // Лабораторное дело. – 1981. – № 4. – С. 209-211.
4. Bradley P. P. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation / P.P. Bradley, R.D. Christensen, G. Rothstein //

Blood. – 1982. – Vol. 60. – P. 618-622. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

5. Coruzzi G. Gastrointestinal safety of novel nonsteroidal antiinflammatory drugs: selective COX-2 inhibitors and beyond / G. Coruzzi, N. Venturi, S. Spaggiari // Acta Biomed. – 2007. – Vol. 78. – P. 96-110. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

6. Davis R. H. Utilization of Exogenous and Endogenous Ornithine by *Neurospora crassa* / R. H. Davis, J. J. Mora // Bacteriology. – 1968. – № 96. – P. 383-388. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

7. Fomenko I. Effects of conventional and hydrogen sulfide-releasing nonsteroidal anti-inflammatory drugs in rats with stress-induced and epinephrine-induced gastric damage / I. Fomenko, A. Sklyarov, T. Bondarchuk [et al.] // Stress. – 2014. – Vol. 17, №6. – P. 528-537. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

8. Fornai M. Emerging role of cyclooxygenase isoforms in the control of gastrointestinal neuromuscular functions / M. Fornai // Pharmacol Ther. – 2010. – Vol. 125, №1. – P. 62-78. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

9. Fornai M. Role of cyclooxygenase isoforms in the altered excitatory motor pathways of human colon with diverticular disease / M. Fornai, R. Colucci, L. Antonioli [et al.] // Br J Pharmacol. – 2014. – Vol. 171. – № 15. – P. 3728-40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

10. Konturek P.C. Stress and the gut: pathophysiology, clinical consequences, diagnostic approach and treatment options / P.C. Konturek, T. Brzozowski, S.J. Konturek // Journal of physiology and pharmacology. – 2011. – Vol. 62. – P. 591-599. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

11. Mollace V. Modulation of prostaglandin biosynthesis by nitric oxide and nitric oxide donors / V. Mollace, C. Muscoli, E. Masini [et al.] // Pharmacol. Rev. – 2005. – Vol. 57. – P. 217-252. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

12. Sklyarov A.Ya. Role of nitric oxide-synthase and cyclooxygenase/lipoxygenase systems in development of experimental ulcerative colitis / A.Ya. Sklyarov, N.B. Panasyuk, I.S. Fomenko // J. Physiol. Pharmacol. – 2011. – Vol. 62, № 1. – P. 65-73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

13. Wallace J.L. NSAID gastropathy and enteropathy: distinct pathogenesis likely necessitates distinct prevention strategies / J.L. Wallace // British Journal of Pharmacology. – 2012. – Vol.165. – P. 67-74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

Надійшла до редколегії 17.06.15

И.Фоменко, канд. биол. наук

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, Львів, Україна

ВЛИЯНИЕ НЕСТЕРОИДНЫХ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ПОКАЗАТЕЛИ СИСТЕМ NO И H_2S В СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКЕ ТОЛСТОЙ КИШКИ

Исследовано влияние нестероидных противовоспалительных препаратов различных механизмов действия на показатели систем синтеза H_2S и NO в слизистой оболочке толстой кишки крыс.

Ключевые слова: нестероидные противовоспалительные препараты, гидроген сульфид, оксид азота, циклооксигеназа, слизистая оболочка толстой кишки крыс.

I. Fomenko, PhD
Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Lviv, Ukraine

EFFECTS OF NONSTEROIDAL ANTIINFLAMMATORY DRUGS ON INDICES OF NO AND H₂S SYSTEMS IN COLONIC MUCOSA

Investigate effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs possessing different mechanism of action upon indices of H₂S and NO synthesis systems in colonic mucosa of rats.

Key words: nonsteroidal antiinflammatory drugs, hydrogen sulfide, nitrogen oxide, cyclooxygenase, colonic mucosa.

УДК 579.62

О. Нечипуренко, асп., М. Хархота, канд. біол. наук, Л. Авдєєва, д-р мед. наук
Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України, Київ

ЕФЕКТИВНІСТЬ ВИКОРИСТАННЯ КАРОТИНСИНТЕЗУВАЛЬНИХ ШТАМІВ *B. SUBTILIS* IMB B-7513 ТА *B. AMYLOLIQUEFACIENS* УКМ B-5113 ДЛЯ КОРЕКЦІЇ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ДИСБАКТЕРІОЗУ У МИШЕЙ

Досліджено відновлення мікробіоти кишечника, патологоморфологічні зміни тканин різних органів та вміст вітаміну А в печінці мишей з експериментальним дисбактеріозом за умов його корекції штамами *B. subtilis* IMB B-7513, *B. amyloliquefaciens* УКМ B-5113 та їх композицією 1:1.

Ключові слова: каротинсинтезувальні бактерії роду *Bacillus*, мікрофлора кишечника, дисбактеріоз.

Вступ. Кишкова мікрофлора вважається головним біогенним чинником, що визначає ступінь здоров'я макроорганізму [1]. Її кількісні та якісні зміни призводять до розвитку дисбіотичних станів, внаслідок чого у людей і тварин не лише змінюється склад нормальної мікрофлори, але й розвивається дисфункція кишечника, відбуваються метаболічні порушення (авітамінози), порушується функціонування імунної системи, що може призвести до розвитку різних захворювань інфекційної або неінфекційної природи [2].

На сьогодні у світі широко проводиться пошук нових пробіотичних препаратів на основі різних груп мікроорганізмів, що більш досконалі та активні за існуючі [3]. Головними напрямками вирішення цієї проблеми є створення препаратів на основі декількох штамів бактерій (біоспорин), пошук штамів з додатковими корисними властивостями (субалін), використання у складі пробіотичних препаратів пребіотиків тощо. [3, 4]. Наразі відомо, що деякі штами бактерій роду *Bacillus* здатні синтезувати пігменти каротиноїдної природи і одночасно характеризуються пробіотичними властивостями [5]. Так, нами було показано, що штами *B. subtilis* IMB B-7513 та *B. amyloliquefaciens* УКМ B-5113 синтезували апокаротиноїди. Перший штам було віднесено до пробіотичного, а інший характеризувався властивостями харчової добавки [6, 7]. Тому створення пробіотичного препарату на їх основі є перспективним та актуальним.

З огляду на вищевикладене, метою роботи було дослідити ефективність використання каротинсинтезувальних штамів *B. subtilis* IMB B-7513 та *B. amyloliquefaciens* УКМ B-5113 для корекції експериментального антибіотик-асоційованого дисбактеріозу у мишей.

Матеріали та методи роботи. Об'єктом дослідження були каротинсинтезувальні штами *B. subtilis* IMB B-7513 та *B. amyloliquefaciens* УКМ B-5113 з Української колекції мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України. Для контролю каротинсинтезувальної здатності та пробіотичних властивостей вищезгаданих бактерій роду *Bacillus* використано каротинсинтезувальний штам *Streptomyces globisporus* 1912-Hp7Crt, що був наданий відділом генетики мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології, а також комерційний пробіотик Субтиспорин, що містить штам *Bacillus subtilis* 090.

Для моделювання експериментального дисбактеріозу використовували нелінійних мишей обох статей вагою 18–20 г (вік 8–9 тижнів) [8]. Дисбактеріоз у тварин викликали шляхом введення *per os* антибіотика амокси-

клаву (амоксацилін+клавуланова кислота) в дозі 50 мг/тварину 1 раз на добу протягом 14 діб. Потім тварин було поділено на групи: контрольні, а саме 1 група (n=12) – інтактні тварини, які отримували стерильний фізіологічний розчин; 2 група (n=12) – з експериментальним дисбактеріозом, які також отримували стерильний фізіологічний розчин; 3 група (n=12) отримувала культуру *Streptomyces globisporus* 1912-Hp7Crt; 4 група (n=12) – тварини, які лікувались традиційним для ветеринарії пробіотиком Субтиспорином. Дослідні групи 5, 6, 7 (по 12 мишей в кожній) після відтворення дисбактеріозу *per os* отримували щоденно протягом 12 діб культуру штамів *B. subtilis* IMB B-7513, *B. amyloliquefaciens* УКМ B-5113 або їх композицію у співвідношенні 1:1, відповідно. Кількісний вміст бактерій у дозі становив 10¹⁰ КУО/мл [8].

Досліджувані штами бацил вирощували в умовах глибокого культивування з використанням середовища наступного складу (г/л): Na₃C₆H₅O₇×3H₂O – 1,29, (NH₄)₂HPO₄ – 4,75, KH₂PO₄ – 9,60, MgSO₄ – 0,18, глюкоза – 20,00 (рН=7.0). Культивування бактерій здійснювали на качалці зі швидкістю 200 об/хв за температури 37 °С впродовж 18–24 годин.

Дослідження мікробіоценозу кишечника мишей проводили у динаміці на 0, 4, 9, 12-у добу корекції дисбактеріозу шляхом висіву з десятикратних (10⁻¹–10⁻⁹) розведень 1 г їх фекалій у фізіологічному розчині на стандартний набір елективних та диференційно-діагностичних середовищ. Кількісний вміст біфідобактерій визначали, висіваючи 1 мл суспензії із розведень 10⁻⁷–10⁻⁹ на напіврідке середовище Блаурокока. Лактобактерії визначали висіваючи 0,1 мл суспензії із розведень 10⁻⁵–10⁻⁷ на тверде MRS середовище, ентерококи – із розведень 10⁻⁴–10⁻⁶ на середовище Сланец-Бартлі, стафілококи – із розведень 10⁻⁴–10⁻⁶ на манітол-сольовий агар, мікроорганізми родини *Enterobacteriaceae* – із розведень 10⁻⁴–10⁻⁶ на агар Мак-Конкі, аеробні спороутворюючі бактерії – із розведень 10⁻³–10⁻⁵ після прогрівання за t = 100 °С протягом 5 хв. на триптон-соевий агар. Дріжджоподібні гриби роду *Candida* виділяли на середовищі Сабуро з розведень 10⁻³–10⁻⁵. Вміст бактерій в досліджуваному матеріалі виражали кількістю колонієутворюючих одиниць в 1 г фекалій (КУО/г) [9].

Для оцінки макроскопічної будови органів і тканин проводили евтаназію мишей хлороформом, потім здійснювали розтин тварин. Для гістологічного аналізу відбирали зразки печінки, селезінки, кишечника. Відібрані зра-

зки фіксували швидким методом у 10 % формаліні, проводили через розчини спиртів, ксилолу та розплавлений парафін. Після зневоднення та парафінізації тканин зразки органів заливали рідким парафіном і виготовляли мікротонкі зрізи, які висушували і фарбували за стандартною методикою розчинами еозину та гематоксиліну [10]. Гістологічне дослідження проводили у лабораторії гістології ООО "Центру ветеринарної діагностики".

Кількість вітаміну А у печінці визначали фотоколориметрично. Для цього 0,1 г печінки розтирали з безводним Na_2SO_4 та хлороформом, до отриманого екстракту додавали ефірат трифториду бору (індикатор). Оптичну густину екстракту вимірювали через 30 с. та 60 с. за довжини хвилі 610 нм. Кількість вітаміну А (мкг/г печінки) розраховували за формулою [11]:

$$X = \frac{(E1 - E2) \times 100 \times Y}{Y1 \times M}$$

де E1 – оптична густина екстракту через 30 с; E2 – оптична густина екстракту через 60 с; Y – загальний об'єм екстракту; Y1 – об'єм екстракту взятого для аналізу; M – маса наважки.

Для оцінки достовірності експериментальних даних, використовували параметричні критерії нормального розподілу, обчислюючи середнє арифметичне ($X_{\text{серед.}}$), середню квадратичну похибку ($S_{\text{серед.}}$), при рівнях значимості 0,05.

Результати дослідження та обговорення

Для моделювання експериментального дисбактеріозу було використано амоксиклав, β -лактамний антибі-

отик широкого спектру дії, який за надмірної концентрації спричинює гепатотоксичний ефект [12]. На 14-у добу введення антибіотика у тварин реєстрували різке зниження популяційного рівня нормальної мікробіоти товстого кишечника. Кількість біфідобактерій та лактобактерій знизилась у 800 та 120 рази, ентерококів – у 10 разів у порівнянні з аналогічними показниками кишкового вмісту інтактних тварин (таблиця). На фоні зниження загального рівня представників нормофлори спостерігали значне зростання кількості умовно-патогенних мікроорганізмів (УПМ), що вказує на наявність вираженого дисбактеріозу у експериментальних тварин. Виявлено підвищення вмісту лактозонегативних *E. coli* порівняно з інтактними тваринами майже у 3×10^5 рази. У кишковому вмісті тварин зареєстровано появу бактерії роду *Proteus* у кількості $2,2 \times 10^7$ КУО/г фекалій. Також нами було ідентифіковано збільшення числа дріжджоподібних грибів роду *Candida* та бактерій роду *Staphylococcus* приблизно у 10 і 1000 рази, відповідно. Отже, пероральне введення амоксиклаву викликало у тварин дисбактеріоз кишечника, що характеризувався зменшенням кількості лакто- та біфідобактерій, і як наслідок – різким зростанням чисельності умовно-патогенної мікрофлори (лактозонегативних *E. coli*, бактерій роду *Proteus* та *Staphylococcus*). Дані зміни якісного і кількісного складу мікрофлори кишечника мишей відповідають визначенню дисбактеріозу кишечника III-го ступеня у людини [13].

Таблиця. Мікрофлора товстого кишечника тварин на 14-й день введення амоксиклаву

Мікроорганізми	Тварини	Кількість мікроорганізмів, КУО/г фекалій
<i>Bifidobacterium</i> spp.	Інтактні	$8,0 \pm 0,4 \times 10^{10}$
	Дослідні	$1,0 \pm 0,2 \times 10^3$
<i>Lactobacillus</i> spp.	Інтактні	$1,7 \pm 0,2 \times 10^9$
	Дослідні	$1,2 \pm 0,2 \times 10^7$
Лактозопозитивні <i>E. coli</i>	Інтактні	$2,2 \pm 0,3 \times 10^7$
	Дослідні	$8,0 \pm 0,1 \times 10^8$
Лактозонегативні <i>E. coli</i>	Інтактні	$1,1 \pm 0,3 \times 10^4$
	Дослідні	$3,0 \pm 0,2 \times 10^9$
<i>Staphylococcus</i> spp.	Інтактні	$2,8 \pm 0,5 \times 10^6$
	Дослідні	$2,7 \pm 0,6 \times 10^9$
<i>Enterococcus</i> spp.	Інтактні	$2,9 \pm 0,6 \times 10^7$
	Дослідні	$3,0 \pm 0,4 \times 10^9$
<i>Proteus</i> spp.	Інтактні	0
	Дослідні	$2,2 \pm 0,2 \times 10^7$
<i>Candida</i> spp.	Інтактні	$6,5 \pm 0,3 \times 10^6$
	Дослідні	$6,6 \pm 0,5 \times 10^7$

Здатність до корекції дисбактеріозу є основною характеристикою пробіотичних штамів [3, 4]. Вже на 4-й день корекції спостерігали позитивну динаміку відновлення мікрофлори товстого кишечника у груп 4, 5, 6 та 7. Найбільш ефективним при корекції кількісного та якісного складу мікробіоти був штам *B. subtilis* IMB B-7513, після його застосування відмічено підвищення вмісту біфідобактерій та лактобактерій у 5 та 10 рази, відповідно. Разом з тим, реєстрували зниження вмісту лактозонегативних *E. coli*, бактерій родів *Proteus* та *Staphylococcus* у 40, 10 та 20 разів. Подібна позитивна динаміка була виявлена й на 9-й день корекції дисбактеріозу цим штамом. Ефективність препарату Субтиспорин виявилась нижчою ніж бактерій штаму *B. subtilis* IMB B-7513, оскільки на 4-й день його введення було відмічено лише зниження вмісту лактозонегативних *E. coli* та бактерій роду *Staphylococcus* у 20 разів. На 9-й день корекції дисбактеріозу реєстрували підвищення вмісту біфідобактерій та лактобактерій у 10 разів та зниження кількості дріжджоподібних грибів, лактозонегативних *E. coli*, бактерій родів *Staphylococcus* та *Proteus* у 10-1000 разів. Порівнюючи отримані дані з показниками, зазначеними у роботах І. Осипової із спі-

вав, необхідно відмітити, що при застосуванні препарату Біоспорин швидкість нормалізації мікрофлори була вищою ніж при введенні бактерій штаму *B. subtilis* IMB B-7513 [1, 8]. Це можливо пояснити більш вираженою антагоністичною активністю культур, складових препарату Біоспорин, щодо грамнегативних УПМ та дріжджоподібних грибів. Слід зазначити, що достовірної різниці у динаміці зміни мікрофлори товстого кишечника тварин 2-ї і 3-ї груп не виявлено.

На 12-й день перорального введення штаму *B. subtilis* IMB B-7513, пробіотичного препарату Субтиспорин, а також композиції штамів *B. subtilis* IMB B-7513 і *B. amyloliquefaciens* УКМ B-5113 спостерігали повну корекцію дисбактеріозу товстого кишечника. Найбільш ефективним для відновлення кількісного та якісного складу нормофлори було пероральне введення бактерій штаму *B. subtilis* IMB B-7513 (рис. 1). Отримані дані можна пояснити тим, що у дослідях *in vitro* він проявляв середній або високий рівень антагонізму щодо грамнегативних (*E. coli*, *Proteus* spp., *Salmonella* spp.) і грампозитивних бактерій (*Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp.), відповідно [6]. У кінці терміну корекції дисбактеріозу активність препарату Субтиспорин виявилась у 10 та

1000 разів нижчою щодо лактозонегативних *E. coli* (5,2 lg КУО/г) та бактерій роду *Proteus* (3,2 lg КУО/г) порівняно зі штамом *B. subtilis* IMB B-7513, однак, на порядок вищою щодо дріжджоподібних грибів (5,9 lg КУО/г). Ефектив-

ність відновлення кількості бактерій родів *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus* та *Bifidobacterium* не відрізнялась у груп 4 та 5 між собою (рис. 1).

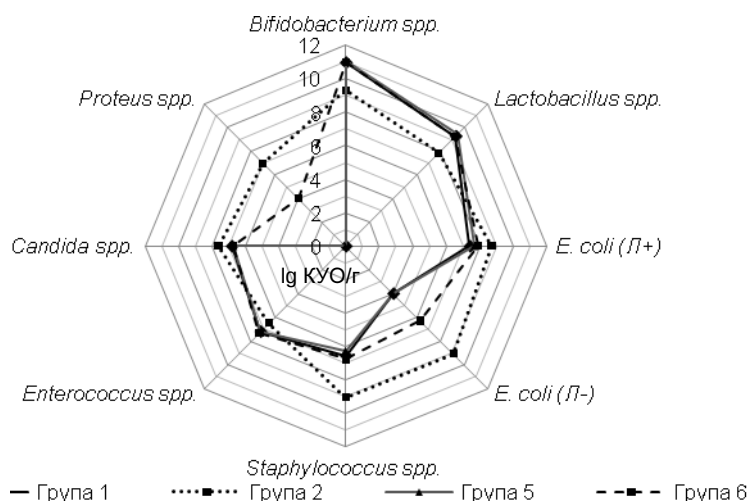


Рис. 1. Склад мікрофлори кишечника мишей на 12-й день корекції дисбактеріозу

Примітка: група 1 – інтактні тварини, група 2 – з експериментальним дисбактеріозом без лікування, група 5 – отримувала штам *B. subtilis* IMB B-7513, група 6 – отримувала штам *B. amyloliquefaciens* УКМ B-5113

Слід зазначити, що на 12-у добу відновлення мікрофлори кишечника мишей групи 7 зареєстровано синергічний ефект композиції штамів *B. subtilis* IMB B-7513 та *B. amyloliquefaciens* УКМ B-5113, направлений на зменшення кількості бактерій роду *Staphylococcus* (5,6 lg КУО/г) та дріжджоподібних грибів (6,2 lg КУО/г). Також спостерігали нормалізацію кількості бактерій родів *Enterococcus* (7,3 lg КУО/г), *Proteus* (відсутні), *Lactobacillus* (9,4 lg КУО/г), *Bifidobacterium* (11,2 lg КУО/г) та лактозопозитивних *E. coli* (7,7 lg КУО/г). Однак, було відмічено нижчу ефективність композиції ніж окремо штам *B. subtilis* IMB B-7513 щодо лактозонегативних бактерій *E. coli*, кількість яких становила 5,6 lg КУО/г. У кишечнику мишей з групи 6 на 12-у добу введення бактерій штам *B. amyloliquefaciens* УКМ B-5113 зафіксовано відновлення кількості *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *Staphylococcus* spp. та *Enterococcus* spp. Проте не було зареєстровано повної нормалізації кількісного вмісту лактозонегативних *E. coli* та *Proteus* spp. (рис. 1). Можливо це пов'язано з низьким рівнем антагоністичної активності вищевказаного штаму щодо грамнегативних бактерій [6].

Для підтвердження ефективності застосування досліджуваних штамів бактерій роду *Bacillus* на 12 добу корекції експериментального дисбактеріозу було проведено патологоанатомічний та гістологічний аналіз

тканин органів. Встановлено, що на відміну від тварин контрольної групи, у мишей з усіх інших груп, виявлено набряк і дряблість печінки, що можливо пов'язано з гепатотоксичним ефектом антибіотику [12].

Оскільки стан кишечника та печінки є показником ефективної корекції дисбактеріозу та нормалізації обмінних процесів [8] нами досліджено мікроструктуру вищевказаних органів. Встановлено, що при введенні препарату Субтиспорин, штаму *B. subtilis* IMB B-7513, композиції штамів *B. subtilis* IMB B-7513 та *B. amyloliquefaciens* УКМ B-5113 відбувалось повне відновлення структури кишечника (рис. 2). За застосування штаму *B. amyloliquefaciens* УКМ B-5113 реєстрували лише часткове відновлення тканин цього органу та незначну кількість простіших у просвіті. Слід відзначити, що у кишечнику тварин груп 2 та 3 виявлено некроз та десквамація епітелію слизової, лімфоцитарно-макрофагальні інфільтрації у власній пластинці слизової, а також значну кількість простіших у просвіті кишечника та на поверхні епітелію слизової. Відсутність вказаних змін та простіших у кишечнику мишей груп 4, 5, 7 пов'язана з відновленням мікрофлори та колонізаційною резистентністю макроорганізму [14]. Зареєстровані гістологічні показники повністю корелюють з отриманими раніше мікробіологічними даними.

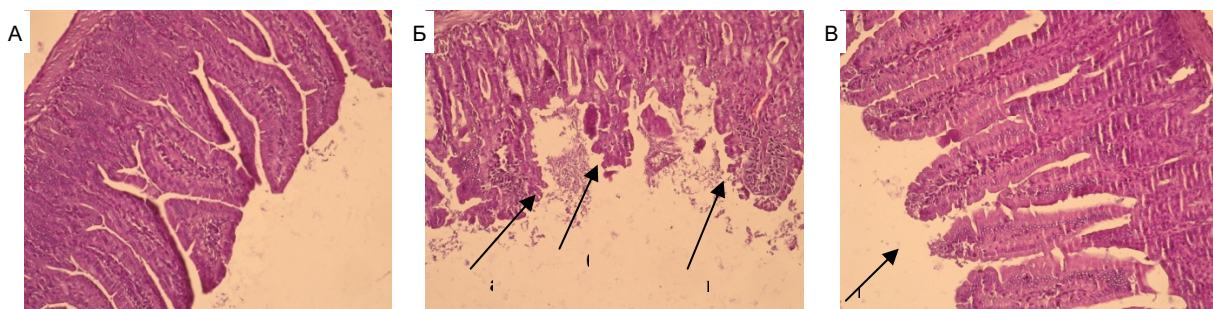


Рис. 2. Мікроскопічна будова товстого кишечника досліджуваних груп мишей, n=5 у кожній групі (фарбування гематоксиліном та еозинном, збільшення × 200)

Примітка: А – інтактні тварини, група 1 (структура збережена), Б – з експериментальним дисбактеріозом без лікування, група 2 (некроз епітелію слизової – а, лімфоцитарно-макрофагальна інфільтрація у власній пластинці слизової – б, простіші у просвіті кишечника – в), В – отримували штам *B. subtilis* IMB B-7513, група 5 (частковий некроз слизової – г, структура збережена)

При дослідженні мікроскопічної будови печінки мишей груп 4, 5, 6, 7 було виявлено частковий некроз, ознаки зернистої дистрофії гепатоцитів, що вказує на відновлення органу після токсичного впливу антибіотику. Однак, у печінці мишей груп 2 та 3 виявлено значний некроз та зернисту дистрофію гепатоцитів, лімфоцитарно-макрофагальні інфільтрати у паренхімі (рис. 3).

Наявність некротичних та дистрофічних змін у печінці пов'язана з порушенням метаболізму тварин, а поява лімфоцитарно-макрофагальних інфільтратів – можливо, з транслокацією УПМ у внутрішні органи [8].

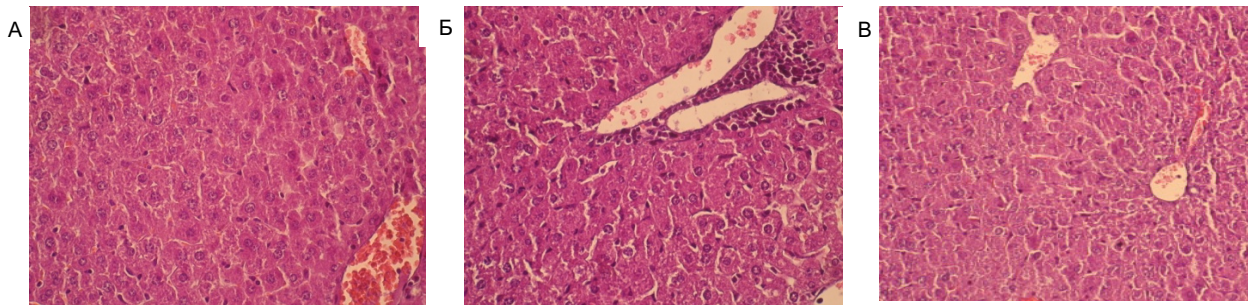


Рис. 3. Мікроскопічна будова печінки досліджуваних груп мишей, n=5 у кожній групі (фарбування гематоксилином та еозинем, збільшення $\times 400$)

Примітка: А – інтактні тварини, група 1 (незначна дистрофія гепатоцитів), Б – з експериментальним дисбактеріозом без лікування, група 2 (некроз, зерниста дистрофія гепатоцитів, периваскулярна лімфоцитарно-макрофагальна інфільтрація), В – отримували штам *B. subtilis* IMB B-7513, група 5 (частковий некроз та ознаки зернистої дистрофії гепатоцитів)

Отже, за перорального введення бактерій штаму *B. subtilis* і композиції культур *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 та *B. subtilis* IMB B-7513 відбувалась не лише корекція дисбактеріозу, але й відновлення структури кишечника й печінки.

Відомо, що β -каротин всмоктується у слизовій оболонці кишечника та метаболізується у вітамін А в печінці [14]. Оскільки, як показано у роботі Sy С., глікозильовані каротиноїди бактерій роду *Bacillus* є більш біостабільними та біодоступними ніж β -каротин [14], а штами *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 та *B. subtilis* IMB B-7513 здатні синтезувати пігменти каротиноїдної природи, нами було визначено концентрацію вітаміну А у печінці на 12 добу корекції дисбактеріозу. Показано, що концентрація вітаміну А у печінці мишей з групи 1 складала $42,9 \pm 2,3$, групи 2 – $22,8 \pm 1,6$, групи 3 – $35,4 \pm 1,9$, групи 4 – $26,5 \pm 1,3$, групи 5 – $36,9 \pm 2,0$, групи 6 – $27,9 \pm 1,6$, групи 7 – $33,6 \pm 1,7$ мкг/г. Отже, при введенні стрептоміцетів, штаму *B. subtilis* IMB B-7513, композиції штаму *B. subtilis* IMB B-7513 і *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 було накопичено вітаміну на 55, 62 та 47 % більше, ніж у тварин з дисбактеріозом без лікування. Слід відзначити, що внаслідок введення стрептоміцетів відбувалась акумуляція вітаміну А навіть при дисбактеріозі. Рівень вітаміну А у печінці мишей груп 5, 7 наближався до контрольного, що зумовлено вираженими пробіотичними властивостями штаму *B. subtilis* IMB B-7513 та його здатністю синтезувати каротиноїдні пігменти. До того ж непрямым підтвердженням позитивного впливу досліджуваних бактерій роду *Bacillus* на синтез вітаміну А є те, що при повній корекції дисбактеріозу препаратом Субтиспорин кількість вітаміну А у печінці збільшилась лише на 16 % порівняно з групою 2. Провітамінна активність каротиноїдів зі штаму *B. subtilis* IMB B-7513 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 на організм тварин потребує подальшого вивчення.

Висновки. Таким чином, за корекції дисбактеріозу каротинсинтезувальними штамми *B. subtilis* IMB B-7513 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 відбувалось відновлення нормофлори та зменшення кількості бактерій родів *Staphylococcus*, *Proteus*, лактозонегативних *E. coli* та дріжджоподібних грибів у кишечнику експериментальних тварин. Відмічено покращення мікроструктури тканин шлунково-кишкового тракту та печінки, позитивний вплив на накопичення вітаміну А внаслідок введення штаму *B. subtilis* IMB B-7513. На основі мікробіологічних

та біохімічних показників виявлено синергічний ефект за комплексного застосування досліджених штамів бактерій роду *Bacillus*. Отримані дані підтвердили результати попередніх досліджень *in vitro* і можуть стати обґрунтуванням подальших медико-біологічних та біотехнологічних досліджень з розробки нового пробіотика.

Список використаних джерел

1. Чичерин І.Ю. Микрофлора кишечника белых мышей и морских свинок при экспериментальном антибиотико-ассоциированном дисбактериозе и возможность ее коррекции пребиотиком стимулятором / И.Ю. Чичерин, И.В. Дармов, И.П. Погорельский // Журнал инфектологии. – 2012. – Т.4, № 1. – С. 75–80.
2. Petersen C. Defining dysbiosis and its influence on host immunity and disease / C. Petersen, J.L. Round // Cellular microbiology. – 2014. – Vol. 16. – P. 1024–1033.
3. Ушакова Н.А. Новое поколение пробиотических препаратов кормового назначения / Н.А. Ушакова, Р.В. Некрасов, В.Г. Правдин // Фундаментальные исследования. – 2012. – № 1. – С. 184–193.
4. Hwang K.Y. The benefits of using bacillus as a probiotic / K.Y. Hwang, J.H. Cho, J.Y. Lee, K.D. Kang // Journal of animal and veterinary advances. – 2012. – Vol. 18. – P. 3457–4362.
5. Perez-Fons L. Identification and the developmental formation of carotenoid pigments in the yellow/orange *Bacillus* spore-formers / L. Perez-Fons, S. Steiger, R. Khaneja // Biochimica et Biophysica Acta – 2011. – № 1811. – P. 177–185.
6. XIII З'їзд Товариства Мікробіологів України ім. С.М. Виноградського // "Пробіотичні властивості каротинсинтезувальних штамів *Bacillus* sp. 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113" – Міжн. наук. конф. – 1-6 жовтня 2013 р. – тези доповідей. – Ялта. – 2013. – С. 499.
7. XI Український біохімічний конгрес // "Природа та фізико-хімічні властивості каротиноїдних пігментів штамів *Bacillus* sp. 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113" – Міжн. наук. конф. – 6-10 жовтня 2014 року. – тези доповідей. – Київ. – 2014. – С. 34.
8. Осипова І.Г. Коррекция экспериментального дисбактериоза, вызванного ампиоксом, пробиотиками / И.Г. Осипова, К.М. Мефед, Д.С. Давыдов // Биопрепараты. – 2008. – Т. 1, № 29. – С. 9–13.
9. Харченко Н.В. Современные подходы к коррекции дисбактериоза кишечника / Н.В. Харченко, В.В. Черненко // Метод. рек. МЗ Украины. – К., 2000. – 28 с.
10. Горальский Л.П., Хомиш В.Т., Кононський О.І. Основы гистологической техники у норм и при патологии. – Житомир: Полісся, 2005. – 288 с.
11. Комбікорми, премікси, вітамінні препарати, продукція птахівництва. Методи визначення вітамінів А, Е, В2 та каротиноїдів: ДСТУ ISO 4687-1:2006. – [Чинний від 2006–11–07]. – К.: Держспоживстандарт України, 2007. – 81 с. – (Національні стандарти України).
12. Fontana R.J. Acute liver failure due to amoxicillin and amoxicillin/clavulanate / R.J. Fontana, A.O. Shakil, J.K. Greenon // Digestive Diseases and Sciences. – 2005. – Vol. 50, № 10. – P. 1785–1790.
13. Гранитов В.М. Классификация кишечного дисбактериоза / В.М. Гранитов, И.А. Хорошилова // Медицинские науки. – 2002. – № 3. – С. 6–10.
14. Sy C. Glycosyl carotenoids from marine spore-forming *Bacillus* sp. strains are readily bioaccessible and bioavailable / C. Sy, B. Gleize, S. Chamot // Food research International. – 2013. – Vol. 51. – P. 914–923.

Надійшла до редколегії 16.05.15

А. Нечипуренко, асп., М. Хархота, канд. биол. наук, Л. Авдеева, д-р мед. наук
Институт микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного НАН Украины, Киев, Украина

ЭФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КАРОТИНСИНТЕЗИРУЮЩИХ ШТАММОВ *B. SUBTILIS* ИМВ В-7513 ТА *B. AMYLOLIQUEFACIENS* УКМ В-5113 ДЛЯ КОРЕКЦИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ДИСБАКТЕРИОЗА У МЫШЕЙ

Исследовано восстановление микробиоты кишечника, паталоморфологические изменения тканей различных органов и содержание витамина А в печени мышей с экспериментальным дисбактериозом в условиях его коррекции штаммами *B. subtilis* ИМВ В-7513, *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 и их композицией 1:1.

Ключевые слова: каротинсинтезирующие бактерии рода *Bacillus*, микрофлора кишечника, дисбактериоз.

O. Nechypurenko, PhD stud., M. Kharhota, PhD., L. Avdeeva, DSc.
Zabolotno Institute of Microbiology and Virology NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

EFFECTIVITY OF CAROTENE-SYNTHESIZING STRAINS *B. SUBTILIS* IMV B-7513 AND *B. AMYLOLIQUEFACIENS* UCM B-5113 FOR CORRECTION OF EXPERIMENTAL DYSBACTERIOSIS IN MICE

It was investigated the rebuilding of intestinal microbiota, pathomorphological changes of various organs and vitamin A content in the liver of mice with experimental dysbiosis under its correction by strains *B. subtilis* IMB B-7513, *B. amyloliquefaciens* UCM B-5113, and their composition 1:1.

Keywords: carotene-synthesizing bacteria of *Bacillus* genus, gut microbiota, dysbiosis.

UDK 615.322: 616.379-008.64

M. Kyznetsova, Phd student, T. Halenova, Phd,
O. Dovgusha, stud, O. Savchuk, DSc
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv

EFFECT OF AN AQUEOUS EXTRACT OF *PHASEOLUS VULGARIS* PODS ON BLOOD GLUCOSE AND BODY WEIGHT IN DIABETIC RATS

This study was carried out to investigate the metabolic effects of the aqueous extract of pod of bean (*Phaseolus vulgaris*) in streptozotocin-induced diabetic rats (STZ). The oral administration of extract in dose of 200 mg/kg had the potential to decrease blood glucose and to prevent weight loss in STZ-induced diabetic rats.

Key words: extract of *Phaseolus vulgaris*, diabetes, blood glucose and body weight.

Introduction. Diabetes mellitus is the most frequent endocrine disease in developed countries. According to the World Health Organization the diabetic population is likely to increase up to 300 million or more by the year 2030 [1]. Diabetes mellitus is a chronic metabolic disease that arises from defects in the glucose homeostasis, which in turn are the result of an absolute insulin deficiency (type 1 diabetes) or an insulin resistance (type 2 diabetes). The disease often co-exists with hypertension and dyslipidemia with dangerous consequences to the cardiovascular system [2]. Currently available therapies for diabetes include insulin and various oral anti-diabetic agents such as sulfonylureas, biguanides and glinides. But despite a variety of therapeutic approaches, diabetes remains difficult for treatment. Moreover many of the anti-diabetic medications have a number of serious adverse effects [3]. That's why it is highly desirable to have additional agents to support therapeutic treatment or for the formulation of special food and beverages [4].

Medicinal plants with a long history of human use offer great potential for the discovery of new anti-diabetic drugs. Many reports and studies were published before the discovery of insulin and the plant was later a subject of intensive research [5]. Some botanical products have been shown to improve glucose metabolism and overall condition of individuals suffered from diabetes not only through hypoglycemic effects but also from improving lipid metabolism, antioxidant status and capillary function [6, 7]. Furthermore, a lot of plants (*Vaccinium myrtillus*, *Urtica dioica*, *Allium sativum*, et.) are known to have hypoglycemic and antidiabetic use through insulin-like or insulin-potentiating action [8-10].

Phaseolus vulgaris commonly known as kidney bean is a food item of mass consumption in Ukraine and other European countries [11]. Bean possesses anti-diabetic activity and have been used in traditional medicine,

especially for the secondary complications of diabetes including renal failure, retinopathy, neuropathy [12]. There are few of literature data concerning the mechanisms of bean antidiabetic properties. Along to published studies demonstrating the effectiveness of different *P. vulgaris* extracts under the hyperglycemic conditions [13, 14] also exist works which disprove this fact [15, 16]. There are evidences that different parts of *P. vulgaris* contain substances hypoglycemic mechanism of action of which differ (tryptophan, arginine, lysine, tryptophan, asparagine, chromium, vitamin C, hemicellulose, soluble fibers) [17]. Numerous recent studies are focused on mechanisms of hypoglycemic influence of *P. vulgaris* seed extract. It has been shown that cotyledons of beans, but not other plant organs contain enzymes which inhibit enzymes involved in carbohydrate metabolism and blood pressure maintaining (α -amylase/ α -glucosidase and angiotensin I-converting enzyme, respectively) [18].

Nevertheless effective popular remedy in the treatment of diabetes among population of Ukraine suffering from diabetes are pods of bean. However its hypoglycemic action rarely is mentioned in literature [19]. Therefore, the aim of this study was to investigate the ability of the aqueous extract of pod of bean (*Phaseolus vulgaris*) to affect on the levels of blood glucose and body weight in streptozotocin-induced diabetic rats.

Material and methods. 132 g of dried pods of *P. vulgaris* were poured into 1.0 liter of water at 100°C [20]. Mixture was held in a boiling water bath for 20 minutes, then allowed to cool for overnight and filtered. Obtained extract was centrifuged at 1000 g for 10 min, for removing plant debris, and the supernatant was dried using The Telstar LyoQuest freeze dryer (Spain). Dry extract (8 g) was stored at -20°C until the time of use. When needed, the residual extract was suspended in distilled water and used in the study.

Female white non-linear rats (100–120 g) were used in the study. Induction of experimental diabetes were conducted by an intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ, 45 mg/kg body weight) dissolved in a 0.01 M citrate buffer, pH 4.5. Control group received 0.01 M citrate buffer, pH 4.5. Two days after the single dose of STZ injection, animals with glycemic values in fasting > 25mmol/l were taken for the experiment [20].

The experiment was conducted for 28 days. A total of 24 rats were used in the study. During the experiment all animals were fed with standard commercial food and water available *ad libitum*. Rats were treated orally (by gavage) with distilled water or aqueous solution of *Phaseolus vulgaris* pod extract (200 mg/kg bwt/day) [20]. Animals were divided into four groups of 6 rats each: group 1, normal control (distilled water); group 2, normal + extract; group 3, diabetes control (distilled water); group 4, diabetes + extract. The levels of blood glucose and body weight were evaluated weekly after 4-hr of fasting. Blood samples were obtained

through puncture of the tail vein and glucose levels were detected by "HLYUKOFOT II" (Ukraine) glucometer.

The data for groups were analyzed by statistical analysis of Microsoft Excel. Comparisons were performed using parametric Student's *t* test. Values were considered statistically significant when $P < 0.05$.

Results and discussion. Figure 1 demonstrates the change of blood glucose level when aqueous extract of *P. vulgaris* pod was orally administered to normal and STZ-induced diabetic animals. The blood glucose levels in healthy rats, which administered plant extract throughout the experiment (group 2) were similar to their initial values and were not different statistically compared with group 1 of control rats.

At the beginning of the experiment the rate of glucose in diabetic animals exceeded relevant control values in 6 times (31.2 mmol/L vs 5.5 mmol/L). At the end of the first week of extract administration in both groups 3 and 4 the decrease of blood glucose levels according to initial values was observed (22 vs 31.2 and 15.8 vs 31.1).

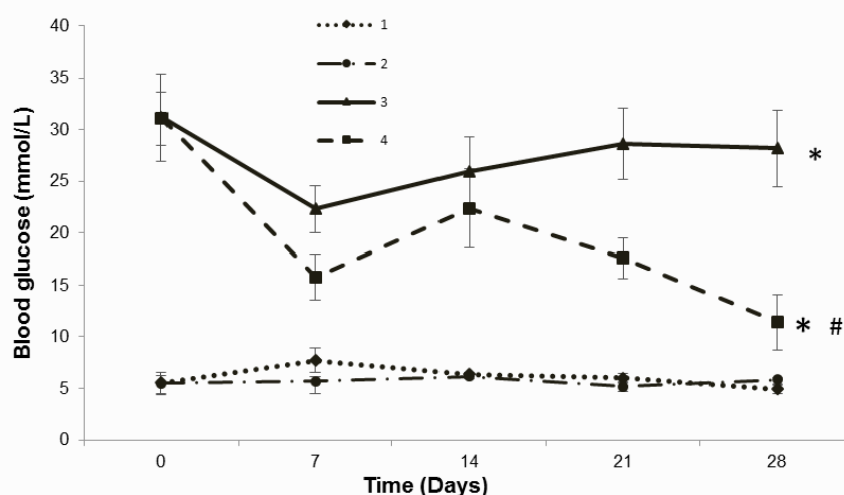


Fig. 1. Effect of the aqueous extract of *P. vulgaris* pod on blood glucose levels in diabetic rats during days of treatment ($M \pm m$; $n=6$)

Groups of animals: 1 – normal control (distilled water); 2 – normal + extract; 3 – diabetes control (distilled water); 4 – diabetes + extract.

* Significantly different from the control: $P < 0.05$.

Significantly different from the diabetes control: $P < 0.05$.

It may be due to activation of compensatory mechanisms of protection aimed at maintaining of glucose homeostasis in response to acute damaging of the pancreatic β -cells by STZ. During subsequent week (14 day) in both diabetic groups 3 and 4 glucose levels increased to 26 and 22 mmol/L respectively. During the later stages of the experiment (at 21 and 28 days) in the group of diabetic rats subjected to treatment with extract blood glucose levels were reduced by 38 and 59% comparatively with group 3 respectively. On the other hand in group 3 of control diabetic rats blood glucose level continued to grow. At 28 days in this group studied parameter was recovered to initial values, while in treated group of STZ-induced rats blood glucose level decreased to 63%.

The change of body weight was examined under the oral administration of bean extract to normal and STZ-induced diabetic rats (Figure 2). Throughout the study for

normal rats positive (2.1 g) weight gain per day was observed. At the end of the experiment in both groups of normal rats (1 and 2) body weight was increased by 31 and 52 % accordingly to initial values.

During the experiment in group of control diabetes sustained weight loss (to 17%) was observed at 28 day. While in the group of diabetic animals treated with plant extract weight increased by 11 % compared with values before treatment. Interestingly that during first week of the experiment in both groups 3 and 4 weight loss was observed (1.7 g per day and 1.4 g per day respectively). However, at the later stages of the study in group of untreated diabetic rats body weight continued to decrease and at 28 day of experiment the average index was 2.3 g per day. At the same time in group 4 positive weight gain was observed (1.7 g per day after third week of the experiment).

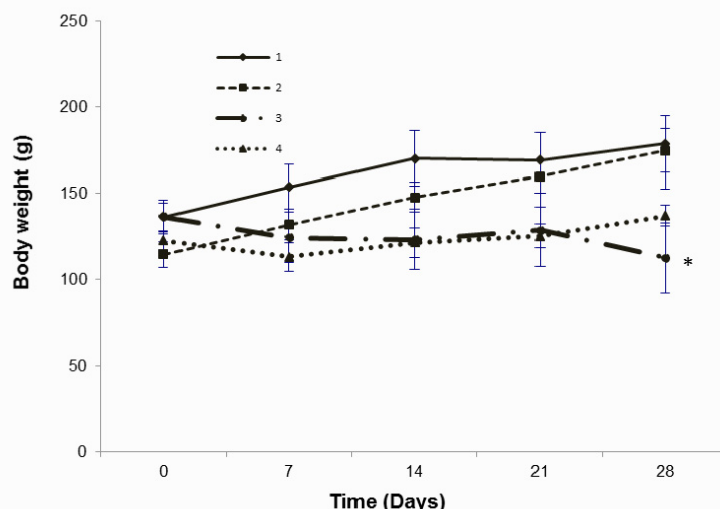


Fig. 2. Effect of the aqueous extract of *P. vulgaris* pod on body weight levels in diabetic rats during days of treatment ($M \pm m$; $n=6$)

Groups of animals: 1 – normal control (distilled water); 2 – normal + extract; 3 – diabetes control (distilled water); 4 – diabetes + extract

* Significantly different from the control: $*P<0.05$.

Significantly different from the diabetes control: $\#P<0.05$.

It is well known, that as beta-cell loss progresses, insulin is insufficiently presented to maintain glucose and lipid homeostasis. With further insulin deficiency, there is an increase in lipolysis of fat cells as well as protein breakdown state designed to provide alternative sources of fuel. These mechanisms along with the caloric loss from glycosuria result in the weight loss typically of the diabetic state [21]. Based on the results, it can be concluded that oral administration of STZ-diabetic rats with the aqueous extract of pod of *P. vulgaris* reduces blood glucose levels and implies that *P. vulgaris* may be a bioactive material to prevent metabolic diseases relating to blood glucose. A possible mechanism by which the studied extract exerts its activity on the diabetic rats might be due to ability stimulate β -cells to secrete more insulin or to increase insulin sensitivity in peripheral tissues [22]. But the exact mechanism of *P. vulgaris* influence remains not understandable, so further studies are recommended.

References

1. Kaštelan S., Salopek Rabatić J., Tomić M., Gverović Antunica A., Ljubić S., Kaštelan H., Novak B., Orešković D. / Body Mass Index and Retinopathy in Type 1 Diabetic Patients // S. Kaštelan, J. Salopek Rabatić, M. Tomić [et al.] // International Journal of Endocrinology. – 2014. – Feb 18; 2014:387919. doi: 10.1155/2014/387919. Epub 2014 Feb 18. Available from: <http://www.google.com>
2. Crook E. D. Therapeutic controversies in hypertension management: Angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors or angiotensin receptor blockers in diabetic nephropathy? ACE inhibitors / E. D. Crook, S. Penumalee // Ethnicity & Disease. – 2004. – Vol. 14, N 4. – P.2-4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
3. Saxena A. Role of selected Indian plants in management of type 2 diabetes: a review / A. Saxena, N. K. Vikram // Journal of Alternative and Complementary Medicine. – 2004. – Vol. 10, N 2. – P.369-378. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
4. Mishra S. B. An analytical review of plants for antidiabetic activity with their phytoconstituent & mechanism of action: a review / S. B. Mishra, C. V. Rao, SK. Ojha [et al.] // International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. – 2010. – Vol. 1, N 1. – P.29-44. Available from: <https://www.google.com.ua>
5. Subbulakshmi G. Indigenous foods in the treatment of diabetes mellitus / G. Subbulakshmi, M. Naik // Bombay Hospital Research Journal. – 2001. – Vol. 43. – P.548-61. Available from: <http://www.google.com>
6. Frondoza C. G. An in vitro screening assay for inhibitors of proinflammatory mediators in herbal extracts using human synovial cell cultures / C. G. Frondoza, A. Sohrabi, A. Polotsky [et al.] // In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal. – 2004. – Vol. 40, N 3-4. – P. 95-101. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

7. Malviya N. Antidiabetic potential of medicinal plants / N. Malviya, S. Jain, S. Malviya // Acta Poloniae Pharmaceutica. – 2010. – Vol. 67, N 2. – P.113-118. Available from: <https://www.google.com.ua>
8. Helmstädter A. Antidiabetic drugs used in Europe prior to the discovery of insulin / A. Helmstädter // Pharmazie. – 2007. – Vol. 62. – P.717-720. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
9. Mentreddy S. R. Medicinal plants with hypoglycemic/anti-hyperglycemic properties: a review / S. R. Mentreddy, A. I. Mohamed, A. M. Rimando // Industrial crops and rural development : proceedings of 2005 annual meeting of the Association for the Advancement of Industrial Crops: International Conference on Industrial Crops and Rural Development, 17-21 September 2005, Murcia, Spain / (Journal). – 2005. – Vol. 20. – P.341-353. Available from: <https://www.google.com.ua>
10. Jarald E. Diabetes and herbal medicines / E. Jarald, S. B. Joshi, D. C. Jain // Iranian Journal of Pharmacology & Therapeutics. – 2008. – Vol. 7, N 1. – P.97-106. Available from: <https://www.google.com.ua>
11. Sathe S. K. Dry beans of *Phaseolus*. A review. Part 2. Chemical composition: carbohydrates, fiber, minerals, vitamins, and lipids / S. K. Sathe, S. S. Deshpande, D. K. Salunkhe // Critical Reviews in Food Science and Nutrition. – 1984. – Vol. 21, N 1. – P.41-93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
12. Savickiene N. Importance of biologically active components and plants in the prevention of complications of diabetes mellitus / N. Savickiene, A. Dagilyte, A. Lukosius [et al.] // Medicina (Kaunas). – 2002. – Vol. 38, N 10. – P.970-5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
13. Venkateswaran S. Antioxidant effect of *Phaseolus vulgaris* in streptozotocin-induced diabetic rats / S. Venkateswaran, L. Pari // Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition. – 2002. Vol. 11. P.206-209. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
14. Tan G. Y. Antidiabetic components in vegetables and legumes / G. Y. Tan, X. J. Li, H. Y. Zhang // Molecules. – 2008. – Vol. 13. – P.1189-1194. Available from: <http://www.mdpi.com>
15. Neef H. Hypoglycemic activity of selected European plants / H. Neef, P. Declercq, G. Laekeman // Phytotherapy Research. – 1995. – Vol. 9. P.45-48. Available from: <http://www.researchgate.net>
16. Cerovic A. The dry plant extract of common bean seed (*Phaseolus vulgaris* pericarpium) does not have an effect on postprandial glycemia in healthy human subject / A. Cerovic, I. Miletic, A. Konic-Ristic [et al.] // Bosnian Journal of Basic Medical Sciences. – 2006. – Vol. 6, N 3. – P.28-33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
17. Casanas F. Chemical basis for the low sensory perception of the Ganxet bean (*Phaseolus vulgaris*) seed coat / F. Casanas, M. Pujola, L. Bosch [et al.] // Journal of the Science of Food and Agriculture. – 2002. – Vol. 82. – P.1282-1286. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com>
18. Moreno J. Characterization of alpha-Amylase Inhibitor, a Lectin-Like Protein in the Seeds of *Phaseolus vulgaris* / J. Moreno, T. Altabella, M. J. Chrispeels // Plant Physiology. – 1990. – Vol. 92. – P.703-709. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
19. Pari L. V. Effect of an aqueous extract of *Phaseolus vulgaris* on the properties of tail tendon collagen of rats with streptozotocin-induced diabetes / L. V. Pari, S. Venkateswaran // Brazilian Journal of Medical and Biological Research. – 2003. – Vol. 36, N 7. – P.861-70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

20. Venkateswaran S. Antioxidant effect of Phaseolus vulgaris in streptozotocin-induced diabetic rats / S. Venkateswaran, L. Pari // Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition. – 2002. – Vol. 11, N 3. – P.206-209. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

21. Cooke D. W. Type 1 Diabetes Mellitus in Pediatrics / D. W. Cooke, L. Plotnick // Pediatrics in Review. – 2008. – Vol. 29, N 11. – P.374-84. Available from: <http://pedsinreview.aappublications.org>

22. Serrano J. Role of black bean Phaseolus vulgaris on the nutritional status of Guatemalan population / J. Serrano, I. Goni // Archivos Latinoamericanos de Nutricion. – 2004. – Vol. 54, N 1. – P.36-44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Надійшла до редколегії 22.06.15

М. Кузнєцова, студ., Т. Галєнова, канд. біол. наук, О. Довгуша, студ., О. Савчук, д-р біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

ВПЛИВ ВОДНОГО ЕКСТРАКТУ СТРУЧКІВ КВАСОЛІ (*PHASEOLUS VULGARIS*) НА ПОКАЗНИКИ ГЛЮКОЗИ В КРОВІ ТА МАСИ ТІЛА ДІАБЕТИЧНИХ ЩУРІВ

Дане дослідження було проведено для вивчення ефектів водного екстракту стручків квасолі (Phaseolus vulgaris) на показники вуглеводного обміну у стрептозотоксин-індукованих діабетичних (STZ) щурів. Пероральне введення екстракту в дозі 200 мг/кг призводило до зменшення втрати ваги та рівня глюкози в крові в STZ-індукованих діабетичних щурів.

Ключові слова: екстракт Phaseolus vulgaris, цукровий діабет, рівень глюкози в крові, маса тіла.

М. Кузнєцова, студ., Т. Галєнова, канд. біол. наук, О. Довгуша, студ., А. Савчук, д-р біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

ВЛИЯНИЕ ВОДНОГО ЭКСТРАКТА СТРУЧКОВ ФАСОЛИ (*PHASEOLUS VULGARIS*) НА ПОКАЗАТЕЛИ ГЛЮКОЗЫ В КРОВИ И МАССЫ ТЕЛА ДИАБЕТИЧЕСКИХ КРЫС

Данное исследование было проведено для изучения эффектов водного экстракта стручков фасоли (Phaseolus vulgaris) на показатели углеводного обмена у стрептозотоксин-индуцированных диабетических (STZ) крыс. Пероральное введение экстракта в дозе 200 мг/кг приводило к уменьшению потери веса и уровня глюкозы в крови в STZ-индуцированных диабетических крыс.

Ключевые слова: экстракт Phaseolus vulgaris, сахарный диабет, уровень глюкозы в крови, масса тела.

УДК 577.112.7

Л. Порубльова, канд. біол. наук, Б. Негруцький, д-р біол. наук.
Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, Київ,
А. Негеля, студ.

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

ВИВЧЕННЯ ВПЛИВУ МЕТИЛУВАННЯ ФАКТОРА ЕЛОНГАЦІЇ ТРАНСЛЯЦІЇ eEF1A1 НА БІЛОК-БІЛКОВІ ВЗАЄМОДІЇ

Для виявлення впливу метилування фактора елонгації трансляції eEF1A1 на його взаємодію з іншими білками було створено мутант, в якому лізін в 55 положенні, здатний до метилування, замінено на аргінін. Були виділені білки, що взаємодіють із нормальним і мутантним eEF1A1. Ідентифіковані деякі білки, на взаємодію з якими може впливати метилування eEF1A1.

Ключові слова: eEF1A1, метилування, HaloTag, білок-білкові взаємодії.

Вступ. Метилування лізинових залишків є однією з важливих пост-трансляційних модифікацій білків, задіяних у регуляції життєдіяльності клітини. Однією з найбільш розповсюджених та найкраще вивчених посттрансляційних модифікацій є метилування лізинових залишків гістонів, що контролює експресію генетичної інформації через ремоделювання структури хроматину та зміну рівня транскрипції, тобто, разом з іншими модифікаціями, створює своєрідний "гістоновий код". Крім того, метилування лізинових та аргінінових залишків виявлено у декількох негістонових білків, зокрема транскрипційних факторів, рецепторів, рибосомних білків та трансляційних факторів [3, 11, 31, 34]. Незважаючи на те, що метилування білків відоме вже досить давно, велика увага до цієї модифікації прикута тільки останнім часом, коли було відкрито зворотність цієї реакції, тобто здатність метилування білків до регуляції у часі. Нещодавно були ідентифіковані спеціальні ферменти – деметилази, які можуть видаляти метилову групу чи декілька метилових груп із вже модифікованих білків [40]. Отже, роль метилування білків може полягати не тільки у забезпеченні специфічного поверхневого ландшафту деяких частин білкової молекули, що не змінюється протягом її життя, але і у запровадженні потужного механізму зворотної регуляції активності білків, їх взаємодії із білками-партнерами. Дослідження останніх років вказують на залучення процесів метилування/демилування як гістонових, так і низки негістонових білків до онкогенезу [4, 12, 25, 46]. Проте регуля-

торні механізми, що включають метилування негістонових білків, а також механізми порушення цього процесу та його роль в онкогенезі залишаються невідомими.

Один з негістонових білків, який в значній мірі метилований за лізиновими залишками – еукаріотичний фактор елонгації трансляції 1A1 (eEF1A1). eEF1A1 у складі елонгаційного комплексу забезпечує ГТФ-залежне кодон-специфічне зв'язування аміноацил-тРНК з А-сайтом 80S рибосоми [33]. Крім того, він виконує декілька неканонічних функцій: взаємодіє з цитоскелетом, бере участь у експорті ядерних білків, протеолізі нових, але синтезованих з помилками білків, у апоптозі та в розмноженні вірусів ссавців і рослин [1, 38]. В основі таких змін функцій білка можуть бути пост-трансляційні модифікації. eEF1A1 підлягає фосфорилюванню, метилуванню, ацетилюванню, гліцерилфосфорилюванню, метилуванню та убиквітинуюванню. Одна з найменш вивчених модифікацій цього білка – метилування лізинових залишків. Відомо, що у eEF1A1 ссавців метилуються п'ять лізинів, що розташовані у 36, 55, 79, 165, 318 позиціях [9]. Залишки 55 та 165 в нормі диметилувані, а 36, 79, 318 – триметилувані. Про функціональне призначення метилування eEF1A1 людини на сьогодні нічого не відомо.

Метилування лізинових залишків білків може мати різні функціональні наслідки, наприклад, змінювати активність, субклітинну локалізацію та функції білків, впливати на стабільність білка та на інші пост-трансляційні модифікації сусідніх амінокислотних за-

лишків, чи на білок-білкові взаємодії. Ті ж самі лізинові залишки eEF1A також можуть бути не тільки метилованими, але й ацетилованими або убиквітинованими [6]. Тому, ймовірно, їх метилування може виключати можливість інших модифікацій білка у цих позиціях і навпаки, що підносить проблему регуляції eEF1A ще на один рівень складності. Оскільки всі лізинові залишки eEF1A, що здатні до метилування, експоновані назовні білкової глобули [8, 9], наслідком такої пост-трансляційної модифікації може бути, насамперед, вплив на взаємодію eEF1A з іншими білками.

Білок-білкові взаємодії відіграють одну з найважливіших ролей у забезпеченні біохімічних процесів клітини. Найчастіше вживаний на сьогодні метод для вивчення білок-білкових взаємодій – афінна очистка білкових комплексів з наступною мас-спектрометричною ідентифікацією білків. Відомі етикетки для афінної очистки білок-білкових комплексів – FLAG, GST and His-tag – мають ряд недоліків, серед яких зворотне зв'язування з відповідною смолою. GST система характеризується високим рівнем неспецифічного зв'язування білків. Так само при очистці за допомогою His-tag спостерігається значне забруднення ендегенними білками, збагаченими на гістидин.

Для вивчення впливу метилування на взаємодії eEF1A людини із білками-партнерами нами була вибрана HaloTag® Pull-Down система (Promega, США), яка була створена спеціально для вивчення білок-білкових взаємодій в клітинах ссавців [43]. HaloTag сконструйований з галоалканової дегалогенази DhaA із бактерії *Rhodococcus rhodocrous*. Він не має гомологічних білків у клітинах ссавців та здатен швидко і незворотно зв'язуватися з твердофазним носієм, утворюючи ковалентний зв'язок. Тому така система характеризується високою специфічністю та чутливістю. Крім того, етикетка Halo ковалентно зв'язується з флуоресцентними лігандами, що зручно для визначення рівня експресії трансгена та для вивчення його клітинної локалізації.

Матеріали і методи. Клонування eEF1A1 в плазміді рFC14K, що кодує HaloTag на С-кінці цільового білка, здійснювали за допомогою реагентів та матеріалів з набору "HaloTag® Complete Pull-Down System" (Promega, США). Праймери для ампліфікації: 5'-ggctgcgatcgccatgggaaaggaagaa gactcatat-3' (прямий) та 5'-gtcgggttaaaccttagcttctgagcttct-3' (зворотній). Склад реакційної суміші ПЛР: матриця pCDNA3.1(+)/eEF1A1 2 ng, 1x Phusion HF буфер, суміш dNTP по 200 μ M, праймери по 25 pmol, ДНК полімераза Phusion (Thermo Scientific, США) 1 од. Умови ПЛР ампліфікації: початкова денатурація 98°C 30 сек, денатурація 98°C 30 сек, відпал 61°C 10 сек, елонгація 72°C 21 сек, 30 циклів, кінцева елонгація 72°C 10 хв. ПЛР-продуктом трансформували компетентні клітини E.coli XL10 Gold. Плазміду виділяли за допомогою набору "GeneJet™ MiniPrep Purification Kit" (Thermo Scientific, США) за методикою виробника. Перевірка ідентичності отриманої плазміді проводилася рестрикцією за допомогою FD HindIII (Thermo Scientific, США).

Спрямований мутагенез здійснювали ПЛР-методом Quickchange (Stratagene, [47]). Праймери для заміни лізину K55 на аргінін: 5'-ggaaagggtccttcaggtatgcctgggtcttg-3' (прямий) та 5'-caagaccaggcatacctgaaggagcccttcc-3' (комплементарний). Склад реакційної суміші ПЛР: матриця рFC14K/eEF1A1 10 ng, 1x Phusion HF буфер, dNTPs по 200 μ M, MgCl₂ 2,3 mM, праймери по 25 pmol, Phusion ДНК полімераза (Thermo Scientific) 2 од. Умови ПЛР ампліфікації: початкова денатурація 98°C 3 хв, денатурація 98°C 12 сек, відпал 72°C 30 сек, елонгація 72°C 3 хв., 18 циклів, кінцева елонгація 72°C 10 хв. Для рест-

рикції матриці ПЛР-суміш інкубувалася з 1 μ l рестриктази DpnI при 37°C протягом ночі та дезактивували нагріванням при 65°C 20 хв.

Клітини MCF-7 вирощували при 37°C, 5% CO₂, вологості 100% в середовищі DMEM, що містить 5% FBS та антибіотики пеніцилін і стрептоміцин та глютамін. Трансфекцію MCF-7 плазмідами рFC14K/eEF1A1, рFC14K/eEF1A1-K55R та контрольний вектор HaloTag здійснювали за допомогою реагента TurboFect (Thermo Scientific, США) протягом 24 годин, після чого клітини осаджали, лізували за допомогою лізисного буфера (Promega, США) та зберігали при – 80°C до використання. Афінну очистку білків-партнерів здійснювали за допомогою набору "HaloTag® Complete Pull-Down System" (Promega, США) згідно інструкції виробника. Білки розділяли в 12% ПААГ. Гель фарбували колоїдним розчином Кумасі, що містить 0,02% Кумасі G-250, 5 % сульфату алюмінію, 2 % (в/о) фосфорної кислоти, 10 % етилового спирту [21]. Гель фотографували на приладі ChemiDoc (BioRad, США). Денситометрію проводили за допомогою програми ImageLab (BioRad, США). Для контролю експресії трансгену 10 мкл лізату перед денатурацією та електрофорезом інкубували з 1 мкл 50 μ M HaloTag® TMR-лігандом протягом 15 хвилин в темноті. Візуалізували на приладі ChemiDoc (BioRad, США) в ультрафіолеті при довжині хвилі 565 нм.

Мас-спектрометричну ідентифікацію білків у вирізаних смугах гелю здійснювали в мас-спектрометричній службі Теплін (Медична школа Гарварду, Бостон, США) на приладі BTPX-MC/MC Orbitrap (Thermo Scientific, США).

Результати та їх обговорення. Для виявлення впливу метилування eEF1A на його взаємодії з іншими білками за допомогою HaloTag® Pull-Down системи eEF1A було клоновано в плазміді рFC14K, що кодує ковалентно зшитий HaloTag із С-кінцем білка, оскільки всі лізинові залишки, що здатні до метилування, локалізовані на N-кінці. В такому випадку досить масивний білок-етикетка Halo розміром 35 кДа не буде створювати стеричних перешкод для взаємодії білків-партнерів з ділянками eEF1A, що містять здатні до метилування лізинові залишки. Отримана плазмід кодує злитий білок eEA1A1/HaloTag молекулярною масою близько 85 кДа (50 кДа eEA1A1 і 35 кДа HaloTag). Один із лізинових залишків, що підлягають метилуванню в клітинах ссавців, K55, був мutowаний на аргінін (K55R). Така заміна є нейтральною для мутаційного вивчення функцій білка, тому що, по-перше, білок, що містить залишок аргініну замість залишку лізину, не може метилуватися в клітині аналогічно немutowаному, оскільки аргінін метилується іншими метилтрансферазами. Метилованих залишків аргініну не виявлено в молекулі eEF1A. По-друге, заміна лізину на аргінін не повинна спричиняти суттєві конформаційні зміни білка, тому що аргінін зберігає позитивний заряд бокового радикалу лізину. До того ж, за даними рентгеноструктурного аналізу eEF1A кроля [8, 9], всі лізинові залишки, що метилуються, експоновані назовні білка і навряд чи впливають на його конформацію.

Електрофореграма білків-партнерів eEF1A/HaloTag, мутанта eEF1A1-K55R/HaloTag та контрольного білка – етикетки Halo наведена на Рис.1. Спостерігався незначний рівень неспецифічного зв'язування білків з Halo, що характерно для цієї етикетки. Знайдено істотну кількість білків, що специфічно взаємодіють з eEF1A1 та його мутантом eEF1A1-K55R. Справді, для eEF1A1 вже відомо досить багато білків-партнерів [14, 26], що пояснюється його багатofункціональністю. Мутація K55R не приводить до появи нових взаємодій, чи не відміння певних вже існуючих взаємодій. Разом із тим, введення мутації K55R до білка eEF1A1 може змінювати ступінь

зв'язування білків-партнерів із ним. Для кількісної оцінки взаємодій eEF1A1 з білками партнерами застосовували нормалізацію денситометрованих смуг білка, фарбованих Кумасі в гелі, за зв'язуванням етикетки Halo з флуоресцентним лігандом TMR в однаковому об'ємі лізату з наступним розділенням в поліакриламідному гелі та візуалізацією в ультрафіолеті (Рис.2). Інтенсивність смуг 5, 7, 8 та 9, в яких знайдено елонгаційні фактори, зменшується в немутованому білку порівняно з мутан-

том, тобто метилування eEF1A1 в 55 позиції може призводити до послаблення взаємодії з ними (Табл. 1). І навпаки, в смугах 2, 3, 4, інтенсивність яких збільшується в мутанті, ідентифіковано шаперони HSP70 та HSP105 та білки, асоційовані з цитоскелетом. Проте, оскільки в кожній смузі в гелі ідентифіковано декілька білків, то наведені зміни потребують подальшого підтвердження іншими методами.

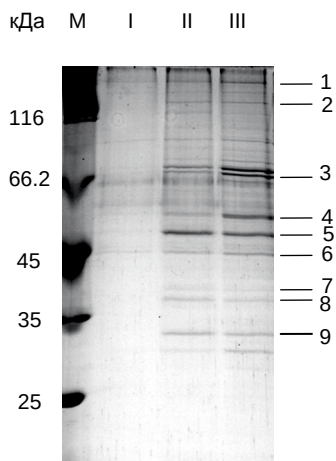


Рис. 1. Електрофореграма елюатів білків-партнерів eEF1A1 та eEF1A1-K55R, отриманих афінною очисткою.
M – білкові маркери; **I** – контроль HaloTag; **II** – eEF1A1/HaloTag, **III** – мутант eEF1A1-K55R/HaloTag.
1 – 9 – номери смуг гелю, в яких ідентифіковано білки (Табл. 1)

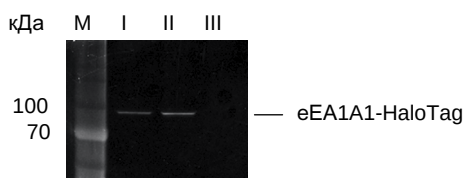


Рис. 2. Електрофореграма лізатів клітин MCF-7 після інкубування із TMR-лігандом.
M – білкові маркери;
I – контроль, не трансфіковані клітини; **II** – трансфекція плазмідом, що містила eEF1A1/HaloTag,
III – трансфекція плазмідом, що містила мутант eEF1A1-K55R/HaloTag

В Табл.1 наведено білки, яким відповідає найбільша кількість трипсинолітичних пептидів, ідентифікованих мас-спектрометрією. Серед ідентифікованих білків є багато таких, взаємодію eEF1A1 з якими вже продемонстровано раніше (Табл. 1): сам eEF1A1, що може утворювати димер, інші фактори елонгації, що входять до елонгаційного комплексу, рибосомні білки, шаперон HSP70 [14], білки цитоскелету актин [5, 17, 49] і тубулін [16], аміноацил-тРНК-синтази [18, 29, 32, 37]. Така кількість знайдених відомих білків-партнерів eEF1A1 свідчить про правильність вибраного підходу до вивчення білок-білкових взаємодій та підтверджує коректність отриманих результатів.

Найбільш важливою, з нашої точки зору, є ідентифікація низки білків, про взаємодію з якими eEF1A1 рані-

ше не повідомлялося. Цікаво, що серед ідентифікованих білків знайдено ферменти фолатного циклу, який є основним джерелом метильних груп до реакцій метилування білків, нуклеїнових кислот чи метаболітів – С-1-тетрагідрофолатсинтаза, біфункціональна метилен-тетрагідрофолат дегідрогеназа/циклогеназа, та конкурентний інгібітор реакцій метилування – аденозил гомоцистеїназа. Кількість знайдених пептидів цих білків, відповідність їх молекулярних мас до положення тих смуг, в яких вони знаходяться, та специфічність системи HaloTag вказують на те, що ці білки не є домішкою та ідентифіковані не випадково. Це може вказувати на залучення eEF1A1 до регуляції реакцій метилування та ще, можливо, на залежність такої регуляції від метилування самого eEF1A1.

Таблиця 1. Ідентифіковані білки-партнери eEF1A1 та його мутанта eEF1A1-K55R

№ смуги	m*, кДа	Зміна інтенсивності смуги **, %	Символ гена	Назва	Мол. маса, кДа
1	135-145	- 50	VARS	Валіл-тРНК-лігаза	140,5
			IARS	Ізолейцил-тРНК-лігаза	144,5
2	95-105	+ 142	HSPH1	Білок теплового шоку 105 kDa	96,7
			MTHFD1	Цитоплазматична C-1-тетрагідрофолат-синтаза	101,6
			MTHFD1L	Монофункціональна мітохондріальна C1-тетрагідрофолат-синтаза	105,7
			KDM1A	Лізін-специфічна гістондеметилаза 1A	92,8
3	70-80	+ 44	HSPA1A	Білок теплового шоку 70 kDa 1A/1B	70,0
			METTL13	Метилтрансферазоподібний білок 13	78,7
			KARS	Лізил-тРНК-лігаза	68,0
4	50-60	+ 48	ATP5A1	Субодиниця альфа-1 Na ⁺ /K ⁺ -АТФази	59,7
			TUBB2A	Тубулін, ланцюг бета-2A	50,0
5	45-55	- 65	EEF1G	Фактор елонгації 1-гамма	50,1
			PSMC2	Регуляторна субодиниця 7 26S протеасоми	48,6
			SERPINH1	Серпін H1	46,4
6	40-45	+ 14	ACTA2	Актин	42,0
			AHCY	Аденозилгомоцестіназа	47,7
7	35-45	- 70	EEF1D	Фактор елонгації 1-дельта	31,1
			ACTA2	Актин	42,0
			EEF1A1	Фактор елонгації 1-альфа 1	50,1
			EEF1G	Фактор елонгації 1-гамма	50,1
			MTHFD2	Біфункціональна мітохондріальна метилен-тетрагідрофолат-дегідрогеназа/циклогідролаза	37,9
8	30-40	- 67	EEF1D	Фактор елонгації 1-дельта	31,1
			CXorf26	UPF0368 білок Cxorf26	26,0
			MTHFD2	Біфункціональна мітохондріальна метилен-тетрагідрофолат-дегідрогеназа/циклогідролаза	37,9
9	25-30	- 70	RPS3	Білок S3 субодиниці 40S рибосоми	26,7
			EEF1B2	Фактор елонгації 1-бета	24,8

* – орієнтовна молекулярна маса білків із відповідної смуги геля, розрахована за допомогою програми ImageLab

** – зміна інтенсивності смуг білків-партнерів eEF1A1-K55R відносно таких eEF1A1

Рибосомні білки знаходяться в безпосередній близькості до eEF1A1 під час білкового синтезу, тому цілком закономірно, що багато з них вже ідентифіковано як білки-партнери eEF1A1 (наприклад, [14]). В нашій роботі також було знайдено від одного до п'яти пептидів декількох рибосомних білків (дані не показані). Але єдиний рибосомний білок, який знайдено в кількості 20 пептидів (смуга 9) – білок S3 субодиниці 40S рибосоми (RPS3) – в рибосомі знаходиться на значній відстані від eEF1A1 і не може фізично взаємодіяти з ним під час трансляції. Значна кількість знайдених пептидів – 20 – сумарно складають 61% від повної послідовності білка, що виключає його ідентифікацію як випадкового домішки. Останнім часом з'явилася інформація про участь RPS3 в процесах, не пов'язаних з трансляцією: репарація ДНК [13, 23, 39], регуляція транскрипції [45, 48, 50], передача сигналів в клітинах [20, 22, 24], апоптоз [19], взаємодії господар-патоген [15, 44]. Враховуючи, що eEF1A1 також задіяний в деяких з цих процесів та що обидва білки мають багато спільних білків-партнерів [14], то взаємодія eEF1A1 та RPS3 можлива при виконанні певної спільної для обох білків функції, яка в той же час є неканонічною як для одного, так і для іншого з цих білків.

Особливу цікавість становить ідентифікація метилтрансфераз, що метилують eEF1A1, та деметилаз, що каталізують зворотню реакцію. В літературі повідомлялося про залучення деяких метилтрансфераз та деметилаз до злоякісної трансформації клітин [4, 12, 25, 46]. Крім того, нами нещодавно отримані свідчення про зменшення рівня метилування eEF1A1 в модельних пухлинах ссавців порівняно зі здоровими тканинами (неопубліковані дані). Можливо, ступінь метилування eEF1A1 може бути пов'язаною із певними онкогенними функціями цього білка. Перевірка цієї гіпотези потребує

ідентифікації метилтрансфераз та деметилаз eEF1A1. На сьогодні не ідентифіковано жодної деметилази, що деметилює метил-eEF1A1. Серед ідентифікованих нами білків знайдено лізін-специфічну гістонову деметилазу KDM1A. Як відомо, багато гістонових метилтрансфераз та деметилаз мають негістонові білки-мішені [30, 35, 36]. Тому потребує перевірки можливість деметилювання метил-eEF1A1 гістоною деметилазою KDM1A.

Що стосується метилтрансфераз eEF1A1, на сьогодні відома тільки одна метилтрансфераза METTL10, що триметилює eEF1A1 в позиції 318 в клітинах людини HEK293T [41]. Ще три метилтрансферази знайдено в дріжджах *S. cerevisiae* [7, 10, 27, 28]. Одна з них – Efm5 триметилює eEF1A1 дріжджів в позиції 79, лізиновий залишок у аналогічній позиції знаходиться і в eEF1A1 ссавців [28]. Двоє інших виявлених дріжджових ензимів метилують такі залишки лізину eEF1A, які не мають відповідних у eEF1A1 ссавців. Важливо, що ми знайшли подібний до метилтрансферази білок 13 (METTL13), який за амінокислотною послідовністю віднесено до класу метилтрансфераз, проте його мішеней ще не знайдено. Наші подальші дослідження будуть спрямовані зокрема на з'ясування, чи метилює METTL13 фактор елонгації трансляції eEF1A1.

Висновки. Застосування HaloTag системи дозволило ідентифікувати цілу низку як відомих, так і невідомих білків-партнерів eEF1A1. Отримані результати мутаційного вивчення впливу метилування лізинового залишку eEFA1 в 55 положенні на білок-білкові взаємодії показують, що метилування eEFA1 може різноспрямовано впливати на його афінність до білкових партнерів.

Робота підтримана грантом Національної академії наук України № 14-04-15.

Список використаних джерел

1. Abbas W. The eEF1A Proteins: At the Crossroads of Oncogenesis, Apoptosis, and Viral Infections / W. Abbas, A. Kumar, G. Herbein // *Frontiers in oncology*. – 2015. – Vol. 5. – Article 75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
2. Andersen G.R. Structural basis for nucleotide exchange and competition with tRNA in the yeast elongation factor complex eEF1A:eEF1 α / G.R. Andersen, L. Pedersen, L. Valente [et al.] // *Molecular Cell*. – 2000. – Vol. 6, N 5. – P. 1261-1266. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
3. Biggar K.K. Non-histone protein methylation as a regulator of cellular signalling and function / K.K. Biggar, S.S. Li // *Nature Reviews Molecular cell biology*. – 2015. – Vol. 16, N 1. – P. 5-17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
4. Black J.C., Manning A.L., Van Rechem C. KDM4A lysine demethylase induces site-specific copy gain and rereplication of regions amplified in tumors / J.C. Black, A.L. Manning, C. Van Rechem [et al.] // *Cell*. – 2013. – Vol. 154, N 3. 541-55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
5. Bunai F. Tetrahymena eukaryotic translation elongation factor 1A (eEF1A) bundles filamentous actin through dimer formation / F. Bunai, K. Ando, H. Ueno, O. Numata // *The journal of biochemistry*. – 2006. – Vol. 140, N 3. – P. 393-399. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
6. Choudhary C. Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions / C. Choudhary, C. Kumar, F. Gnäd [et al.] // *Science*. – 2009. – Vol. 325, N 5942. – P.834-840. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
7. Couttas T.A. Methylation of translation-associated proteins in *Saccharomyces cerevisiae*: Identification of methylated lysines and their methyltransferases / T.A. Couttas, M.J. Raftery, M.P. Padula [et al.] // *Proteomics*. – 2012. – Vol. 12, N 7. – P. 960-972. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
8. Crepin T. Mammalian translation elongation factor eEF1A2: X-ray structure and new features of GDP/GTP exchange mechanism in higher eukaryotes / T. Crepin, V.F. Shalak, A.D. Yaremchuk [et al.] // *Nucleic acids research*. – 2014. – Vol.42, N 20. – P. 12939-12948. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
9. Dever T.E. Location of seven post-translational modifications in rabbit elongation factor 1 alpha including dimethyllysine, trimethyllysine, and glycerylphosphorylethanolamine / T.E. Dever, C.E. Costello, C.L. Owens [et al.] // *The journal of biological chemistry*. – 1989. – Vol. 264, N 34. – P. 20518-20525. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
10. Dzialo M.C. A new type of protein lysine methyltransferase trimethylates Lys-79 of elongation factor 1A / M.C. Dzialo, K.J. Travaglini, S. Shen [et al.] // *Biochemical and biophysical research communications*. – 2014. – Vol. 455, N 3-4. – P. 382-389. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
11. Egorova K.S. Lysine methylation of nonhistone proteins is a way to regulate their stability and function / K.S. Egorova, O.M. Olenkina, L.V. Olenina // *Biochemistry (Moscow)*. – 2010. – Vol. 75, N 5. – P. 535-548. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
12. Faria J.A. SET domain-containing protein 4 (SETD4) is a newly identified cytosolic and nuclear lysine methyltransferase involved in breast cancer cell proliferation / J.A. Faria, N.C. Corrêa, C. de Andrade [et al.] // *Journal of cancer science and therapy*. – 2013. – Vol. 5, N 2. – P. 58-65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
13. Hegde V. Human ribosomal protein S3 interacts with DNA base excision repair proteins hAPE/Ref-1 and hOGG1 / V. Hegde, M. Wang, W.A. Deutsch // *Biochemistry*. – 2004. – Vol. 43, N 44. – P. 14211-14217. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
14. Havugimana P.C. A census of human soluble protein complexes / P.C. Havugimana, G.T. Hart, T. Nepusz [et al.] // *Cell*. – 2012. – Vol. 150, N 5. – P.1068-1081. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
15. Gao X. Bacterial effector binding to ribosomal protein s3 subverts NF-kappaB function / X. Gao, F. Wan, K. Mateo [et al.] // *PLOS Pathogens*. – 2009. – Vol. 5, N 12. – e1000708. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
16. Gillardon F. Interaction of elongation factor 1-alpha with leucine-rich repeat kinase 2 impairs kinase activity and microtubule bundling in vitro // *Neuroscience*. – 2009. – Vol. 163, N 2. – P. 533-539. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
17. Gross S.R. Translation elongation factor 1A is essential for regulation of the actin cytoskeleton and cell morphology / S.R. Gross, T.G. Kinzy // *Nature structural and molecular biology*. – 2005. – Vol. 12, N 9. – P.772-778. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
18. Guzzo C.M. Lysyl-tRNA synthetase interacts with EF1 α , aspartyl-tRNA synthetase and p38 in vitro / C.M. Guzzo, D.C. Yang // *Biochemical and biophysical research communications*. – 2008. – Vol.365, N 4. – P. 718-723. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
19. Jang C.Y. RpS3, a DNA repair endonuclease and ribosomal protein, is involved in apoptosis / C.Y. Jang, J.Y. Lee, J. Kim // *FEBS Lett*. – 2004. – Vol. 560, N 1-3. – P. 81-85. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
20. Joo Y.J. Gcn4p-mediated transcriptional repression of ribosomal protein genes under amino-acid starvation / Y.J. Joo, J.H. Kim, U.B. Kang [et al.] // *EMBO journal*. – 2011. – Vol. 30, N 5. – P. 859-872. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
21. Kang D. Highly sensitive and fast protein detection with Coomassie brilliant blue in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis / D. Kang, Y.S. Gho, M. Suh, C. Kang // *Bulletin of the Korean chemical society*. – 2002. – Vol. 23, N 11. – P.1511-1512. Available from: <https://scholar.google.com.ua/>
22. Kim H.D. Aberrant ribosome biogenesis activates c-Myc and ASK1 pathways resulting in p53-dependent G1 arrest / H.D. Kim, T.S. Kim, J. Kim // *Oncogene*. – 2011. – Vol. 30, N 30. – P. 3317-3327. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
23. Kim S.H. Characterization of a wide range base-damage-endonuclease activity of mammalian rpS3 / S.H. Kim, J.Y. Lee, J. Kim // *Biochemical and biophysical research communications*. – 2005. – Vol. 328, N 4. – P. 962-967. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
24. Kim S.H. Reduction of invasion in human fibrosarcoma cells by ribosomal protein S3 in conjunction with Nm23-H1 and ERK / S.H. Kim, J. Kim // *Biochimica et biophysica acta*. – 2006. – Vol. 1763, N 8. – P. 823-832. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
25. Kudithipudi S. Role of somatic cancer mutations in human protein lysine methyltransferases / S. Kudithipudi, A. Jeltsch // *Biochimica et biophysica acta*. – 2014. – Vol. 1846, N 2. – P. 366-379. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
26. Lee J.S. Interaction network of human aminoacyl-tRNA synthetases and subunits of elongation factor 1 complex / J.S. Lee, G.S. Park, H. Park [et al.] // *Biochemical and biophysical research communications*. – 2002. – Vol. 291, N 1. – P.158-164. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
27. Li Z. Methylation of translation elongation factor 1A by the METTL10-like Set1 methyltransferase facilitates tombusvirus replication in yeast and plants / Z. Li, P.A. Gonzalez, Z. Sasvari [et al.] // *Virology*. – 2014. – Vol. 448. – P. 43-54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
28. Lipson R.S. Two novel methyltransferases acting upon eukaryotic elongation factor 1A in *Saccharomyces cerevisiae* / R.S. Lipson, K.J. Webb, S.G. Clarke // *Archives of biochemistry and biophysics*. – 2010. – Vol. 500, N 2. – P. 137-143. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
29. Lukash T.O. Chaperone-like activity of mammalian elongation factor eEF1A: renaturation of aminoacyl-tRNA synthetases / T.O. Lukash, H.V. Turkivska, B.S. Negrutskii, A.V. El'skaya // *The international journal of biochemistry and cell biology*. – 2004. – Vol. 36, N 7. – P. 1341-1347. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
30. Moore K.E. An unexpected journey: lysine methylation across the proteome / K.E. Moore, O. Gozani // *Biochimica et biophysica acta*. – 2014. – Vol. 1839, N 12. – P. 1395-1403. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
31. Morgunkova A. Lysine methylation goes global / A. Morgunkova, N.A. Barlev // *Cell cycle*. – 2006. – Vol.5, N 12. – P. 1308-1312. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
32. Motorin Yu.A. Mammalian valyl-tRNA synthetase forms a complex with the first elongation factor / Yu.A. Motorin, A.D. Wolfson, A.F. Orlovsky, K.L. Gladilin // *FEBS letters*. – 1988. – Vol. 238, N 2. – P.262-264. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
33. Negrutskii B.S. Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha: structure, expression, functions, and possible role in aminoacyl-tRNA channeling / B.S. Negrutskii, A.V. El'skaya // *Progress in nucleic acid research and molecular biology*. – 1998. – Vol. 60. – P. 47-78. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
34. Polevoda B. Methylation of proteins involved in translation / B. Polevoda, F. Sherman // *Molecular microbiology*. – 2007. – Vol. 65, N 3. – P. 590-606. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
35. Pradhan S. SET7/9 mediated methylation of non-histone proteins in mammalian cells / S. Pradhan, H.G. Chin, P.O. Estève, S.E. Jacobsen // *Epigenetics*. – 2009. – Vol. 4, N 6. – P. 383-387. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
36. Qin Y. Proteome identification of proteins interacting with histone methyltransferase SET8 / Y. Qin, H. Ouyang, J. Liu, Y. Xie // *Acta biochimica et biophysica sinica (Shanghai)*. – 2013. – Vol. 45, N 4. – P.303-308. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
37. Reed V.S. Mechanisms of the transfer of aminoacyl-tRNA from aminoacyl-tRNA synthetase to the elongation factor 1 alpha / V.S. Reed, M.E. Wastney, D.C. Yang // *The journal of biological chemistry*. – 1994. – Vol. 269, N 52. – P.32932-32936. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
38. Sasikumar A.N. The many roles of the eukaryotic elongation factor 1 complex / A.N. Sasikumar, W.B. Perez, T.G. Kinzy // *Wiley interdisciplinary reviews: RNA*. – 2012. – Vol. 3, N 4. – P. 543-555. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
39. Seong K.M. Yeast ribosomal protein S3 possesses a beta-lyase activity on damaged DNA / K.M. Seong, S.O. Jung, H.D. Kim [et al.] // *FEBS letters*. – 2012. – Vol. 586, N 4. – P. 356-361. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
40. Shi Y. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1 / Y. Shi, F. Lan, C. Matson [et al.] // *Cell*. – 2004. – Vol. 119. – P. 941-953. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
41. Shimazu T. Selenium-based S-adenosylmethionine analog reveals the mammalian seven-beta-strand methyltransferase METTL10 to be an EF1A1 lysine methyltransferase / T. Shimazu, J. Barjau, Y. Sohtome [et al.] // *PLoS One*. – 2014. – Vol. 9, N 8. – e105394. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
42. Stanborough T. Ribosomal protein S3 interacts with the NF- κ B inhibitor I κ B α / T. Stanborough, J. Niederhauser, B. Koch [et al.] // *FEBS letters*. – 2014. – Vol. 588, N 5. – P. 659-664. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

43. Urh M. HaloLink™ resin for protein pull-down and analysis / M. Urh, D. Simpson, J. Sankheil [et al.] // Promega cell notes. – 2006. – Vol.14. – P. 15-19. Available from: <https://www.promega.com/>

44. Wan F. IKKbeta phosphorylation regulates RPS3 nuclear translocation and NF-kappaB function during infection with Escherichia coli strain O157:H7 / F. Wan, A. Weaver, X. Gao, [et al.] // Nature Immunology. – 2011. – Vol. 12, N 4. – P. 335–334. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

45. Wan F. Ribosomal protein S3: a KH domain subunit in NF-kappaB complexes that mediates selective gene regulation / F. Wan, D.E. Anderson, R.A. Barnitz [et al.] // Cell. – 2007. – Vol. 31, N 5. – P. 927–939. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

46. Wang L. Novel somatic and germline mutations in intracranial germ cell tumours / L. Wang, S. Yamaguchi, M.D. Burstein [et al.] // Nature. – 2014. – Vol. 511, N 7508. – P.241-245. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

47. Weiner M.P. Site-directed mutagenesis of double-stranded DNA by the polymerase chain reaction / M.P. Weiner, G.L. Costa, W. Schoettlin [et al.] // Gene. – 1994. – Vol. 151, N 1-2. – P. 119-123. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

48. Wier E.M. Identification of an N-terminal truncation of the NF-kappaB p65 subunit that specifically modulates ribosomal protein S3-dependent NF-kappaB gene expression / E.M. Wier, J. Neighoff, X. Sun [et al.] // The journal of biological chemistry. – 2012. – Vol. 287, N 51. – P. 43019–43029. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

49. Yang F. Identification of an actin-binding protein from Dictyostelium elongation factor 1a [et al.] / F. Yang, M. Demma, V. Warren [et al.] // Nature. 1990. – Vol. 347, N 6292. – P. 494–496. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

50. Yadavilli S. Ribosomal protein S3: A multi-functional protein that interacts with both p53 and MDM2 through its KH domain / S. Yadavilli, L.D. Mayo, M. Higgins [et al.] // DNA repair (Amsterdam). – 2009. – Vol. 8, N 10. – P. 1215-1224. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Надійшла до редколегії 23.06.15

Л. Порублева, канд. биол. наук, Б. Негруцкий, д-р биол. наук.

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

А. Негеля, студ.

Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ МЕТИЛИРОВАНИЯ ФАКТОРА ЭЛОНГАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ EEF1A1 НА БЕЛОК-БЕЛКОВЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

Для выяснения влияния метилирования фактора элонгации трансляции eEF1A1 на его взаимодействие с другими белками был создан мутант, в котором метилируемый лизин в 55 положении заменен на аргинин. Были выделены белки, взаимодействующие с нормальным и мутантным eEF1A1. Идентифицированы некоторые белки, на взаимодействие с которыми может влиять метилирование eEF1A1.

Ключевые слова: eEF1A1, метилирование, HaloTag, белок-белковые взаимодействия.

L. Porubleva, PhD., Negrutsii, DSc.

Institute of Molecular Biology and Genetics National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine,

A. Negelya, stud.

Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

METHYLATION OF TRANSLATION ELONGATION FACTOR EEF1A1 AFFECTS THE PROTEIN-PROTEIN INTERACTIONS

In order to elucidate the significance of methylation of translation elongation factor eEF1A1 for its protein-protein interaction the 55 lysine residue, which is methylated in human, was mutated to arginine. Protein partners of eEF1A1 and the mutant were purified and some of them were identified with mass-spectrometry. The interactions with some protein partners of eEF1A1 were shown to be influenced by the methylation of eEF1A1 Lys55.

Key words: eEF1A1, methylation, HaloTag, protein-protein interactions.

УДК:634.8:581.167:631.532

О. Карастан, наук. співроб., Н. Мулюкіна, д-р с.-г. наук,

Г. Плачинда, мол. наук. співроб., О. Папіна, мол. наук. співроб.,

І. Ковалева, канд. с.-г. наук

Інститут виноградарства і виноробства імені В. С. Таїрова, Одеса

ОЦІНКА ГЕНЕТИЧНОЇ ПОДІБНОСТІ БЕЗНАСІННЄВИХ СОРТІВ ВИНОГРАДУ АМПЕЛОГРАФІЧНОЇ КОЛЕКЦІЇ НАВЧАЛЬНО-НАУКОВОГО ЦЕНТРУ "ІНСТИТУТ ВИНОГРАДАРСТВА ТА ВИНОРОБСТВА ІМЕНІ В. С. ТАІРОВА" ТА ЇХ ЙМОВІРНИХ БАТЬКІВСЬКИХ ФОРМ

Мікросателітні локуси (VVS2, VVMD5, VVMD7, VVMD27, VVMD28, VVMD32, ZAG79 та ZAG62) безнасіннєвих сортів винограду та їх ймовірних батьків використані для порівняльного аналізу генотипів та визначення генетичних дистанцій. Для восьми досліджуваних безнасіннєвих сортів підтверджені прямі родинні стосунки з ймовірними батьківськими сортами.

Ключові слова: мікросателітний аналіз, походження, SSR, виноград, дендрограма.

Вступ. Молекулярні маркери є важливим інструментом визначення та підтвердження/спростування походження сортів винограду.

Виявлення батьків для сортів з невідомим походженням та підтвердження батьківства є необхідною умовою для впорядкування матеріалу в колекціях винограду, забезпечення можливості повторення успішних схрещувань з метою досягнення аналогічних комбінацій ознак у нащадків [1], аналізу успадкування окремих ознак та виявлення локусів кількісних ознак [2], зворотнього відслідковування походження алелів інтересу [3] тощо.

Ідентифікація та підтвердження походження усіх сучасних сортів винограду можливі за умови збережен-

ня батьківських форм на промислових насадженнях або у ампелографічних колекціях [4, 5].

За відсутності особливих ознак, таких як, наприклад, пласка форма ягоди у сорту Альфонс Лавалле, "надломлена" центральна жилка листа у сорту Тельтікур, "пальчатість" поверхні листової пластинки у сорту Восторг, повстання опушення нижньої поверхні листової пластинки у V. labruska, виявлення походження сортів методами ампелографії практично неможливе. Так, наприклад, в роботі дослідників [1], попри подібність листа, грона, смаку, кольору та форми ягоди сорту Канадіс до сорту Делавер, аналіз їх мікросателітних профілів ви-

явив повну несумісність та показав стосунки "нащадок-батьківський сорт" між сортами Канадіс та Хімрод.

Відкриття молекулярних маркерів ДНК забезпечило потужний інструмент для філогенетичних досліджень різних видів рослин, в тому числі, винограду. Було відмічено, що лише молекулярні маркери надають змогу відслідковувати генеалогію окремих сімей, популяцій, причому для дослідження груп організмів на низьких таксономічних рівнях необхідні маркери, які швидко еволюціонують та не досягають границі свого насичення [6], яким притаманний значний рівень поліморфізму, що дозволяє проводити дискримінацію організмів в рамках виду. Гіперваріабельні ядерні мікросателітні маркери завдяки кодомінантній природі, успадкуванню за законами Г. Менделя, зручності використання та відтворюваності результатів стали найбільш поширеними у вивченні походження та родинних зв'язків між сортами винограду [1, 7, 8].

Запропонований дослідниками [9] та прийнятий міжнародною спільнотою ряд з шести мікросателітних маркерів дав змогу створити велику базу даних опублікованих генотипів світових ресурсів винограду – Європейський каталог сортів винограду (англ. Vitis International Variety Catalogue, VIVC) [10], що дозволяє порівнювати мікросателітні профілі і забезпечує початкову основу для тестування потенційних стосунків "нащадок-батьківський сорт". Для точної верифікації походження також рекомендується [1] порівнювати алейні профілі досліджуваних сортів із генотипами сортів "еталонної" колекції винограду Монпельє (Франція).

У деяких випадках при відсутності батьківських форм для аналізу походження особин можуть бути використані прабатьківські генотипи [1], а для вирішення суперечливого батьківства разом з маркерами SSR (англ. Simple Sequence Repeats – прості послідовності повторів) можуть використовуватися маркери SNP (англ. Single-Nucleotide Polymorphism – однонуклеотидний поліморфізм) [8].

В нашому попередньому дослідженні [11] був проведений порівняльний аналіз генотипів мікросателітних локусів сортів Кишмиш ОСГІ та Мечта з обома батьківськими формами. Було показано успадкування одного алеля у кожному локусі нащадків від генотипів батьківських сортів, що дозволяє говорити про наявність прямих родинних стосунків.

Через відсутність опублікованих алейних характеристик окремих ймовірних батьківських сортів походження сортів Белградський безнасіньвий, Інтерлейкін, Ромулус, Рушакі в попередній роботі аналізувалося за одним батьківським сортом, а родоводи сортів Русалка 1 та Русалка 3 не були досліджені, тому виникла необхідність подальшого аналізу із залученням додаткових мікросателітних маркерів.

Розширення ряду опублікованих мікросателітних локусів з шести (VVS2, VVMD5, VVMD7, VVMD27, ZAG62, ZAG79) до дев'яти (додатково VVMD25, VVMD28, VVMD32) у Європейському каталозі сортів, а також збільшення кількості сортів з представленими алейними характеристиками, дозволило нам додатково залучити окремі сорти (Недільчєв Магватлана, Мирний, Онтаріо, Мскхалі, Молінера, Чауш білий) для аналізу можливості походження від них досліджуваних безнасіньвих сортів винограду.

Метою нашої роботи була оцінка генетичної подібності безнасіньвих сортів винограду та їх батьківських форм за допомогою мікросателітних профілів сортів та генетичних дистанцій за Неєм.

Методи та матеріали досліджень.

Рослинний матеріал був представлений сортами винограду ампелографічної колекції Національного наукового центру "Інститут виноградарства і виноробства ім. В. Є. Таїрова" (далі ННЦ "ІВіВ ім. В. Є. Таїрова"): Белградський безнасіньвий, Інтерлейкін, Мечта, Кишмиш ВІРа, Кишмиш ОСГІ, Ромулус, Русалка 1, Русалка 3, Рушакі, Флейм сідлес, Кардинал, Каберне Совіньон, Шардоне та Чауш рожевий.

Листовий матеріал був відібраний на виноградних насадженнях ампелографічної колекції інституту та заморожений при – 20 ° С. Екстракція ДНК була проведена з використанням комерційного набору DNA Plant Kit (QIAGEN) згідно рекомендацій виробника.

Якість та концентрацію виділеної ДНК оцінювали електрофорезом у 0,8%-ому агарозному гелі.

Полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) здійснювали із використанням 9 мікросателітних маркерів (VVS2, ZAG62, ZAG79, VVMD5, VVMD7, VVMD27, VVMD28, VVMD25, VVMD32).

Капілярний електрофорез продуктів ПЛР проводили на автоматичному генетичному аналізаторі ДНК ABI Prizm 310 (Applied Biosystems). Розміри алелів мікросателітних фрагментів встановлювали за допомогою стандарту молекулярної маси ABI LIZ та комп'ютерної програми Gene Mapper 4.0.

Сорти Каберне Совіньон та Шардоне були використані в якості еталонних.

Інформація щодо походження досліджуваних безнасіньвих сортів винограду та мікросателітні профілі ймовірних батьківських сортів (Дим'ят, Онтаріо, Султанина, Кишмиш чорний, Мхалі, Чауш білий, Італія, Недільчєв Магватлана, Мирний, Барбера, Мускат олександрійський, Молінера) були залучені з Європейського каталогу сортів.

Алейні характеристики досліджуваних та ймовірних батьківських сортів за допомогою комп'ютерної програми Convert 1.31 [15] були трансформовані у матрицю алейних частот для вхідного файлу пакету комп'ютерних програм кластерного аналізу Philip-3.69 [16]. Програма Gendist була використана для розрахунку генетичних дистанцій за Неєм [17]. Філогенетичний аналіз методом попарного приєднання (англ. UPGMA – unweighted pair group method with arithmetic mean) був проведений за допомогою програми Neighbor. Візуалізація філогенетичного дерева була здійснена з використанням програми Drawgram.

Результати та їх обговорення

Сібси Інтерлейкін та Ромулус показали наявність спільних алелів в усіх досліджених локусах із материнським сортом Онтаріо (Табл.1). В попередньому дослідженні через відсутність інформації щодо алейного складу сорту Онтаріо, ми зробили спробу реконструкції його генотипу за мікросателітними профілями його нащадків – сортів Інтерлейкін та Ромулус – та отримали повний алейний склад чотирьох локусів. В інших локусах був визначений розмір одного з двох алелів. Через значну подібність генотипів сібсів було зроблено припущення щодо гомозиготності локусів ZAG62, VVMD5, VVMD7, VVMD25 та VVMD27. Опублікований в VIVC наприкінці 2014 р. генотип сорту Онтаріо підтвердив наше припущення для локусів VVMD5, VVMD25 та VVMD27.

Дослідження родоводу сорту Кишмиш ВІРа з використанням мікросателітних маркерів було проведено вперше.

За селекційними записами та даними Vitis International Variety Catalogue сорт Кишмиш ВІРа був отриманий в результаті гібридизації сортів Барбера та Кишмиш чорний. Залучення алейних характеристик дев'яти мікросателітних локусів батьківських сортів з

VIVC виявило спільні алелі в усіх досліджених локусах тільки із сортом Кишмиш чорний. Однакові з сортом Барбера алелі були детектовані лише в чотирьох локусах.

Оскільки неспівпадіння алельних характеристик більше ніж у двох локусах у нащадків та ймовірних батьків є свідченням відсутності прямих родинних зв'язків, сорт Барбера був відхилений в якості батьківського сорту.

Співставлення генотипів мікросателітних локусів пар сортів Рушакі-Мсхалі, Русалка 3-Недельчев Магватлана, Русалка 3- Мирний [8] показало існування одного спільного алеля у кожному дослідженому локусі.

Для аналізу родоводів сортів Русалка 1 та Флейм сідлес були використані генотипи їхніх прабатьківських сортів, як було запропоновано [1].

Сорт Русалка 1 був виведений при схрещуванні гібридної форми (гібрид х (Чауш білий х Італія) та безнасінового сорту Недельчев Магватлана.

Порівняльний аналіз генотипів нащадка та його батьківського сорту виявив спільні алелі в усіх восьми

досліджених локусах, і, відповідно, прямі родинні стосунки із сортом Недельчев Магватлана. Більшість алелів зі складу генотипу сорту Русалка 1 були виявлені також у генотипах прабатьківських сортів.

Привертає увагу наявність однакових алелів у восьми з дев'яти досліджених локусів сортів Русалка 1 та Італія, що може призвести до помилкових висновків щодо походження сорту Русалка 1. Значна подібність генотипів сортів Русалка 1 та Італія обумовлена тим, що Італія є батьківським сортом для сорту Недельчев Магватлана та прабатьківським для наразі невідомої материнської форми сорту Русалка 1.

Північноамериканський сорт Флейм сідлес має складне походження та при аналізі мікросателітних профілів показав наявність однакових алелів з усіма сортами (крім сорту Тіфафіхі ахмер, який не аналізувався) у складі родоводу.

Таблиця 1. Розміри алелів (п.о.) 9 мікросателітних локусів досліджуваних сортів винограду

№	Сорти	Мікросателітні локуси								
		VVS2	ZAG62	VVMD7	VVMD27	VVMD5	VVMD25	VVMD28	ZAG79	VVMD32
1	Белградський безнасі-невий	135:137	190:204	251:251	178:182	229:237	244:258	224:240	250:254	252:274
	♀ Дим'ят	145:145	190:206	241:251	176:178	243:249	252:258	240:252	240:262	252:266
2	Інтерлейкін	125:153	190:206	249:255	178:182	237:241	244:252	232:250	250:268	252:252
	♀ Онтаріо	125:127	204:206	237:249	182:182	241:241	244:0	232:236	250:268	242:252
	♂ Султаніна	147: 153	190:190	241:255	178:191	237:237	242:252	224:250	250:262	252:252
3	Ромулус	127:153	190:206	241:249	178:182	237:241	244:252	236:250	250:250	242:252
	♀ Онтаріо	125: 127	204:206	237:249	182:182	241:241	244:0	232:236	250:268	242:252
	♂ Султаніна	147: 153	190:190	241:255	178:191	237:237	242:252	224:250	250:262	252:252
4	Мечта	137:153	198:204	251:251	176:178	237:249	252:258	240:252	250:254	252:274
	♀ Чауш рожевий	137:145	190:198	251:251	176:176	241:249	252:258	240:264	252:254	266:274
	♂ Кишмиш чорний	153:159	190:204	251:255	178:191	237:237	248:252	224:252	250:254	252:252
5	Кишмиш ОСГІ	137:153	190:190	251:255	176:191	237:241	252:258	224:240	252:254	252:266
	♀ Чауш рожевий	137:145	190:198	251:251	176:176	241:249	252:258	240:264	252:254	266:274
	♂ Кишмиш чорний	153:159	190:204	251:255	178:191	237:237	248:252	224:252	250:254	252:252
6	Рушакі	153:153	190:190	241:249	176:178	237:241	252:252	224:242	250:262	252:274
	♀ Мсхалі	137: 153	190:202	249:251	176:191	241:249	252:258	242:254	250:250	258:274
	♂ Султаніна	147: 153	190:190	241:255	178:191	237:237	242:252	224:250	250:262	252:252
7	Русалка 1	135:157	202:206	249:251	176:182	237:239	242:244	250:264	246:258	252:274
	гібридна форма:									
	Чауш білий	137:153	190:206	249:251	176:180	231:241	252:258	264: 264	252:254	254: 274
	Італія	135:151	194:206	245:249	176:191	235:241	242:252	240:250	258:260	254:274
	♂Недельчев Магватлана	135:147	194:202	249:251	176:178	237:241	242:242	250:250	-	252:274
8	Русалка 3	147:157	190:202	251:255	176:191	241:243	242:248	242:250	258:260	252:274
	♀ Мирний	137: 157	-	249:255	182:191	239:243	248:252	240:242	-	274:274
	♂ Недельчев Магватлана	135:147	190:202	249:251	176:178	237:241	242:242	250:250	-	252:274
9	Кишмиш ВІРа	153:153	190:204	251:251	176:191	231:237	242:252	252:264	250:252	252:274
	♀ Барбера	135:137	194:202	251:255	182:186	229:229	242:258	240:264	246:262	254:274
	♂ Кишмиш чорний	153:159	190:204	251:255	178:191	237:237	248:252	224:252	250:254	252:252
10	Флейм сідлес	135:153	190:190	241:255	178:182	237:239	244:252	250:250	250:254	252:274
	Прабатьківські сорти:									
	Султаніна	147: 153	190:190	241:255	178:191	237:237	242:252	224:250	250:262	252:252
	Кардинал	137:137	188:188	251:251	176:182	229:239	258:258	250:272	254:258	254:274
	Мускат олександрійський	135:151	188:206	251:253	176:191	231:235	252:252	250:274	242:262	266: 274
	Молінера	139:147	190:206	245:251	178:191	237:241	244:258	240:264	250:260	254:274
	Референсні сорти:									
	Шардоне	139:145	190:198	241:245	178:186	237:241	242:258	224:234	246:248	242:274
	Каберне Совіньон	141:153	190:196	241:241	172:186	235:243	242:252	240:242	250:250	242:242

Примітка: жирним виділені назви сортів-нащадків та алелі мікросателітних локусів батьківських генотипів, що були успадковані; рискою позначено відсутні дані.

На основі отриманих даних щодо поліморфізму досліджуваних мікросателітних локусів за допомогою пакету комп'ютерних програм був проведений кластерний аналіз методом UPGMA. Генетичні відстані між досліджуваними сортами та їх ймовірними батьками були візуалізовані у вигляді дендрограми (Рис.1).

Три значні кластери сформували нащадки сортів Кишмиш чорний (Мечта, Кишмиш ВІРа, Кишмиш ОСГІ), Султаніна (Інтерлейкін, Ромулус, Рушакі, Флейм сідлес) та Мускат олександрійський (Русалка 1, Русалка 3, Недельчев Магватлана, Італія).

Здебільшого спільно кластеризувалися нащадки та батьківські сорти (Русалка 3 – Мирний, Русалка 1 – Не-

дельчев Магватлана) або нащадки одних батьків (Ромулус – Інтерлейкін, Кишмиш ОСГІ – Мечта).

Сорти Італія та Мускат олександрійський увійшли до складу одного субкластера оскільки Мускат олександрійський є прабатьківським сортом для Італії.

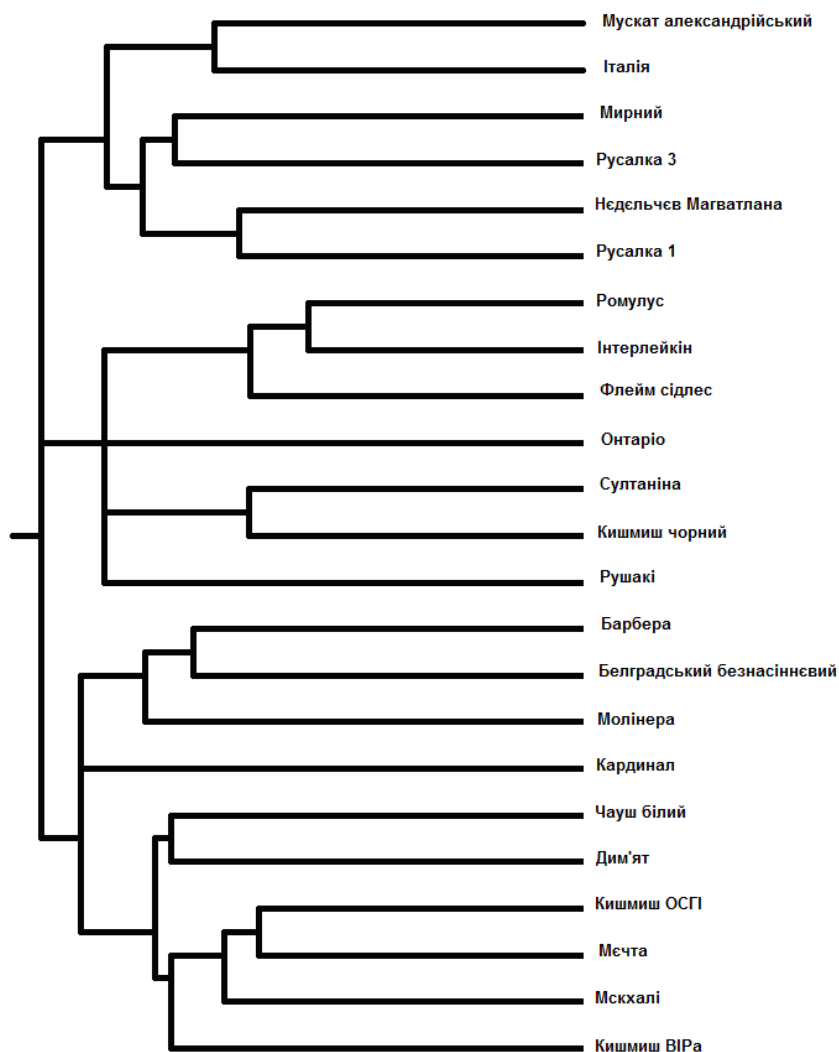


Рис. 1. Кластеризація досліджуваних сортів винограду та їх ймовірних батьківських сортів за генетичними дистанціями

Окремий субкластер сформували північноамериканські нащадки сорту Султаніна – сорти Ромулус, Інтерлейкін та Флейм сидлес.

Спільна кластеризація сортів Барбера, Белградський безнасіньвий та Молінера свідчить про певний ступінь генетичної подібності, але наразі не може бути пояснена спорідненістю сортів чи випадковим успадкуванням подібних алелів через відсутність інформації щодо походження сортів Барбера та Молінера.

Спільну кластеризацію сортів Чауш білий та Дим'ят (Коарна алба x Хейніш вейс) також важко пояснити через брак інформації щодо батьківських форм сорту Чауш білий та прабатьківських форм сорту Дим'ят.

Висновок.

Таким чином, для семи з дев'яти прогенотипованих за мікросателітними локусами безнасіньвих сортів колекції винограду ННЦ "ІВіВ ім. В.Є. Таїрова" були підтверджені прямі родинні стосунки з ймовірними батьківськими сортами. Сорти Белградський безнасіньвий та Кишмиш ВІРа не показали подібності генотипу до ймовірних батьківських сортів.

Отримані результати в подальшому будуть використані для визначення ідентичності за походженнями нащадків

досліджуваних сортів та планування гібридизаційних схем з урахуванням генетичної спорідненості сортів.

Список використаних джерел

1. Use of genetic markers to assess pedigrees of grape cultivars and breeding program selections / J. Bautista, G. S. Dangi, J. Yang [et al.] // *Am. J. Enol. Vitic.* – 2008. – Vol. 59. – № 3. – P. 248-254.
2. Jannink J. L. Using complex plant pedigrees to map valuable genes / J. L. Jannink, M. Bink, R. C. Jansen // *Trends Plant Sci.* – 2001. – Vol. 6. – № 8. – P. 337-342.
3. Selective sweep at the Rpv3 locus during grapevine breeding for downy mildew resistance / G. Di Gaspero, D. Copetti, C. Coleman [et al.] // *Theor. Appl. Genet.* – 2012. – Vol. 124. – № 2. – P. 277-286.
4. Bowers J. E. Development and characterization of additional microsatellite DNA markers for grape / J. E. Bowers, G. S. Dangi, C. P. Meredith // *Am. J. Enol. Vitic.* – 1999. – Vol. 50. – № 3. – P. 243-246.
5. Pedigree reconstruction of the Italian grapevine aglianico (*Vitis vinifera* L.) from Campania / G. De Lorenzis, S. Imazio, B. Biagini [et al.] // *Molecular biotechnology.* – 2012. – V. 54. – № 2. – P. 634-642.
6. Абрамсон Н. И. Молекулярные маркеры, филогеография и поиск критерия разграничения видов / Н. И. Абрамсон // *Тр. Зоол. Ин-та РАН*, 2009. – Прил. 1. – С. 185-198.
7. Leao P. C. De S. Diversity and genetic relatedness among genotypes of *Vitis* spp. using microsatellite molecular markers / P. C. De S. Leao, C. D. Cruz, S. Y. Motoike // *Rev. Bras. Frutic.* – V. 35. – № 3. – P. 799-808.
8. Large-scale parentage analysis in an extended set of grapevine cultivars (*Vitis vinifera* L.) / T. Lacombe, J. Michel, B. V. Laucou [et al.] // *Theor. Appl. Genet.* – 2013. – Vol. 126. – P. 401-414.

9. Development of a standard set of microsatellite reference alleles for identification of grape cultivars / P. This, A. Jung, J. Borrego [et al.] // Theor. Appl. Genetic. – 2004. – Vol. 109. – P. 1448-1458.

10. Vitis International Variety Catalogue [Електронний ресурс]. – Available from: <http://www.vivc.de>

11. Ідентифікація та походження безнасінних сортів винограду колекції ННЦ "Інститут виноградарства і виноробства ім. В. Е. Таїрова" // О. М. Карастан, Н. А. Мулюкіна, Г. В. Плачинда, Папіна О. С. // 36. наук. праць СГП. – 2014. – Вип. 23. – № 64. – С. 15-25.

12. Карастан О. М. Происхождение некоторых форм винограда селекции ННЦ "ИВиВ им. В. Е. Таирова" / О. М. Карастан, Н. А. Мулюкіна, Е. С. Папина [и др.] // Агротехнологии XXI века: концепции устойчивого развития: материалы международной конференции, посвященной 100-летию кафедры ботаники, защиты растений, биохимии и микробиологии (Воронеж, 17-18 апреля 2014 г.): тезисы докл. Воронеж, 2014. – С. 341-346.

13. 'Sangiovese' and 'Garganega' are two key varieties of the Italian grapevine assortment evolution / M. Crespan, A. Calo, S. Giannetto [et al.] // Vitis. – 2008. – Vol. 47. – № 2. P. 97-104.

14. Microsatellite markers for grapevine: A state of the art / K. M. Sefc, F. Lefort, S. Grando / K. A. Roubelakis-Angelakis editor / Amsterdam: Kluwer Publishers. – 2001. – P. 433-463.

15. Convert 1.31. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://www.agriculture.purdue.edu/fnr/html/faculty/rhodes/students%20and%20staff/glaubitz/software.htm>

16. Phylip-3.69 [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>

17. Nei M. Genetic distance between populations // American Naturalist. – 1972. – V. 106. – P. 283-292.

Надійшла до редколегії 06.04.15

О. Карастан, науч. сотр., Н. Мулюкіна, д-р с.-х. наук, Г. Плачинда, младш. науч. сотр., О. Папина, младш. науч. сотр., И. Ковалева, канд. с.-х. наук
Институт виноградарства и виноделия имени В. Е. Таирова, Одесса, Украина

ОЦЕНКА ГЕНЕТИЧЕСКОГО СХОДСТВА БЕССЕМЯНЫХ СОРТОВ ВИНОГРАДА КОЛЕКЦИИ УЧЕБНО-НАУЧНОГО ЦЕНТРА "ИНСТИТУТ ВИНОГРАДАРСТВА И ВИНОДЕЛИЯ ИМ. В. Е. ТАИРОВА" И ИХ ПРЕДПОЛАГАЕМЫХ РОДИТЕЛЬСКИХ ФОРМ

Микросателлитные локусы (VVS2, VVMD5, VVMD7, VVMD27, VVMD28, VVMD32, ZAG79 and ZAG62) бессемянных сортов винограда и их возможных родителей использованы для сравнительного анализа генотипов и определения генетических дистанций. Для восьми исследуемых бессемянных сортов подтверждены прямые родственные отношения с предполагаемыми родительскими сортами.

Ключевые слова: микросателлитный анализ, происхождение, SSR, виноград, дендрограмма.

O. Karastan, research., N. Mulyukina, DSc., G. Plachinda, jr. research., A. Papina jr. research., I. Kovaleva, PhD.
Tairov Institute of Viticulture and Winemaking, Odesa, Ukraine

ASSESSMENT OF GENETIC SIMILARITY OF SEEDLESS GRAPES FROM COLLECTIONS NSC "TAIROV INSTITUTE OF VITICULTURE AND WINEMAKING" AND THEIR PROBABLE PARENTAL FORMS

Microsatellite loci (VVS2, VVMD5, VVMD7, VVMD27, VVMD28, VVMD32, ZAG79 and ZAG62) of seedless grape varieties and their putative parents were used for comparative analysis of genotypes and genetic distance. Direct family relationships between eight investigated seedless varieties and their putative parents were confirmed. Genotype of cultivar Beogradska bessemena was found to have no similarity with microsatellite profile of conjecturable parent Dimyat. Variety Kishmish of VIR showed close relationships with only one parent – Kishmish chorniy; they have at least one common allele in each investigated locus.

Keywords: microsatellite analysis, parentage, SSR, grapevine, dendrogram.

УДК 581.19.577.355.3

У. Стамбульська, здобувач
Прикарпатський національний університет імені Василя Стефаника, Івано-Франківськ

ВПЛИВ БІХРОМАТУ КАЛІЮ НА ФІЗІОЛОГО-БІОХІМІЧНІ ПОКАЗНИКИ РОСЛИН ГОРОХУ

Вивчено вплив біхромату калію на морфометричні показники і концентрацію пігментів у листках рослин гороху сорту Альфа. Наявність солі хрому в середовищі росту спричиняло значне зниження довжини та біомаси пагона і кореня гороху, призводило до зростання концентрації хлорофілів, каротиноїдів та антоціанів.

Ключові слова: горох, хром, пігменти.

Вступ. Рослини в процесі вегетації часто піддаються впливу несприятливих чинників навколишнього середовища, зокрема дії іонів важких металів (ВМ) [12]. Серед ВМ, які впливають на фізіолого-біохімічні процеси рослин, відомий хром, зокрема шестивалентний [7]. Оскільки хром широко використовується в різних галузях промисловості, то забруднення навколишнього середовища Cr^{6+} в останні роки стало серйозною проблемою [8]. Cr^{6+} є більш токсичним для рослин, ніж Cr^{3+} і може зберігатися у ґрунті протягом кількох місяців не змінюючи свого ступеня окислення [12, 18]. Накопичення хрому в рослинах впливає на їхні метаболічні процеси, зокрема призводить до порушення обміну речовин та пригнічення росту, фотосинтезу, зниження активності деяких ферментів, деградацію хлоропластів і мітохондрій [18].

Метою даної роботи було дослідити зміну фізіологічних параметрів та вміст фотосинтетичних пігментів у листках рослин гороху посівного за дії різних концентрацій біхромату калію.

Матеріали і методи. Для досліджень використовували рослини гороху посівного – *Pisum sativum* L. сорту Альфа. У роботі були використані реактиви виробництва

"Sigma Chemical Co." (США), "Peachim" (Росія). Решта реактивів – вітчизняного виробництва класу не нижче ч.д.а.

Насіння гороху стерилізували 5 хвилин в 96% етанолі і 30 хвилин у відбілювачі "Білизна", після чого ретельно промивали великою кількістю стерильної дистильованої води і пророщували протягом 5 діб у вологій камері. Рослини вирощували у 2-х кілограмових поліетиленових посудинах з використанням у якості субстрату стерилізованого річкового піску і поживної суміші Кнопа збідненої на азот (0,25 норми) [3]. Як джерело хрому для дослідних варіантів використовували водний розчин солі біхромату калію $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ в концентрації 0,001 мкМ, 0,01 мкМ і 0,1 мкМ на 1 кг субстрату. В контрольний варіант розчин солі не вносили. Рослини вирощували при температурі 25 ± 2 °C за умов 16-годинного світлового дня та освітленості 6300 Лк. Полив проводили через добу відстояною водопровідною водою у кількості 100 мл на посудину. Забір рослинного матеріалу здійснювали на 5-ту, 10-ту та 15 добу росту. Визначали довжину та масу пагона і кореня рослин, верхівкове листя використовували для визначення концентрації пігментів.

Пігменти екстрагували з рослин гороху шляхом гомогенізації у порцеляновій ступці в охолодженому 96% етанолі у співвідношенні 1:10 (маса:об'єм) з додаванням CaCO_3 на кінчику шпателя (для нейтралізації середовища). Гомогенати центрифугували 10 хв при 8000 g (4°C) на центрифугі ОПН-8 (СССР). Отримані осад тричі промивали 1 мл етанолу і центрифугували в попередньому режимі, після чого екстракти об'єднували [16, 17]. Концентрацію пігментів визначали спектрофотометричним методом в кінцевому сумарному екстракті з використанням характерних коефіцієнтів абсорбції [17]. Для визначення вмісту антоціанів до екстракту пігментів додавали концентровану соляну кислоту до кінцевої концентрації 1%. Оптичне поглинання вимірювали спектрофотометрично при довжині хвилі 530 нм [16].

Дані представлені як середнє $\pm$ похибка середнього ($M \pm m$). Статистичну обробку здійснювали, використовуючи критерій Даннета.

Результати та обговорення. Розчинні у воді і ґрунті солі хрому, створюють потенційно токсичне середовище для рослини і призводять до серйозних пошкоджень багатьох фізіологічних процесів [13]. За дії хрому відбувається інгібування проростання насіння і розвитку проростків, сповільнення росту кореневої системи, зміна кольору коренів, хлороз і некроз листків, зниження біомаси рослин [8].

Зміни ростових процесів протягом онтогенезу рослини є відображенням протікання біохімічних реакцій у тканинах. Тому дослідження впливу хрому, який спричиняє порушення клітинного гомеостазу, було розпочато з вивчення змін морфометричних параметрів рослин гороху. На 5 добу росту різні концентрації солі хрому не

впливали на довжину пагона рослин гороху (рис. 1А). На 10 і 15 доби росту спостерігали тенденцію до зменшення довжини пагона гороху при збільшенні концентрації біхромату калію в субстраті. У рослин, вирощених у середовищі з 0,1 мМ концентрацією солі хрому, на 10 добу росту довжина пагона була меншою відносно контрольних рослин на 38%. Окрім того, у 15-ти денних рослин за дії біхромату калію у концентрації 0,01 мМ та 0,1 мМ довжина пагона була у два рази меншою, порівняно з контролем. Зниження ростових параметрів рослин за дії хрому описане у пшениці [11] та інших рослин [15]. Зниження росту рослин пов'язують з токсичним впливом хрому на коріння, що веде до зменшення поглинання рослиною поживних речовин [15]. Окрім того, пригнічення росту є загальним проявом токсичності іонів важких металів для рослин і їх прямою дією на поділ і розтягування клітин [6, 8]. У 5-ти денних рослин, вирощених у середовищі з концентрацією солі хрому 0,01 та 0,1 мМ, відбувалось зменшення маси надземної частини на 13 і 37% відповідно порівняно з контролем (рис. 1Б). Наявність солі хрому в середовищі вирощування у концентраціях 0,01 та 0,1 мМ призводила до зменшення маси пагона у 10-ти денних рослин на 27 і 89% відповідно порівняно з контролем. На 15 добу росту гороху спостерігали достовірне зменшення маси надземної частини у всіх дослідних варіантах відносно контролю на 15, 57 і 77%. Зменшення біомаси рослин під дією стресу хромом спостерігали також у багатьох видів рослин [10, 15]. Даний ефект може бути зумовлений токсичною дією хрому на рослини, що призводить до фізико-хімічних і ультраструктурних змін [10], або викликає оксидативний стрес [15].

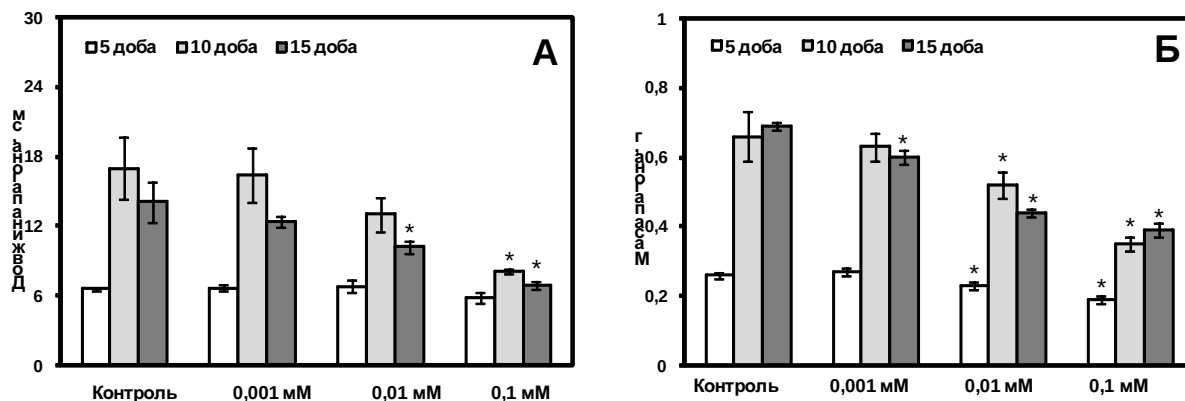


Рис. 1. Довжина (А) і маса (Б) пагона рослин гороху за дії біхромату калію в різних концентраціях

Примітки: *Вірогідно відмінне від відповідного контрольного значення (без біхромату калію) з $P < 0,05$. ($n=6-7$)

Аналогічну тенденцію щодо зміни ростових параметрів при підвищенні концентрації біхромату калію у середовищі нами помічено при аналізі довжини і маси коріння гороху (рис. 2). Вирощування гороху в присутності 0,001 мМ солі хрому не впливало на довжину коренів рослин протягом усього періоду їхнього росту (рис. 2А). Проте наявність біхромату калію у концентрації 0,01 мМ спричиняло достовірне зменшення їхньої довжини у 5-ти та 15-ти добових рослин на 60 і 52% відповідно порівняно з контролем. Збільшення концентрації солі хрому до 0,1 мМ призводило до подальшого зменшення довжини коренів у 2-2,5 рази відносно контрольного варіанту. З рис. 2Б видно, що вирощування рослин у середовищі з концентрацією біхромату калію 0,01 та 0,1 мМ на 5 добу спричиняло також і зменшення маси кореня на 13 і 37% відповідно порівняно з контролем. При ви-

рощуванні гороху в присутності 0,1 мМ солі хрому відбувалось достовірне зменшення маси коренів рослин порівняно з контролем протягом усього періоду їхнього росту. Одержані результати вказують на те, що коренева система рослин гороху на відміну від пагонів є більш чутливою до впливу різних концентрацій солі хрому і виявляє значні зміни навіть під час його короткотривалої дії. При цьому гальмівний ефект біхромату калію на ростові процеси тим більший, чим вища концентрація солі в середовищі вирощування рослин або довший термін її впливу. Отримані результати узгоджуються з літературними даними, оскільки відомо, що підвищені дози ВМ викликають сповільнення росту коренів рослин [7, 9]. Коріння являється першим бар'єром на шляху транспорту металів з ґрунту в рослину, і саме корінь бере на себе головну функцію з акумуляції і детоксика-

ції ВМ [6]. Під впливом ВМ зменшується довжина головного кореня і кількість бокових корінців, відмирають кореневі волоски, знижується біомаса коренів [9]. Встановлено негативний вплив різних рівнів забруднення

ґрунту, в тому числі Cr^{6+} на розвиток, зниження накопичення кореневої маси, зменшення загальної поглинальної поверхні, отже, і на функцію поглинання кореневих систем гороху та вівса [5].

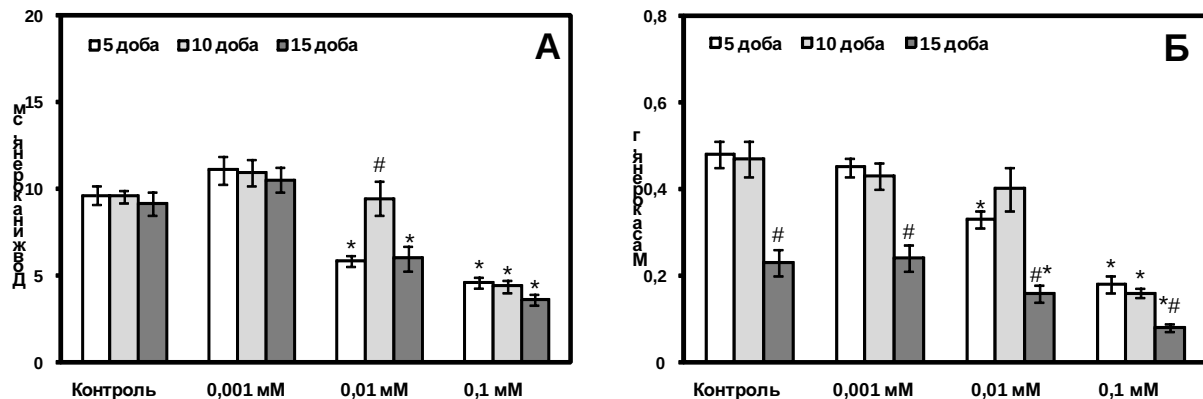


Рис. 2. Довжина (А) і маса (Б) кореня рослин гороху за дії біхромату калію в різних концентраціях

Примітки: *Вірогідно відмінне від відповідного контрольного значення (без біхромату калію) та # від відповідних значень на 5-ту і 10-ту доби з $P < 0,05$. (n=6-7)

Проникаючи у клітини, іони важких металів негативно впливають на фізіологічні процеси і життєдіяльність рослин. Фотосинтез є одним з найчутливіших фізіологічних процесів [6]. Результати наших експериментів показали, що наявність біхромату калію в середовищі вирощування спричиняло підвищення концентрації хлорофілу *a* у листках гороху на 36-45% відносно контролю вже на 5 добу росту рослин (таблиця). У 10-ти і 15-ти добових рослин біхромат калію в концентрації 0,01 мМ призводив до збільшення вмісту хлорофілу *a* порівняно з контролем у 1,4 і 1,6 рази відповідно. Причому концентрація хлорофілу *a* в листках зростала протягом подальшого росту рослин. Аналогічні результати нами отримані при аналізі концентрації хлорофілу *b* та загального хлорофілу *a+b* (таблиця). Співвідношення вмісту хлорофілу *a* і хлорофілу *b*, за наявності в середовищі солі хрому в концентраціях 0,001 та 0,01 мМ на 5 добу росту було вірогідно нижчим, порівняно з контролем. На 10 добу росту співвідношення хлорофіл *a/b* не відрізнялось у дослідних і контрольному варіантах. На 15 добу росту у всіх варіантах відбува-

лось зниження даного показника відносно попередніх 5 і 10 діб. Окрім того, при вирощуванні гороху в присутності 0,1 мМ біхромату калію співвідношення хлорофіл *a/b* було нижчим, ніж в контролі на 24%. Негативний вплив ВМ на фотосинтез, як правило, характерний для їх високих концентрацій. Однак в літературі зустрічаються і дані про можливість стимулюючої дії низьких концентрацій ВМ на окремі складові цього процесу. Показано збільшення вмісту хлорофілів у листках кукурудзи і ячменю в присутності цинку і свинцю в концентраціях 1 мМ [6, 14]. Можливо, підсилення фотосинтетичних процесів пов'язане з підвищенням активності ФС II, а також зумовлене загальною активізацією метаболізму у відповідь на дію слабого стресу, викликаного ВМ [6]. Припускають, що в стресових умовах життя рослинний організм максимально реалізує потенційні генетично закладені функціональні можливості фотосинтетичної системи. Зростання вмісту пігментів, перш за все хлорофілу *a*, є однією з неспецифічних реакцій адаптації в умовах дії стресових факторів [4].

Таблиця. Концентрація хлорофілу (мкмоль/г сирої маси) у листках гороху за дії біхромату калію в різних концентраціях

Варіант досліджу	Хлорофіл <i>a</i>	Хлорофіл <i>b</i>	Хлорофіл <i>a+b</i>	<i>a/b</i>
5-ти добові рослини				
Контроль	1,11 ± 0,12	0,50 ± 0,05	1,62 ± 0,17	2,21 ± 0,02
0,001 мМ $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	1,51 ± 0,07*	0,70 ± 0,03*	2,21 ± 0,09*	2,15 ± 0,02*
0,01 мМ $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	1,52 ± 0,05*	0,72 ± 0,03*	2,24 ± 0,08*	2,11 ± 0,03*
0,1 мМ $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	1,61 ± 0,19*	0,71 ± 0,10*	2,32 ± 0,29*	2,29 ± 0,10
10 добові рослини				
Контроль	2,15 ± 0,03 [#]	0,96 ± 0,02 [#]	3,11 ± 0,01 [#]	2,24 ± 0,09
0,001 мМ $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	2,07 ± 0,27	0,94 ± 0,10 [#]	3,02 ± 0,37	2,18 ± 0,06
0,01 мМ $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	2,48 ± 0,12* [#]	1,12 ± 0,05* [#]	3,61 ± 0,18* [#]	2,21 ± 0,04
0,1 мМ $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	2,08 ± 0,05 [#]	0,95 ± 0,02 [#]	3,04 ± 0,66	2,18 ± 0,05
15 добові рослини				
Контроль	1,47 ± 0,19*	0,72 ± 0,08*	2,20 ± 0,27*	2,03 ± 0,07 [#]
0,001 мМ $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	1,63 ± 0,27	0,83 ± 0,13	2,47 ± 0,40	1,96 ± 0,01 ^{#*}
0,01 мМ $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	2,22 ± 0,23* [#]	1,11 ± 0,11* [#]	3,33 ± 0,34* [#]	2,00 ± 0,03 ^{#*}
0,1 мМ $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	1,42 ± 0,17*	0,89 ± 0,17	2,30 ± 0,33	1,64 ± 0,16* ^{#*}

Примітки: *Вірогідно відмінне від відповідного контрольного значення (без біхромату калію), [#] від відповідних значень на 5-ту добу та * від відповідних значень на 10-ту добу з $P < 0,05$. (n=3).

Найбільш розповсюдженою, численною та важливою групою природних пігментів є каротиноїди. Виконуючи роль допоміжних пігментів вони, беруть участь у функціонуванні реакційних центрів і світлозбиральних комплексів фотосистем, виконують захисні функції (знешкоджують триплетний хлорофіл, синглетний кисень, супероксидний аніон-радикал) [2]. Як видно з рис. 3А, наявність солі хрому у концентрації 0,01 мМ спричиняло достовірне підвищення вмісту каротиноїдів у 5-ти, 10-ти і 15-ти добових рослин порівняно з контролем на 20-48%. На 5 добу росту за наявності 0,001 мМ біхромату калію в середовищі концентрація каротиноїдів також була вищою порівняно з контролем на 35%. Підвищення рівня каротиноїдів спостерігали і на 10 добу за присутності 0,1 мМ солі хрому. У 10-ти добових рослин відбувалося підвищення концентрації каротиноїдів порівняно з рослинами на 5-ту добу росту практично у всіх досліджуваних варіантах. Одержані нами результати узгоджуються з літературними даними та до-

водять активну участь каротиноїдів у антиоксидантному захисті фотосинтетичного апарату рослин [18]. Окрім того, відомо, що каротиноїди менше піддаються впливу іонів важких металів, порівняно з хлорофілами, а збереження їхнього вмісту на постійному рівні пов'язують з їх захисною роллю [6].

При вирощуванні гороху за присутності 0,01 мМ біхромату калію у субстраті концентрація антоціанів, подібно до концентрації каротиноїдів, на 5 добу росту була більшою порівняно з контролем на 15-46% (рис. 3Б). Достовірне збільшення вмісту антоціанів відносно контролю за даної концентрації солі хрому спостерігали і у 10-ти і 15 добових рослин. Вміст антоціанів у 10-ти добових рослин перевищував такий у 5-ти добових рослин практично у всіх досліджуваних нами варіантах. Активне накопичення антоціанів у вакуолях клітин може підвищувати ефективність антиоксидантної системи в процесі нейтралізації продуктів окисдативного стресу і сприяти підвищенню стійкості рослин до дії забруднювача [1].

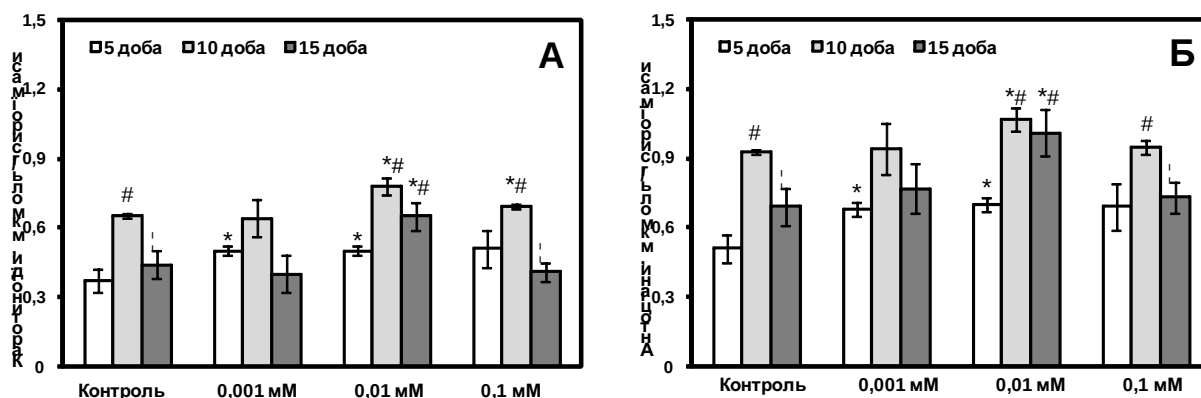


Рис. 3. Концентрація каротиноїдів (А) та антоціанів (Б) (мкмоль/г сирової маси) у листках гороху за дії біхромату калію в різних концентраціях

Примітки: *Вірогідно відмінне від відповідного контрольного значення (без біхромату калію), # від відповідних значень на 5-ту добу та * від відповідних значень на 10-ту добу з $P < 0,05$. ($n=3$).

Висновки: Таким чином, проведені дослідження показали, що наявність високих концентрацій біхромату калію в середовищі викликає пригнічення росту пагонів і коренів гороху та зниження їхньої біомаси. Збільшення вмісту хлорофілів за дії різних концентрацій солі хрому може свідчити про неспецифічну реакцію адаптації гороху за даних умов. Присутність солі хрому в середовищі вирощування призводить до зростання концентрації каротиноїдів та антоціанів у листках рослин, що може бути пов'язане з їхньою захисною роллю.

Список використаних джерел

1. Индикаторные свойства антиоксидантной системы чины приморской (*Lathyrus maritimus* Bigel.) // "Антропогенная трансформация природной среды. – Міжн. конф. – 18-21 октября 2010 г. – тезисы докладов. – Пермь. – 2010. – Т. 1., Ч. 2. – С. 24–30.
2. Прядкина Г.А. Онтогенетические изменения содержания каротиноидов и ксантофиллов в листьях яровой пшеницы в зависимости от уровня азотного питания / Г.А. Прядкина, В.В. Дмитриева // Физиология и биохимия культурных растений. – 2007. – Т. 39, № 3. – С. 212–219.
3. Прянишников Д. Н. Агрохимия. – М.: Сельхозгиз, 3 изд., 1940. – 644 с.
4. Риктор И.А. Влияние буроугольных гуминовых удобрений на снижение стрессовой реакции у растений *Festuca pratensis* Huds / И.А. Риктор, Ю.Н. Зубкова, А.В. Бутюгин // Вісник Донецького національного університету. Серія А: Природничі науки. – 2011. – № 1. – С. 115–122.
5. Самохвалова В. Мікроелементи рослин за впливу надлишку важких металів у системі ґрунт-рослина / В. Самохвалова // Вісник Львівського університету. Серія біологія. – 2009. – Вип. 50. – С. 164–176.
6. Устойчивость растений к тяжелым металлам / [Титов А.Ф., Таланова В.В., Казнина Н.М., Лайдинен Г.Ф.]. // Институт биологии КарНЦ РАН. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2007. – 172 с.

7. Яковлева С.О. Влияние Cr^{6+} в среде вирощування на ріст коренів та активність в них нітратредуктази у чорнобривців прямостоячих і календули лікарської / С.О. Яковлева // Вісник Запорізького державного університету. – 1998. – № 1. – С. 1–3.
8. Amin H. Analysis of growth response and tolerance index of *Glycine max* (L.) Merr. under hexavalent chromium stress / H. Amin, B.A. Arain, F. Amin [et al.] // Advanced life sciences. – 2014. – Vol. 1, N. 4. – P. 231–241. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
9. Barceló J. Plant water relations as affected by heavy metal stress: a review / J. Barceló, Ch. Poschenrieder // Journal of plant nutrition. – 1990. – Vol. 3, N. 1. – P. 1–37. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
10. Gill R.A. Chromium-induced physio-chemical and ultrastructural changes in four cultivars of *Brassica napus* L. / R.A. Gill, L. Zang, B. Ali [et al.] // Chemosphere. – 2015. – Vol. 120. – P. 154–164. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
11. Dey S.K. Antioxidative efficiency of *Triticum aestivum* L. exposed to chromium stress / S.K. Dey, P.P. Jena, S. Kundu // Journal of environmental biology. – 2009. – Vol. 30, N. 4. – P. 539–544. Available from: <http://www.jeb.co.in>
12. Paiva L.B. Ecophysiological and biochemical parameters for assessing Cr^{6+} stress conditions in *Pterogyne nitens* Tul.: new and usual methods for the management and restoration of degraded areas / L.B. Paiva, S.F. Correa, C. Santa-Catarina [et al.] // Environmental engineering and management journal. – 2014. – Vol. 13, N. 12. – P. 3073–3081. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
13. Ali S. Effect of chromium and nitrogen form on photosynthesis and anti-oxidative system in barley / S. Ali, M.A. Farooq, M.M. Jahangir [et al.] // Biologia plantarum. – 2013. – Vol. 57, N. 4. – P. 758–763. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
14. Stiborova M. Effect of heavy metal ions on growth and biochemical characteristics of photosynthesis of barley (*Hordeum vulgare* L.) / M. Stiborova, M. Doubravova, A. Brezinova [et al.] // Photosynthetica. – 1986. – Vol. 20, N. 4. – P. 418–425. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
15. Ali S. Fulvic acid mediates chromium (Cr) tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) through lowering of Cr uptake and improved

antioxidant defense system / S. Ali., S.A. Bharwana, M. Rizwan [et al.] // Environmental science and pollution research. – 2015. – P. 1–9. Available from: <http://www.researchgate.net>

16. Gitelson A.A. Optical properties and non-destructive estimation of anthocyanin content in plant leaves / A. A. Gitelson, M. N. Merzlyak, O. B. Chivkunova // Photochemistry and photobiology. – 2001. – Vol. 74, N 1. – P. 38–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

17. Lichtenthaler H.K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes / H. K. Lichtenthaler // Methods in enzymology. – 1987. – Vol. 148. – P. 331–382. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

18. Panda S.K. Chromium stress in plants / S.K. Panda, S Choudhury // Brazilian journal of plant physiology. – 2005. – Vol. 17, N 1. – P. 95–102. Available from: <http://www.scielo.br>

Надійшла до редколегії 24.06.15

У. Стамбульська, соиск.

Прикарпатський національний університет імені Василя Стефаника, Івано-Франківськ, Україна

ВЛИЯНИЕ БИХРОМАТА КАЛИЯ НА ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ РАСТЕНИЙ ГОРОХА

Изучено влияние бихромата калия на морфометрические показатели и концентрацию пигментов в листьях растений гороха сорта Альфа. Наличие соли хрома в среде вызывало значительное снижение длины и биомассы побега и корня гороха, увеличения концентрации хлорофиллов, каротиноидов и антоцианов.

Ключевые слова: горох, хром, пигменты

U. Stambulska, researcher

Precarpathian National University named after Vasyl Stefanyk, Ivano-Frankivsk, Ukraine

EFFECT OF POTASSIUM DICHROMATE ON SOME PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL PARAMETERS OF PEA PLANTS

The effect of potassium dichromate was studied on morphometric and biochemical parameters of pea plants cultivar Alpha. Plants growing in the presence of chromium salt resulted in significant reduction length and biomass of shoots and roots. The concentrations of chlorophyll, carotenoids and anthocyanins were increased in plants exposed to potassium dichromate.

Keywords: pea, chromium, pigments.

УДК 597.6(477)

Р. Світін, асп., В. Горобчишин, канд. біол. наук

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

ПОСТЦИКЛИЧНИЙ ПАРАЗИТИЗМ НЕМАТОД РОДУ *OSWALDOCRUZIA* TRAVASSOS, 1917 У ДЕЯКИХ ВИДІВ РЕПТИЛІЙ НА ТЕРИТОРІЇ УКРАЇНИ

Визначено видовий склад нематод роду *Oswaldocruzia* у вужа звичайного, гадюки звичайної та мідянки звичайної з території України.

Ключові слова: Нематоди, *Oswaldocruzia*, *O. filiformis*, змії, пост циклічний паразитизм.

Вступ. Нематоди роду *Oswaldocruzia* є невеликою групою всесвітньо розповсюджених нематод – паразитів травного тракту амфібіїв та рептилій. На даний час відомо понад 80 видів освальдокрузій [1], 15 з яких описано з території Палеарктики [2]. Всього, на території України зареєстровано 6 видів, що паразитують у амфібіях: *Oswaldocruzia filiformis* Goeze, 1782, *Oswaldocruzia fulleborni* Ivanitsky, 1940, *Oswaldocruzia problematica* Ivanitsky, 1940, *Oswaldocruzia ukrainae* Ivanitsky, 1940, *Oswaldocruzia ivanizkii* (Ivanitsky, 1940) Sudarikov, 1951 та *Oswaldocruzia duboisi* Ben Slimane, Durette-Desset et Chabaud, 1993. Однак, оскільки *O. fulleborni*, *O. problematica* та *O. ivanizkii* відомі лише за першоописаннями, а самі описання є недостатньо точними, К. Рижиков [3] зі співавторами у зведеній монографії присвяченій паразитам амфібіїв фауни СРСР синонімізували ці види з *O. filiformis*. У рептилій України відмічений лише один вид – *O. filiformis* [4].

Постциклічний паразитизм – явище, при якому статевозрілий паразит проживає у організмі хижака, що проковтнув його остаточно хазяїна [5]. Постциклічний паразитизм для нематод роду *Oswaldocruzia* спеціально не вивчався, однак відмічався кілька разів при дослідженнях гельмінтофауни вужа звичайного [6], гадюки звичайної [7] та миня річкового [8]. Автори відмічають, що наявність освальдокрузій у кишечнику гадюки корелює з переважанням у її раціоні амфібіїв, які у північних частинах ареалу складають більше 50% раціону. Натомість у гадюк з більш південних областей, де основу їх раціону складають теплокровні, а амфібії не більше 10%, освальдокрузії не були виявлені [7]. Наявність освальдокрузій у миня річкового автори також пов'язу-

ють із харчуванням амфібіями, що зимують на дні водойм в період найбільшої активності цієї риби [8].

Матеріали та методи. Для даної роботи був використаний гельмінтологічний матеріал з колекції відділу паразитології Інституту зоології імені І.І. Шмальгаузена НАН України. Нематоди колекції були фіксовані рідиною Барбагало (4% формалін у фізрозчині), а після вивчення переміщені у 70% етиловий спирт для подальшого зберігання. Нематод вивчали під світловим мікроскопом на тимчасових препаратах. Для цього після рідини Барбагало черв'як промивали у дистильованій воді а потім просвітлювали у розчині лактофенолу (фенол, гліцерин, молочна кислота та дистильована вода у рівних співвідношеннях). Для вивчення будови синлофу робили попередні зрізи за методикою Марі Клод Дюре-Дессе (1985) [9].

Для кожного виду хазяїна пораховані стандартні статистичні показники зараженості за загальноприйнятими методиками; для кожного виду паразитів підраховано середню, мінімальну та максимальну інтенсивність інвазії (кількість особин паразита в одній особині хазяїна для заражених екземплярів хазяїв), екстенсивність інвазії (частка заражених особин хазяїв у дослідженій вибірці), та індекс рясності (середня кількість паразитів в одній особині хазяїна у дослідженій вибірці з урахуванням також і незаражених екземплярів).

Рисунки виконані за допомогою рисувального апарату PA 7. Фотографії виконані за допомогою Zeiss Axio Imager M1 system у центрі колективного користування "Animalia" та на мікроскопі AmScope T690B обладнаним цифровою камерою AmScope MU500. Рисунки та фотографії наведені після доопрацювання у програмах CorelDraw X3 та Adobe Photoshop CS3. Шкала на всіх рисунках дорівнює 100 мкм.

Результати та їх обговорення. В результаті досліджень матеріалу від змій було виявлено три види освальдокрузій, типових паразитів амфібій, а також форму, позначену нами як *Oswaldocruzia* sp.1. Загалом, інфікованими виявилися 14 із 183 особин вужа звичайного (*Natrix natrix*) (таблиця 1). У 13 з них визначено типового паразита сірої ропухи (*Bufo bufo*) – *O. filiformis* (EI – 7.1, II – 5.4 (1-35), IP – 0.38). Цей вид характеризується наявністю вузьких латеральних крил, що складаються з трьох гребенів: незначно збільшених дорсального і вентрального та маленького центрального між ними

(рис.1,A). У одного з заражених вужів було виявлено два екземпляри нематод, визначених нами як *Oswaldocruzia* sp.1 (EI – 0.5, II – 2, IP – 0.01), оскільки їх морфологічні ознаки не відповідають жодному з описаних видів освальдокрузій. Даний вид має латеральні крила утворені трьома гребнями, з яких дорсальний найменший, а центральний і вентральний значно збільшені (рис. 1,B). Схожі екземпляри були раніше виявлені нами у матеріалі від звичайної квакші (*Hyla arborea*) і, найімовірніше, є новим видом.

Таблиця 1. Показники зараженості гельмінтами вужа звичайного – *Natrix natrix*

Види паразитів	Екстенсивність інвазії, %	Інтенсивність інвазії, екз. (середня (мінімальна–максимальна))	Індекс рясності
<i>O. filiformis</i>	7,1	5,4 (1-35)	0,38
<i>Oswaldocruzia</i> sp.1	0,5	2	0,01

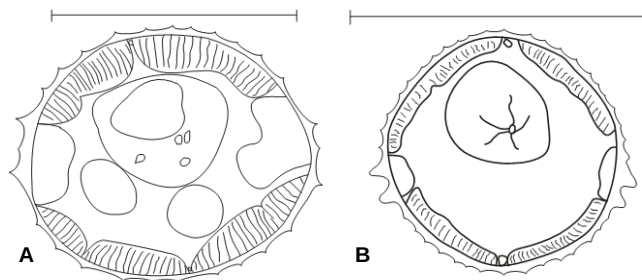


Рис. 1. А – *O. filiformis*, В – *Oswaldocruzia* sp.2

Зі 129 особин гадюки звичайної (*Vipera berus*) (таблиця 2) зараженими освальдокрузіями виявилися 9. У матеріалі від 8 гадюк також був виявлений *O. filiformis* (EI – 4.7, II – 2.2 (1-7), IP – 0.1). Одна особина гадюки виявилася зараженою одним екземпляром *O. duboisi* (EI – 0.8, II – 1, IP – 0.008), що є поширеним паразитом зелених жаб (рід *Pelophylax*) та тритонів (надродина

Pleurodelinae). У цього виду латеральні крила також утворені трьома гребнями, з яких дорсальний дуже зменшений і часто не помітний на поперечних зрізах, вентральний також маленький, але завжди добре виражений, натомість центральний дуже збільшений і надає крилам трикутної форми (рис. 2,C).

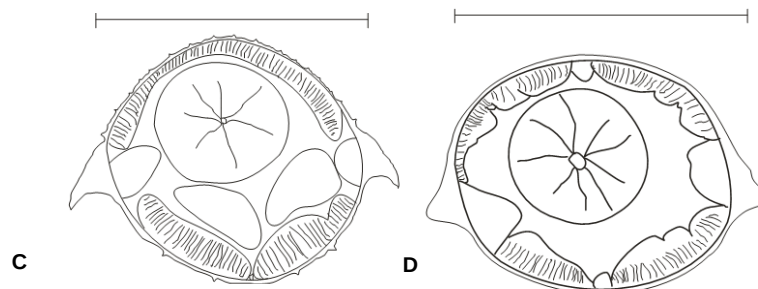


Рис. 2. С – *O. duboisi*, D – *O. bialata*

Таблиця 2. Показники зараженості гельмінтами гадюки звичайної – *Vipera berus*

Види паразитів	Екстенсивність інвазії, %	Інтенсивність інвазії, екз. (середня (мінімальна–максимальна))	Індекс рясності
<i>O. filiformis</i>	4,7	2,2 (1-7)	0,1
<i>O. duboisi</i>	0,8	1	0,008

Лише дві з досліджених мідянок (*Coronella austriaca*) (таблиця 3) виявилися зараженими *O. bialata* (II – 3.5 (1-6), EI – 4.7, IP – 0.2), типовим паразитом бурих (*Rana arvalis* та *R. temporaria*) та зелених жаб.

O. bialata має дуже широкі латеральні крила, які не мають виражених гребенів та набувають заокруглено-трикутної форми (рис.2,D).

Таблиця 3. Показники зараженості гельмінтами мідянки звичайної – *Coronella austriaca*

Види паразитів	Екстенсивність інвазії, %	Інтенсивність інвазії, екз. (середня (мінімальна–максимальна))	Індекс рясності
<i>O. bialata</i>	4,7	3,5 (1-6)	0,2

У колекційному матеріалі від вужа водяного (*Natrix tessellata*) та гадюки степової (*Vipera renardii*) нематод роду *Oswaldocruzia* не виявлено.

Обговорення результатів. Враховуючи низьку інтенсивність та екстенсивність інвазії, та те, що амфібії досить часто входять до раціону досліджуваних видів, ми вважаємо зараження змій, типовими для амфібій видами освальдокрузій, прикладом постциклічного паразитизму. Непрямим підтвердженням саме постциклічного, а не випадкового паразитизму є також відсутність у зміях паразитів, характерних для інших рептилій, що мешкають у тих саме біотопах.

У нашому матеріалі, серед усіх змій, найбільш зараженими освальдокрузіями виявилися вужі, для яких земноводні є основним джерелом їжі, натомість найменш зараженими виявилися мідянки, у раціоні яких амфібії складають не більше 4% (Щербак Н., Щербань М., 1980). Так само відсутність нематод у кишечнику степової гадюки можна пояснити відсутністю амфібій у раціоні цього виду, основу якого складають теплокровні. Відсутність освальдокрузій у кишечнику водяного вужа, найімовірніше, пояснюється переважанням у його спектрі живлення зелених жаб, які набагато менш уражені освальдокрузіями порівняно з бурими жабами та ропухами, що входять до раціону звичайного вужа та гадюки.

Майже всі виявлені нематоди були статевозрілими самками та, найпевніше, продукували яйця, що дає видам змогу продовжувати розмножуватися навіть після смерті основного хазяїна і є істотною перевагою у боротьбі за існування.

Висновки.

Нематоди роду *Oswaldocruzia* є типовими мешканцями кишечника амфібій та комахоїдних рептилій (ящірка прудка, ящірка живородна, веретільниця ламка) на території України. Натомість рептилії, що живляться перева-

жно хребетними тваринами, як правило, не мають видоспецифічних освальдокрузій і заражаються ними випадково. Для подальшого вивчення паразито-хазяїнних відносин у рептилій та нематод роду *Oswaldocruzia* будуть проведені експерименти з перехресного зараження, залучені гістологічні та молекулярні методи.

Список використаних джерел

1. Bursey C. New species of *Oswaldocruzia* (Nematoda: Molineidae) and other helminths of *Bolitoglossa subpalmata* (Caudata: Plethodontidae) from Costa Rica / C. Bursey, S. Goldberg // *Journal of Parasitology*. – 2011. – Vol. 97, N 2. – P.286-292. Available from: <http://search.proquest.com/openview>
2. Ben Slimane B. Two new species of the genus *Oswaldocruzia* travassos, 1917 (nematode: Trichostrongylina: Molineidae) parasitizing Spanish amphibians / B. Ben Slimane, J. Lluch, M.Cl. Durette-Desset // *Research and Review in Parasitology*. – 1995. – Vol. 55, N 4. – P.209-215. Available from: search.proquest.com/openview
3. Рыжиков К. М. Гельминты амфибий фауны СССР / К. М. Рыжиков, В. П. Шарпило, Н. Н. Шевченко. – Москва: Наука, 1980. – 280 с.
4. Шарпило В. П. Паразитические черви пресмыкающихся фауны СССР: систематика, хронология, биология. – Киев: Наукова думка, 1976. – 300 с.
5. Божков Д. Постциклічний паразитизм і постциклічний хазяїнства у гельмінтів / Д. Божков // *Известия Зоологического института БАН*. – 1969. – N 29. – P.183-188.
6. Bertman M. Blindworm – *Anguis fragilis* L. and the grass snake – *Natrix natrix* (L.) new hosts of *Oswaldocruzia filiformis* (Goeze, 1782) Travassos 1917 (Nematoda) in Poland / M. Bertman, A. Okulewicz // *Wiadomości Parazytologiczne*. – 1987. – N 33. – P.209-212. Available from: <http://www.bioone.org>
7. Новохацька О. В. К вопросу встречаемости нематоды *Oswaldocruzia filiformis* (Strongylida: Molineidae) в Карелии / О. В. Новохацька. – *Паразитология*. – 2008. – N 42. – С.204-209.
8. Новохацька О. В. Паразитофауна рыб эвтрофируемых озёр (на примере Сямозера): автореф. дис. к-та биол. наук: 03.00.19 / О. В. Новохацька; Институт биологии Карельского научного центра Российской Академии Наук. – Санкт-Петербург, 2008. – 30 с.
9. Durette-Desset M. Cl. Trichostrongyloid nematodes and their vertebrate hosts: reconstruction of the phylogeny of parasitic group / M. Cl. Durette-Desset // *Advances in Parasitology*. – 1985. – N 24. – P.239-306. Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc

Надійшла до редколегії 30.06.15

R. Svitin, asp., V. Gorobchishyn, kand. biol. nauk
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

ПОСТЦИКЛИЧЕСКИЙ ПАРАЗИТИЗМ НЕМАТОД РОДА *OSWALDOCRUZIA* TRAVASSOS, 1917 У НЕКОТОРЫХ ВИДОВ РЕПТИЛИЙ НА ТЕРРИТОРИИ УКРАИНЫ.

Определен видовой состав нематод рода *Oswaldocruzia* у ужа обыкновенного, гадюки обыкновенной и медянки обыкновенной с территории Украины.

Ключевые слова: Нематоды, *Oswaldocruzia*, *O. filiformis*, змеи, постциклічний паразитизм.

R. Svitin, PhD student, V. Gorobchishyn, PhD
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

POSTCYCLE PARASITISM OF NEMATODES OF THE GENUS *OSWALDOCRUZIA* TRAVASSOS, 1917 PARASITIZING SEVERAL SPECIES OF SNAKES FROM THE TERRITORY OF UKRAINE.

The list of species of nematodes of the genus *Oswaldocruzia* parasitizing grass-snake, common viper and smooth-snake from the territory of Ukraine was identified.

Key words: Nematodes, *Oswaldocruzia*, *O. filiformis*, snakes, postcycle parasitism.

УДК 616-006.48-039.36-037-053.2: 575.24

Н. Свергун, канд. біол. наук, Н. Храновська, канд. біол. наук,
О. Скачкова, канд. біол. наук, Г. Климяк, канд. мед. наук.
Національний інститут раку, Київ,
М. Іноністова, асп.

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

ЗМІНИ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНА *GSTP1* В ПУХЛИНІ ПРИ ПРОГНОЗУВАННІ ПЕРЕБІГУ НЕЙРОБЛАСТОМИ

Досліджено рівень експресії гена *GSTP1* (глутатіон-S-трансфераза P1) у пухлинній тканині хворих на нейробластому (НБ). Встановлено, що показник 2-річної безрецидивної виживаності у групі хворих на НБ з низьким рівнем експресії гена *GSTP1* становить 61 %, тоді як у групі хворих з високим рівнем експресії лише 34 %.

Ключові слова: нейробластома, рівень експресії гена *GSTP1*, прогноз перебігу захворювання.

Вступ. Нейробластома (НБ) – це злоякісна пухлина симпатичної нервової системи, яку вперше описав в

1865 р. Вірхов і назвав її "гліомою". У 1910 р. і Wright довів, що вона розвивається з ембріональних нейроб-

© Свергун Н., Храновська Н., Скачкова О., Климяк Г., Іноністова М., 2015

ластів симпатичної нервової системи і дав їй назву – НБ [1]. НБ складає 7-11 % загальної кількості злоякісних новоутворень у дітей, займаючи четверте місце у структурі онкологічної захворюваності дітей після гострих лейкозів, пухлин центральної нервової системи та злоякісних лімфом. Середній вік хворих на момент постановки діагнозу становить 17 місяців. Третина випадків діагностується у дітей до 1 року, майже 90 % НБ виявляється до 5-річного віку і лише 2 % пухлин виявляється у віці після 10 років. У 7 з 10 випадків НБ на момент встановлення діагнозу у пацієнтів виявляють метастази [2].

Сьогодні причини виникнення НБ ще досі невідомі. Дуже ранній вік виникнення НБ у більшості пацієнтів нашоєму на думку, що рушійні події індукції пухлини відбуваються в пренатальний період чи на дуже ранніх етапах життя. Отже, НБ може розглядатися як прояв злоякісного аберантного розвитку симпатичної нервової системи [3].

Характерною ознакою НБ є її клінічна гетерогенність від локалізованих пухлин до поширених форм та здатність до раннього гематогенного метастазування. Така значна клінічна гетерогенність відображає складність геномних аномалій, якими характеризуються пухлинні клітини НБ. Агресивним формам НБ притаманні множинні сегментні аберації хромосом та ампліфікація окремих генів, зокрема, онкогена *MYCN* (Neuroblastoma-Derived V-Myс Avian Myelocytomatosis Viral Related Oncogene). Ампліфікація гена *MYCN* чітко асоціюється зі швидкою прогресією пухлини та несприятливим прогнозом перебігу захворювання у пацієнтів будь-якого віку та стадії захворювання, спостерігається у 25 % первинних пухлин. Хоча статус гена *MYCN* є центральним стратифікаційним біологічним маркером для визначення групи ризику, важливо наголосити, що в більшості метастатичних НБ ампліфікація гена *MYCN* не виявляється [4].

Останнім часом все більше досліджень в онкології ведеться у напрямку вивчення спадкового індивідуального потенціалу організму метаболізувати токсичні речовини та їх похідні. Тому, для визначення біологічної та клінічної поведінки НБ може бути інформативним дослідження певних ферментних систем організму.

Глутатіон-S-трансфераза P1 (*GSTP1*) – фермент II фази біотрансформації ксенобіотиків, що бере участь у процесах детоксикації широкого спектру електрофільних сполук, включаючи мутагени і канцерогени навколишнього середовища, а також задіяний у регулюванні клітинної проліферації та апоптозу. Деякі цитостатики, такі як антрацикліни, препарати платини, алкілюючі агенти, стероїдні гормони також є субстратами *GSTP1* [5]. Зміна активності фермента *GSTP1* в клітинах НБ може призвести до порушення функціонування II-ої фази детоксикації і таким чином сприяти формуванню резистентності пухлини до хіміотерапії [6]. Прицільне блокування активності гена *GSTP1* в клітинах НБ може стати перспективною стратегією лікування НБ високого ризику.

Метою цього дослідження було визначити рівень експресії гена *GSTP1* у пухлинній тканині хворих на НБ

та проаналізувати взаємозв'язок рівня експресії зазначеного гена з клінічними характеристиками НБ та перебігом захворювання.

Матеріали та методи. В дослідженні брали участь 91 пацієнт (середній вік: $39,45 \pm 4,81$ міс, первинні пухлини – 90,1 % (82/91), рецидивні пухлини – 5,5 % (5/91), метастатичні вогнища – 4,4 % (4/91)) з верифікованим діагнозом НБ. В якості біологічного матеріалу для аналізу використовували біоптати пухлинної тканини, отримані методом пункційної біопсії чи резекції пухлини на етапі діагностики захворювання до початку хіміотерапії. Усі пацієнти отримували лікування з урахуванням групи ризику відповідно до міжнародних стандартів лікування НБ. Відповідь на терапію оцінювали згідно International Neuroblastoma Response Criteria (INRC) [7].

РНК з пухлинної тканини виділяли методом адсорбції нуклеїнових кислот на "silica" мембрані за допомогою набору "Total Nucleic Acid Isolation" ("Ambion", США), згідно рекомендацій виробника. Для позбавлення від геномної ДНК, що може бути джерелом хибних результатів, проводили обробку виділеної РНК ферментом ДНКазою. Для цього використовували реактиви: фермент "DNase" ("Ambion", США), буфер для фермента "DNase-buffer" ("Ambion", США) та інгібітор РНКаз "RNase-inhibitor" ("Applied Biosystems", США). Отриманий зразок РНК одразу використовували для постановки реакції зворотної транскрипції. Для проведення реакції зворотної транскрипції використовували ПЛР-тест-набір "Реверта-Л-100" ("Amplisens", Росія), згідно рекомендацій виробника.

Рівень експресії гена *GSTP1* визначали методом зворотно-транскрипційної полімеразної ланцюгової реакції (ЗТ-ПЛР) з детекцією результатів в режимі реального часу та оцінювали за допомогою методу $\Delta\Delta C_t$ з нормуванням щодо рівня експресії контрольного гена – гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази (*GAPDH*). Послідовності праймерів та TaqMan зондів (представлені в табл. 1) були підібрані з використанням програми "Primer Express® Software v3.0" ("Applied Biosystems", США) та синтезовані фірмою "Applied Biosystems", (США). Концентрації та співвідношення компонентів реакції і умови проведення ПЛР були підібрані експериментально. Праймери використовували в концентрації 0,3 мкМ, та зонди в концентрації 0,2 мкМ. Реакційна суміш містила: 1 мкл прямого праймера (*GSTP1/GAPDH*), 1 мкл зворотного праймеру (*GSTP1/GAPDH*), 1 мкл TaqMan зонду (*GSTP1/GAPDH*), 4,5 мкл ПЛР-води, 12,5 мкл TaqMan Universal PCR Master Mix ("Applied Biosystems", США). До суміші додавали 5 мкл розчину кДНК. Використовували наступний температурний режим: початок ампліфікації при 95 °C – 5 хв, накопичення ампліфікаційного продукту протягом 50 циклів 94 °C – 15 с, 60 °C – 1 хв. Аналіз результатів здійснювали з використанням програмного забезпечення SDS на приладі 7500 Real Time PCR System ("Applied Biosystems", США) згідно рекомендацій виробника приладу.

Таблиця 1. Послідовності праймерів та TaqMan зондів

Ген	Послідовності олігонуклеотидів
<i>GAPDH</i>	Прямий праймер : TCACCCACACTGTGCCCATCTACGA Зворотний праймер: CAGCGGAACCGCTCATTCGCAATGA TaqMan зонд : 6-VIC-ATGCCCTCCCCATGCCATCCTGCGT-TAMRA
<i>GSTP1</i>	Прямий праймер: CTCACCTCAAAGCCTCCTGCCTAT Зворотний праймер: CAGGATGGTATTGGACTGGTACAG TaqMan зонд : 6-FAM-TCCCCAAGTTCAGGACGGAGACCT-TAMRA

Отримані дані були опрацьовані у програмному пакеті "Statistica 6.1" з використанням непараметричних

методів статистичного аналізу та "MedCalc 12.1.4.0" для проведення ROC-аналізу. Аналіз асоціації між рівнем

експресії гена *GSTP1* та клінічними характеристиками пацієнтів проводили за допомогою непараметричних критеріїв – Манна-Уїтні та Краскела-Уолліса (при одночасному аналізі трьох і більше груп). Для оцінки прогностичної значимості рівня експресії гена *GSTP1* на перебіг НБ було проведено аналіз ROC-кривих (Receiver Operating Characteristic curves). За допомогою ROC аналізу також було визначено оптимальний критерій (порогове значення) рівня експресії гена *GSTP1* для розподілу пацієнтів відносно рівня експресії гена з високим та низьким рівнем експресії даного маркера [8,9]. Відмінності вважали статистично достовірними при $p \leq 0,05$.

Результати та обговорення. У результаті проведеного дослідження було встановлено, що значення рівня експресії гена *GSTP1* в пухлинних клітинах хворих на НБ варіювали у досить широких межах, зокрема в залежності від стадії захворювання, віку та відповіді на хіміотерапію. Встановлено, що рівень експресії гена *GSTP1* у клітинах пухлинної тканини рецидивних пухлин був в 6 раз вищим та в 9 раз вищим у зразках ме-

тастатичних вогнищ НБ порівняно з первинними пухлинами ($p \leq 0,01$, відповідно) (рис. 1 А). Це може свідчити про участь *GSTP1* у прогресуванні захворювання.

Відомо, що вік пацієнтів на момент виявлення захворювання є незалежним прогностичним маркером прогнозування перебігу НБ, що використовується різними стратифікаційними системами. Пацієнти віком старше 1 року відносяться до групи високого ризику [10]. У цьому дослідженні спостерігалось підвищення експресії гена *GSTP1* на рівні тенденції залежно від віку пацієнтів у зразках первинних пухлин (рис. 1 В).

Також було встановлено, що у пацієнтів з більш розповсюдженими пізніми стадіями захворювання (III та IV) рівень експресії гена *GSTP1* був вищим ніж у пацієнтів з ранніми стадіями НБ ($p \leq 0,05$ для IV стадії) (рис. 1 С). Однак, при дослідженні експресії гена *GSTP1* у пухлинах з різним статусом онкогена *MYCN*, не було виявлено достовірної різниці у пацієнтів з та без ампліфікації *MYCN* ($p = 0,39$) (рис. 1 D).

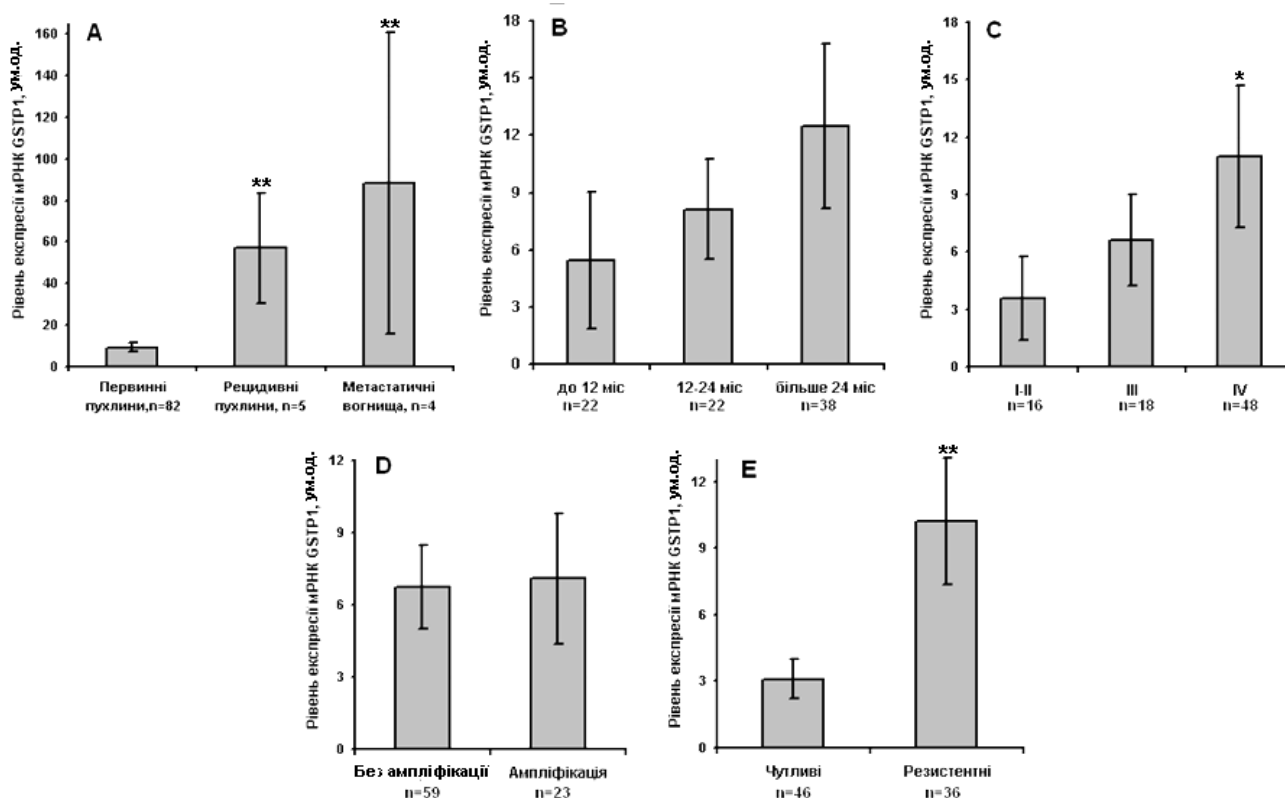


Рис. 1. Показники експресії гена *GSTP1* у зразках пухлинної тканини пацієнтів з НБ ($M \pm m$)

Примітки: А – показники експресії гена *GSTP1* у клітинах первинних, рецидивних пухлин чи метастатичних вогнищ, ** $p \leq 0,01$ – порівняно з показниками первинних пухлин; В – рівні експресії гена *GSTP1* у клітинах первинних пухлин пацієнтів з НБ залежно від віку на момент виявлення захворювання; С – показники експресії гена *GSTP1* у клітинах первинних пухлин пацієнтів з різними стадіями НБ, * $p \leq 0,05$ порівняно з показниками I-II стадій; D – рівні експресії гена *GSTP1* у клітинах первинних пухлин з та без ампліфікації онкогена *MYCN*; Е – показники експресії гена *GSTP1* у клітинах первинних пухлин пацієнтів залежно від чутливості до хіміотерапії, ** $p \leq 0,01$ – порівняно з показниками пухлин чутливих до хіміотерапії.

При дослідженні асоціації зміни експресії гена *GSTP1* у пухлинах з різною чутливістю до хіміотерапії згідно системи INRC спостерігалось достовірне підвищення рівня експресії зазначеного гена у первинно-резистентних до хіміотерапії пухлинах у порівнянні з чутливими ($p \leq 0,01$), незалежно від віку та стадії НБ.

Для оцінки прогностичної значимості змін експресії гена *GSTP1* на перебіг НБ було проведено ROC-аналіз [8,9]. Встановлено, що рівень експресії гена *GSTP1* може бути маркером несприятливого перебігу НБ ($AUC = 0,64 \pm 0,0691$, $95\%CI = 0,511-0,755$, чутливість

методу – 68,6 %; специфічність – 60,0 %; $p = 0,04$). Відповідно до результатів ROC аналізу було визначено оптимальний критерій для розподілу пацієнтів відносно рівня експресії гена *GSTP1*, що становив $> 0,772$ ум.од., і визначено, що його можна використовувати в якості незалежного маркера прогнозування перебігу НБ та стратифікації хворих за групами ризику.

Для підтвердження отриманих результатів проведено аналіз безрецидивної виживаності хворих на НБ залежно від рівня експресії гена *GSTP1*. З цієї метою всі пацієнти з НБ були розподілені на 2 групи: з висо-

ким ($> 0,772$ ум.од.) та низьким ($< 0,772$ ум.од.) рівнями експресії гена *GSTP1*. Високий рівень експресії гена *GSTP1* визначено у 51,2 % (42/82) зразках пухлинної тканини. Ми виявили, що підвищення експресії

гена *GSTP1* асоційоване з достовірним зниженням показника безрецидивної виживаності хворих на НБ незалежно від статусу гена *MYCN*, віку та стадії захворювання (рис. 2).

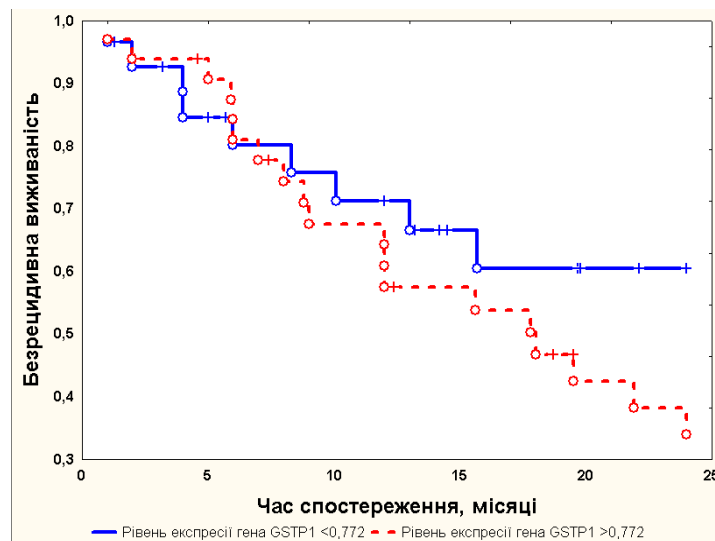


Рис. 2. Каплан-Мейер криві 2-х річної безрецидивної виживаності відповідно до рівня експресії гена *GSTP1* у первинних пухлинах НБ (F критерій = 2,07, $p = 0,03$)

Так, показник 2-річної безрецидивної виживаності у групі хворих на НБ з низьким рівнем експресії гена *GSTP1* становив 61 %, тоді як у групі хворих з високим рівнем експресії – лише 34 % ($p = 0,03$). Отже, результати наших досліджень показали, що зміна рівня експресії гена *GSTP1* є важливим фактором прогнозування перебігу НБ, незалежно від стадії захворювання, віку та статусу гена *MYCN*.

Одержані результати свідчать про перспективність подальших досліджень змін експресії гена *GSTP1* в якості прогностичного маркера перебігу НБ та його ролі при прогресуванні захворювання. У разі підтвердження отриманих результатів на більшій вибірці пацієнтів, цей маркер може бути рекомендований для включення в молекулярно-генетичний компонент системи стратифікації хворих на НБ за групами ризику, що в подальшому дозволить індивідуалізувати лікування хворих на НБ та суттєво покращити його ефективність.

Висновки. Виявлено, що високий рівень експресії гена *GSTP1* є фактором несприятливого перебігу захворювання у пацієнтів з НБ, незалежно від стадії захворювання, віку та статусу гена *MYCN*. Встановлено, що високий рівень експресії гена *GSTP1* достовірно частіше зустрічається у первинно-резистентних до хіміотерапії пухлинах порівняно з чутливими. Визначено, що показник 2-річної безрецидивної виживаності у групі хворих на НБ з низьким рівнем експресії гена *GSTP1* є на 27 % вищим порівняно з показником у групі хворих з високим рівнем.

Список використаних джерел

- Дурнов Л. А. Педиатрическая онкология (Учебное пособие для студентов медицинских институтов) / Л. А. Дурнов, Б. Ахмедов, А. Ф. Бухны. – Душанбе: Маориф, 1986. – 191 с.

- Capasso M. Genetics and genomics of neuroblastoma / M. Capasso, S. Diskin // Cancer Genetics, Cancer Treatment and Research. ed. Pasche B. – Springer Science LLC. – 2010. – P. 65-84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

- Грабовой А.Н. Верифікація та прогнозування перебігу нейробластом (огляд літератури) / А.Н. Грабовой, Н.Н. Храновская, М.Б. Зарецкий, Г.И. Клинюк // Клінічна онкологія. – 2012. – №7 (3). – С. 1-7. Available from: www.clinicaloncology.com.ua

- McKeown M.R. Therapeutic Strategies to Inhibit MYC / M.R. McKeown, J.E. Bradner // Cold Spring Harb Perspect Medicine – 2014. – № 4. – P. 1-16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

- Hayes J.D. Glutathione transferases / J.D. Hayes, J.U. Flanagan, I.R. Jowsey // Annual Reviews Pharmacology and Toxicology – 2005. – №45. – P. 51-88. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

- Fletcher J.I., N-Myc regulates expression of the detoxifying enzyme glutathione transferase GSTP1, a marker of poor outcome in neuroblastoma / J.I. Fletcher, S. Gherardi, J. Murray [et al.] // Cancer Research. – 2012. – Vol. 15. № 72(4). – P. 845-853. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

- Castel V. Prospective evaluation of the International Neuroblastoma Staging System (INSS) and the International Neuroblastoma Response Criteria (INRC) in a multicentre setting / V. Castel, P. Garcha-Miguel, A. Cacete [et al.] // European Journal Cancer. – 1999. № 35(4). – P. 606-11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

- Файнзильберг Л.С. Гарантированная оценка эффективности диагностических тестов на основе усиленного ROC-анализа // Л.С. Файнзильберг, Т.Н. Жук // Научный журнал. Управляющие системы и машины. – 2009. – № 5. – С. 3-13. Available from: nbuv.gov.ua

- Ferri C. Volume under the ROC surface for multiclass problems. exact computation and evaluation of approximations / C. Ferri, J. Hernandez-Orallo, M.A. Salido // Technic Replay. – 2003. – Vol.22. – P. 36-43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

- Evans A. E. Age at Diagnosis and Prognosis in Children With Neuroblastoma / A. E. Evans, G. J. D'Angio // Journal Clinical of Oncology. – 2005. Vol. 23. № 27. – P. 6443-6444. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Надійшла до редколегії 10.06.15

Н. Свергун, канд. биол. наук, Н. Храновская, канд. биол. наук, О. Скачкова, канд. биол. наук, Г. Клинюк, канд. мед. наук
Национальный институт рака, Киев, Украина,
М. Иномирова, асп.
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

ИЗМЕНЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА *GSTP1* В ОПУХОЛИ ПРИ ПРОГНОЗИРОВАНИИ ТЕЧЕНИЯ НЕЙРОБЛАСТОМЫ

Исследован уровень экспрессии гена *GSTP1* в опухолевой ткани больных на нейробластоме (НБ). Установлено, что показатель 2-летней безрецидивной выживаемости в группе больных НБ с низким уровнем экспрессии гена *GSTP1* составляет 61 %, тогда как в группе больных с высоким уровнем экспрессии только 34 %.

Ключевые слова: нейробластома, уровень экспрессии гена *GSTP1*, прогноз течения заболевания.

N. Svergun, PhD., N. Khranovskaya, PhD., O. Skachkova, PhD., G. Klimnyuk, M.D.
National Cancer Institute, Kiev, Ukraine,
M. Inomistova, PhD student
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

ALTERATIONS OF GSTP1 GENE EXPRESSION IN TUMOR FOR NEUROBLASTOMA PROGNOSIS

We analyzed the level of GSTP1 gene expression in neuroblastoma (NB) patients tumor tissue. It was shown that 2-year event-free survival rate of NB patients with low GSTP1 gene expression was 61%, whereas in the group of patients with high expression level was only 34%.

Keywords: neuroblastoma, GSTP1 gene expression, disease course prognosis.

УДК 617.723/35-778.317:613.2-099:612.085.1

Н. Молчанюк, канд. биол. наук
Государственное учреждение "Институт глазных болезней и тканевой терапии
имени В.П. Филатова АМН Украины", Одесса

СВЕТО- И ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ХОРИОКАПИЛЛЯРОВ, ПИГМЕНТНОГО ЭПИТЕЛИЯ И ФОТОРЕЦЕПТОРНЫХ КЛЕТОК СЕТЧАТКИ КРЫС В ДИНАМИКЕ ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ДОЗ МЕТАНОЛА

В статье показано светооптическое и электронно-микроскопическое (ЭМИ) изменение в хориокапиллярах (ХК), пигментном эпителии сетчатки (ПЭС) и фоторецепторных клетках (ФК) сетчатки крыс в динамике ответной реакции на внутрибрюшинное введение метанола.

Ключевые слова: хориокапилляры, пигментный эпителий сетчатки, фоторецепторные клетки сетчатки, ультрараспространенная структура.

В настоящее время расширилась сфера использования, такого токсического вещества как метиловый спирт (метанол). Известно, что метанол является очень токсическим одноатомным спиртом, который по запаху и вкусу напоминает этиловый спирт. К токсическим примесям, присутствующим в алкогольных напитках, обычно относят метанол, ацетальдегид и др. Смертельна доза метанола, по разным данным, колеблется от 30 до 250 мл, а 10 мл его приема внутрь приводит к потере зрения. Согласно ГОСТу, объемная доза метанола, в пересчете на безводный этиловый спирт, не должна превышать 0,05 % или 400 мг/л.

Кроме того, метанол стал применяться в качестве растворителя, например, в лакокрасочной промышленности, его используют на бензоколонках, он является компонентом антифризов и др. В результате такого широкого применения участились случаи отравления им населения Украины [1]. По клиническим и экспериментальным данным метанол первично поражает зрительный нерв, сетчатку и ткани головного мозга [2, 3, 4, 5, 6]. Предполагается, что в результате метаноловой интоксикации происходит глубокое нарушение биоэнергетических процессов в этих тканях. Нами изучены единичные работы, посвященные морфологическим изменениям и биохимическим показателям в сетчатке и зрительном нерве человека и животных, вызванных действием метанола [3,5]. В связи с этим возникает важность более глубокого изучения на субклеточном уровне тонких механизмов повреждающего действия метанола на живые ткани, в частности, на сетчатку, опытных животных.

Целью настоящего исследования явилось светооптическое и электронно-микроскопическое изучение (ЭМИ) изменений в хориокапиллярах (ХК), пигментном эпителии сетчатки (ПЭС) и фоторецепторных клетках (ФК) сетчатки крыс в динамике ответной реакции на внутрибрюшинное введение метанола.

Материалы и методы. Работа выполнена на 30 взрослых крысах линии Вистар массой 250 – 300 г, подразделенных на 3 группы: I-я – опытная, в которой крысам внутрибрюшинно, однократно вводили метанол из расчета 0,75 г/кг массы тела; II-я – опытная, в которой крысам внутрибрюшинно, однократно вводили метанол из расчета 2,5 г/кг массы тела. Доза метанола

подбиралась эмпирически по отношению к ЛД₅₀, которая составляет 9,5 г/кг массы тела. III-я группа – контрольные животные, которым вводили физиологический раствор в эквивалентном объеме. Эвтаназия животных осуществлялась в соответствии с положениями "Европейской конвенции о защите позвоночных животных, которые используются для экспериментальных и других научных целей" (Страсбург, 1986). Изучался материал через 1, 3, 7 и 14 суток после введения спирта. Исследовались структуры заднего отдела глаза: ХК сосудистой оболочки, ПЭС и ФК сетчатки. Затем производились светооптическое (на полутонких препаратах) и ЭМИ материала. Для ЭМИ фрагменты тканевой оболочки и сетчатки кролика фиксировали в 2,5 % растворе глутаральдегида на фосфатном буфере при значении pH – 7,4 с последующей дофиксацией 1 % раствором осмиевой кислоты при том же pH буферного раствора. Затем образцы обезжировались в спиртах восходящей крепости. Пропитывание материала и его заключение производилось в смеси эпон-аралдит. Затем ультратонкие срезы контрастировались по методике Reynolds [6]. Материал изучался под электронным микроскопом ПЭМ-100 – 01. Обзорные полутонкие препараты окрашивались 1 % раствором метиленового синего. Просматривались и фотографировались объекты в электронном микроскопе ПЭМ-100-01.

Результаты и их обсуждение. Светооптические исследования, на полутонких препаратах, в отличие от материала контрольной группы, отметили, что во все сроки исследования материала после введения метанола в дозе 0,75 г/кг массы тела, отмечалось оптически плотное содержимое в просвете ХК и просветление цитоплазмы в эндотелиальных клетках. Наибольшее количество таких клеток выявлялось через 7 суток наблюдения.

При ЭМИ через 1 сутки после введения метанола в ХК просвет был заполнен электронно-плотным содержимым, эндотелиальные клетки (ЭК) большей части ХК, имели крупные размеры и большие овальные ядра с выраженной типичной маргинацией хроматина. В цитоплазме определялись обычные для данных клеток органеллы, при этом наблюдалось увеличение количества свободных рибосом и полисом, элементов зернистой эндоплазматической сети (ЗЭС). В некоторых ХК ЭК имели просветленную цитоплазму, содержащую

набухшие митохондрии, т. е. наблюдался некоторый полиморфизм в состоянии ЭК.

Архитектоника слоя ПЭС сохранялась. Обращало на себя особое внимание то, что в клетках ПЭС отмечалось повышенное содержание средних и крупных размеров митохондрий с хорошо выраженными кристами и плотным внутримитохондриальным матриксом,

которые располагались под базальными складками, и, особенно, вдоль боковых поверхностей клеток, что свидетельствовало об усилении энергетического обмена между этими клетками. В этих же областях было сосредоточено большое количество "окаймленных" пузырьков, элементов ЗЭС и мелких лизосом (Рис. 1).

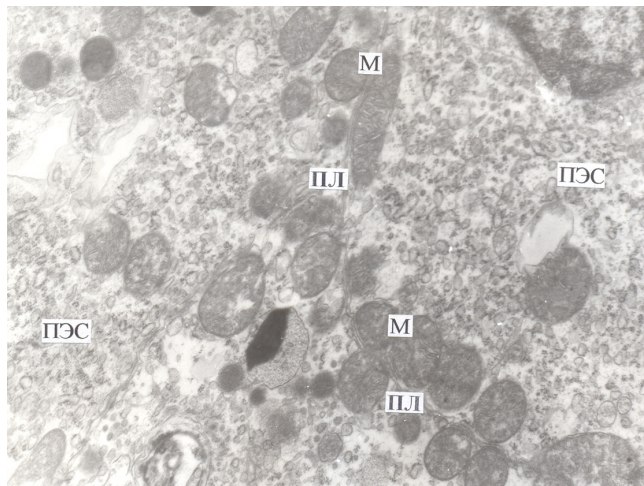


Рис.1. Первые сутки после однократного введения метанола в дозе 0,75 г/кг массы тела. Контакт между двумя смежными клетками ПЭС со скоплением большого числа активных митохондрий вдоль их плазмолемм

Электронная микрофотография. X 6 000. Условные обозначения: ПЭС – пигментный эпителий сетчатки, ПЛ – плазмолемма, М – митохондрии.

В клетках ПЭС определялось также одно или два ядра. Базальная складчатость в одних клетках ПЭС была неглубокой, в других почти отсутствовала. Апикальные микровиллы ПЭС имели нормальную ультраструктуру. В то же время при изучении материала выявлялось небольшое число клеток ПЭС с признаками внутриклеточного отека, что выражалось в просветлении матрикса цитоплазмы, рассредоточенном расположении элементов гладкой эндоплазматической сети (ГЭС), набухании митохондрий и расширении элементов ЗЭС. ФК, контактирующие с клетками ПЭС, находились в нормальном состоянии и не отличались от таковых в материале контрольных животных.

Через 3, и особенно 7 суток после введения метанола, в ХК, наряду с выше описанными изменениями, нарастали признаки отечных изменений ЭК. В ПЭС наблюдались полиморфные изменения: часть клеток имела ультраструктуру близкую к нормальной, другая отличалась признаками отечных изменений, очаговым разрушением элементов ГЭС, деструкцией крист части митохондрий (хотя количество митохондрий в клетках оставалось повышенным), третья – характеризовалась, практически, полной альтерацией цитоплазматических органелл, отсутствием базальной складчатости и очаговым разрушением апикальных микровилл. (Рис. 2.).

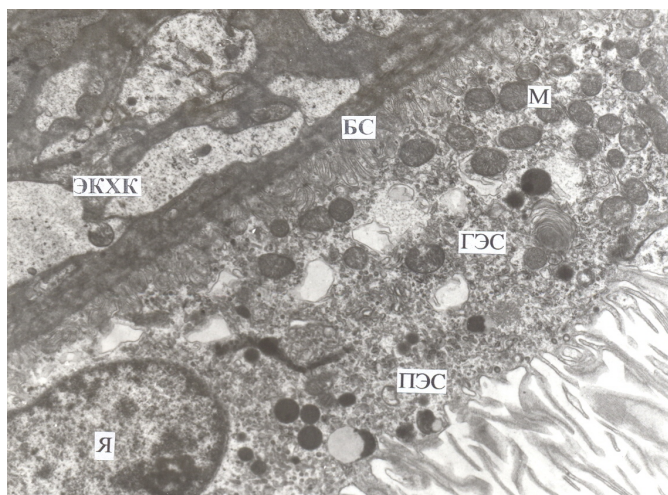


Рис. 2. Третьи сутки после однократного введения метанола в дозе 0,75 г/кг массы тела. Просвет ХК сужен и заполнен электронно-плотным содержимым. Внутриклеточный отек с уменьшением числа органелл эндотелиальных клеток ХК. Выраженная альтерация элементов ГЭС, очаговая сглаженность базальных складок и увеличенное содержание митохондрий в клетке ПЭС

Электронная микрофотография. X 4 000. Условные обозначения: ЭКХК – эндотелиальные клетки хориокапилляров, БС – базальные складки, ПЭС – пигментный эпителий сетчатки, ГЭС – гладкая эндоплазматическая сеть, М – митохондрии.

В слое ФР сетчатки выявляется очаговая деструкция мембран дисков наружных сегментов (НС), деструкция крист части митохондрий внутренних сегментов (ВС) и расширение элементов ЗЭС в цитоплазме ФК.

Через 14 суток в ХК преобладали признаки восстановления внутриклеточной ультраструктуры: в большинстве ЭК было увеличено содержание элементов ЗЭС и рибосом, большинство митохондрий имели хорошо выраженные кристы, некоторые из них отличались набуханием внутримитохондриального матрикса. Однако просвет ХК оставался сравнительно электронно-плотным. В ПЭС отмечалась нормализация структуры элементов ЗЭС и ГЭС, увеличивалось количество свободных рибосом и полисом. В клетках также содержалось много митохондрий в состоянии набухания, а также выявлялись мелкие, плотные "молодые" митохондрии. Апоикальные микровиллы в большей части клеток имели нормальную ультраструктуру. Базальная складчатость оставалась слабо выраженной. Ультраструктура внутриклеточных органелл ФК в этот срок была близка к нормальной.

Светооптические исследования показали, что в отличие от материала контрольной группы, во все сроки исследования материала после введения метанола в дозе 2,5 г/кг массы тела, наблюдается оптически плотное содержимое в просвете некоторых ХК и просветление в них цитоплазмы эндотелиальных клетках с уменьшением количества органелл. В динамике наблюдения количество таких клеток увеличивалось.

При ЭМИ отмечено, что, во все сроки исследования после введения метанола, в слое ХК сосудистой оболочки отмечался полиморфизм изменений среди эндотелиальных клеток (ЭК): наблюдались ЭК с признаками отека цитоплазмы и деструкцией крист митохондрий, ЭК с, практически, нормальной ультраструктурой, а также ЭК с увеличенным количеством органелл, участвующих в белковом синтезе. Последние имели крупные размеры и, практически, полностью перекрывали просвет ХК. Просвет большей части ХК заполнен электронно-плотным содержимым, содержащим эритроциты. В тоже время наблюдались единичные ХК с нормальным, т. е. с умеренно электронно-плотным, просветом. Следует отметить, что в динамике изучения в ХК увеличивается количество ЭК с признаками отека цитоплазмы и альтерации внутриклеточных органелл.

Через 1 сутки после введения метанола в слое ПЭС многие клетки отличались, от контрольного материала, деструкцией значительной части канальцев гладкой эндоплазматической сети (ГЭС) и элементами очаговой альтерации крист у большей части митохондрий. При этом ряд митохондрий были с разрушенной наружной мембраной, а также наблюдались эти органеллы небольших размеров с нормальной структурой. В этих клетках наблюдалось повышенное содержание лизосом, отмечалась сглаженность базальных складок и очаговая фрагментация апоикальных микровилл (Рис. 3).

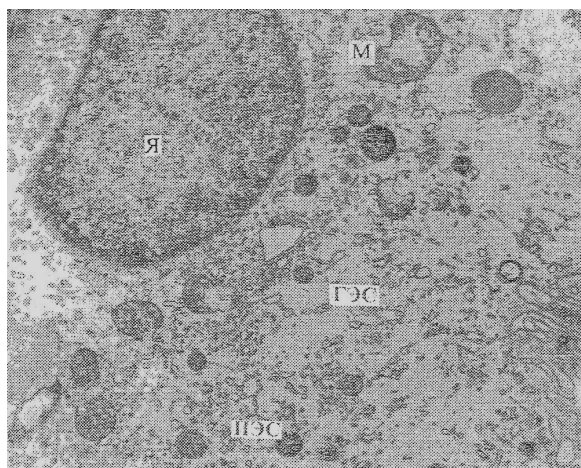


Рис. 3. Первые сутки после однократного введения метанола в дозе 2,5 г/кг массы тела. Значительное уменьшение числа внутриклеточных органелл цитоплазмы клеток пигментного эпителия сетчатки

Электронная микрофотография X 8 000. Условные обозначения: ПЭС – пигментный эпителий сетчатки, ГЭС – гладкая эндоплазматическая сеть, М – митохондрии, Я – ядро.

Под такими клетками наблюдалось скопления обломков наружных сегментов (НС) ФК, часть из которых были с очаговой деструкцией мембран дисков, что свидетельствовало о блокаде процесса фагоцитоза.

На 3 сутки в клетках ПЭС, параллельно с наблюдавшимися патологическими изменениями в них, аналогично описанными в этих клетках предыдущего срока, отмечались признаки компенсаторно-восстановительных процессов, о чем свидетельствовало повышение количества внутриклеточных органелл: митохондрий, часть из которых имели элементы деструкции крист, обильно развитой ГЭС, наличием 2-3 к. Гольджи и большого скопления в цитоплазме фагосом, лизосом и вторичных лизосом. В этих клетках наблюдались хорошо выраженные базальные складки, которые глубоко про-

никали в цитоплазму, а также апоикальные микровиллы, определялись признаки формирования фагосом.

На 7-14 сутки исследования в клетках ПЭС помимо выше описанных изменений, которые были характерны для этих структур в предыдущих сроках, выявлялись клетки с большими полями опустошения цитоплазмы, значительным уменьшением числа органелл и деструкцией оставшихся единичных органелл, очаговым разрушением апоикальных микровилл.

В фоторецепторном отделе сетчатки, во все сроки наблюдения, выявлялись зоны очаговой деструкции мембран дисков НС, деформация части митохондрий с очаговой деструкцией крист во внутренних сегментах (ВС) и значительным расширением элементов зернистой эндоплазматической сети (ЗЭС) с дегрануляцией ее мембран, вплоть до образования крупных полостей, в

цитоплазме ФК, особенно в ранние сроки. В области ядер ФК отмечались признаками отека глиальных мюллеровских клеток (МюК), располагающихся в области

наружной пограничной мембраны. К 14 суткам в слое ФК также выявлялись очаги некроза этих клеток.

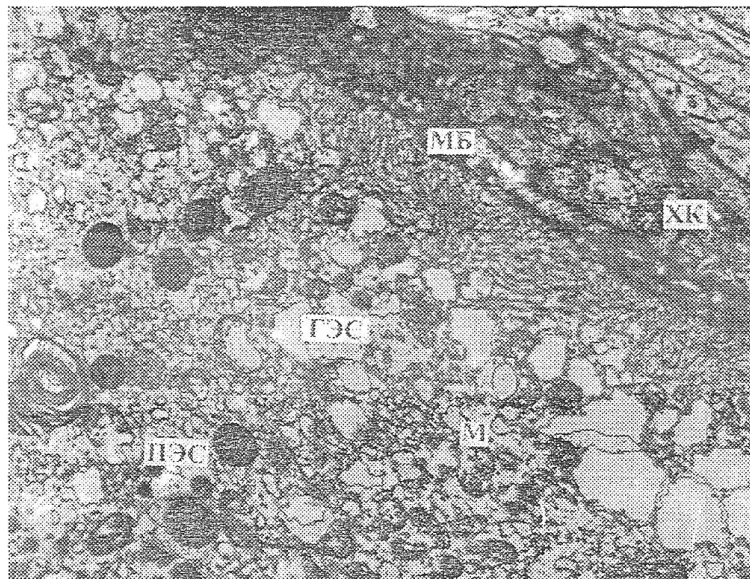


Рис. 3. Четырнадцатые сутки после однократного введения метанола в дозе 2,5 г/кг массы тела. Осмиофилия структур хориокапилляров и мембраны Бруха. Электронно-прозрачные очаги в местах разрушения элементов гладкой эндоплазматической сети в цитоплазме клетки пигментного эпителия сетчатки

Электронная микрофотография X 6 000. Условные обозначения: ХК – хориокапилляр, МБ – мембрана Бруха, ПЭС – пигментный эпителий сетчатки, ГЭС – гладкая эндоплазматическая сеть, М – митохондрии.

Анализ материала показал, что спустя 1 сутки, после введения метанола в дозе 0,75 г/кг массы тела, в ЭК ХК наблюдались лишь легкие реактивные изменения ультраструктуры. В то же время в клетках ПЭС отмечалась, в основном, реакция активации внутриклеточной деятельности, усиление межклеточных обменных процессов и др. Однако базальная складчатость в клетках, по-видимому, прелатствовала прохождению в клетки ПЭС токсического вещества, т.к. становилась не глубокой или не визуализировалась. Следовательно резко ослабевала мощная насосная функция этих клеток. Наиболее глубокие нарушения ультраструктур изучаемых клеток ХК и сетчатки наблюдались в период 3-7 суток после воздействия. Особенно выраженные патологические процессы охватывали клетки ПЭС, вплоть до полного разрушения внутриклеточных структур, исключая ядро и плазмолемму. В ФК наблюдались реактивные изменения. Это связано с токсическим воздействием метанола на изучаемые структуры. В литературе имеются данные о повреждающем действии этого фактора на мембраны клеток [3, 6]. Кроме того, в литературных источниках описаны изменения реологических свойств крови, деструкция белков, повреждение форменных элементов крови под влиянием больших доз метанола [2, 3, 5, 7]. К 14 суткам, когда количество метанола в кровеносном русле, очевидно, уменьшалось, в ЭК выявлялись признаки внутриклеточных компенсаторно-восстановительных процессов. В клетках ПЭС, обладающих выраженными способностями к восстановлению, также активировались компенсаторные процессы.

Однако, проведенные исследования материала после однократного введения метанола в дозе 2,5 г/кг массы тела, показали, что метанол вызывал патологические изменения в ультраструктурах ХК и сетчатки, которые прогрессировали в динамике (1 – 14 сутки). В клетках ПЭС эти явления проявлялись в наибольшей степени, заключающиеся преимущественно, в альте-

рации митохондрий и канальцев ГЭС, в очаговом разрушении плазматических мембран, что приводит к нарушению энергообразования, детоксикационной и других функций этих клеток. Отсутствию в части клеток ПЭС базальных складок, уже через 1 сутки после введения токсического вещества, отражало нарушение насосной их функции, что приводило к дефициту необходимых веществ, которые поступали из ХК в клетки ПЭС и в целом, вызывало нарушение метаболических процессов в клетках ПЭС. Фрагментация апикальных микровилл и скопление обломков мембран НС ФР под клетками ПЭС, свидетельствовало о снижении процесса фагоцитоза этими клетками. Следует отметить, что на 3 сутки в клетках ПЭС преобладали признаки усиления метаболических процессов, что отражалось в повышении числа типичных для этих клеток органелл и увеличение количества фагосом, свидетельствующих об активации процесса фагоцитоза. В то же время в этих же клетках отмечалась реакция митохондрий по типу их истощения, что, возможно, связано с большим расходом энергии. Несмотря на вышеизложенное, к концу срока наблюдения (14 суток) процессы деструкции в клетках ПЭС нарастали, отмечались большие поля опустошения цитоплазмы, наблюдались признаки выраженной дегенерации органелл и очаги разрушения плазмолемм клеток. В фоторецепторном отделе сетчатки выявлялась альтерация структур различной степени выраженности, вплоть до очагового некроза клеток. И степень проявления патологических изменений в ФК зависит от глубины проявления альтерации в клетках ПЭС.

Таким образом, на данном этапе исследования нами установлено, что на примененные дозы метанола в наибольшей степени реагируют клетки ПЭС. Обращает на себя внимание выраженная реакция митохондрий, являющиеся энергообразующими структурами клетки. Для дальнейшего изучения изменений в тканях заднего

отдела глаза под действием метанола исследования будут продолжаться. Более глубокое изучение патологии указанных структур позволит выявить структурные механизмы действия на животный организм как метилового спирта, так возможные процессы, вызываемые этиловым спиртом у человека.

Выводы.

1) На однократное внутрибрюшинное введение метанола как в дозе 0,75 г/кг, так и в дозе 2,5 г/кг массы тела в наибольшей степени реагируют клетки ПЭС.

2) Реакция клеток ПЭС на введение метанола в дозе 0,75 г/кг в динамике заключалась в активации функционирования (1 сутки), сменявшаяся структурными признаками внутриклеточных нарушений (7 сутки) и, затем, способностью быстрого восстановления путем усиления белоксинтезирующей и энергообразующей функций клетки (14 сутки).

3) Однократное внутрибрюшинное введение метанола в дозе 2,5 г/кг массы тела вызывало наиболее выраженные изменения в клетках ПЭС, заключающиеся преимущественно, в альтерации митохондрий и канальцев ГЭС, в разрушении плазматических мембран, особенно апикальных микровилл, которые прогрессировали к концу срока наблюдения.

4) Через 3 суток исследования после введение метанола в дозе 2,5 г/кг массы тела в структурах сетчатки параллельно с деструктивными изменениями в клетках отмечалось усиление признаков компенсаторно-восстановительных процессов.

5) В динамике от 1 – до 14 суток после введение метанола в дозе 2,5 г/кг массы тела степень выра-

женности деструктивных процессов в исследуемых структурах нарастает.

Список использованных источников

1. Битенский В.С. Роль алкоголизма и наркомании в демографическом кризисе в Украине /Битенский В.С. // Журнал Академии Медицинских Наук Украины. – 2007. – т.13. – № 3. – С. 543 – 550.
2. Шульпина Н. Б., Рожнов В.Е., Галиаскарова Ф.Р. //Вестник офтальмологии. -1987. – № 1. – С. 62 – 65. 7.
3. Цимбалюк В.И. Электрофизиологические и морфологические показатели, состояние зрительного анализатора в динамике применения трофина при интоксикации метанолом /В.И. Цимбалюк, А.Т. Носов, Л.Л. Чеботарёва [и др.] //Український нейрохірургічний журнал. – 2004. – № 3. – С. 97-102.
4. Alterations of the morphological findings of the retina and optic nerve/Baumbach GL, Cancilla PA, Martin-Amat G, Tephly TR [etal.] //Archives of Ophthalmology – 1977. – N 10. – P.1859 – 1865. Retinal toxicity in methanol poisoning / J.L. Treichel, T.G. Murray, T.C. Burton [etal.] // Retina. – 2004. – Vol. 24. – P. 309-312.
5. Oxidative stress induced by methotrexate one and in the presence of methanol in discrete regions of the rodent brain, retina and optic nerve /R. Rajamani, A. Muthuvel, M. Senthilvelan [etal.] // Toxicology Letters – 2006. – Vol. 12, № 5. – P. 12-15.
6. Reynoldes E.S. The use of lead citrate at high pH and an electronopaque stain in electron microscopy /Reynoldes E.S. // Journal of Cell Biology. – V. 17. P. 208-212.
7. Долматова Л.С. Особенности изменения активности антиоксидантных ферментов в различных типах лейкоцитов крови у больных с хроническим алкоголизмом /Долматова Л.С., Ромашина В.В. // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2003. – № 2. – С. 17 – 19.
8. Серов В.В. Влияние острого отравления метанолом на перекисное окисление липидов и концентрацию в крови кортикостерона / В.В. Серов, П.Ф. Забродский, В.Ф. Киричук / Вестник новых медицинских технологий. – 2007. –Т. XIV, № 1. – С. 81.

Надійшла до редколегії 23.06.15

Н. Молчанюк, канд. біол. наук

Державна установа "Інститут очних хвороб і тканинної терапії імені В.П. Філатова НАМН України", Одеса, Україна

СВІТЛО- ТА ЕЛЕКТРОННО-МІКРОСКОПІЧНЕ ВИВЧЕННЯ ХОРІОКАПІЛЛЯРІВ, ПІГМЕНТНОГО ЕПІТЕЛІЮ І ФОТОРЕЦЕПТОРНИХ КЛІТИН СІТКІВКИ ЩУРІВ В ДИНАМІЦІ ПІСЛЯ ВВЕДЕННЯ РІЗНИХ ДОЗ МЕТАНОЛУ

У статті показано світлооптичні та електронно-мікроскопічні (ЕМВ) зміни в хоріокапілярах (ХК), пігментному епітелії сітківки (ПЕС) і фоторецепторних клітинах (ФК) сітківки щурів в динаміці відповідної реакції на внутрішньочеревишне введення метанолу.

Ключові слова: хоріокапіляри, пігментний епітелій сітківки, фоторецепторні клітини сітківки, ультраструктура.

N. Molchanuk, PhD

State institution "The Filatov institute of eye diseases and tissue therapy of the national academy of medical sciences of Ukraine", Odessa, Ukraine

LIGHT AND ELECTRON MICROSCOPIC STUDY OF CHORIOCAPILLARIES, PIGMENT EPITHELIUM AND PHOTORECEPTOR CELLS IN THE RETINA OF RATS IN DYNAMICS AFTER ADMINISTRATION OF DIFFERENT DOSES OF METHANOL

The article shows the light and electron microscopic (EMR) change in choriocapillaries (HC), retinal pigment epithelium (RPE) and photoreceptor cells (FC) in rat retinal dynamic response to the intraperitoneal injection of methanol.

Keywords: choriocapillaries, retinal pigment epithelium, the photoreceptor cells of the retina, ultrastructure.

УДК 635.917:712.3: [630*27] (477.53)

О. Ханнанова, канд. біол. наук
Полтавський національний педагогічний університет імені В.Г. Короленка, Полтава,
Н. Смоляр, канд. біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

ВИЩІ СПОРОВІ СУДИННІ РОСЛИНИ РЕГІОНАЛЬНОГО ЛАНДШАФТНОГО ПАРКУ "ГАДЯЦЬКИЙ": ВИДОВИЙ СКЛАД, ЕКОЛОГО-ЦЕНОТИЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ТА СТАН ЗБЕРЕЖЕННЯ

Узагальнено інформацію щодо поширення, екологічних умов місцезростань та стану збереженості вищих спорових судинних рослин на території регіонального ландшафтного парку "Гадяцький" (Полтавська область). Проведено аналіз екологічних характеристик видів у відомих місцезнаходженнях. Окреслено перспективи щодо подальших созо-логічних досліджень цієї групи рослин.

Ключові слова: вищі спорові судинні рослини, рідкісні види, бореальне флористичне ядро, осередок збереження, екологічні групи, ценофлора, регіональний ландшафтний парк.

Вступ. У флорі вищих судинних рослин Лівобережно-Дніпровського лісостепового краю частка споро-

вих рослин є незначною, проте вони мають важливе історичне та созологічне значення. Будучи представни-

ками різних філогенетичних груп (*Lycopodiophyta*, *Psilotophyta*, *Equisetophyta*, *Polypodiophyta* (Мосякін, Тищенко, 2010), вищі спорові судинні рослини є давніми за походженням і пройшли тривалий шлях адаптаціогенезу. В умовах лісостепової зони України, в межах якої знаходиться й Полтавська область (Лівобережжя), більшість вищих спорових судинних рослин, будучи здебільшого бореальними, мають обмежене поширення, зростають на південній межі поширення, а тому потребують охорони.

За результатами оригінальних досліджень та даними флористичних зведень для Полтавської області наводиться відносно значна кількість місцезнаходжень бореальних рослин, серед яких і вищі спорові судинні (далі – ВССР). Інформація про поширення та видовий склад ВССР у регіоні наводилася в низці флористичних зведень по Лівобережному Придніпров'ю (Байрак, 1997), Полтавській області (Байрак, Стецюк, 2005а; Байрак, Стецюк, 2005б; Байрак, Стецюк, 2008) та в ряді спеціальних публікацій (Стецюк, Гапон та ін., 2008; Стецюк, 2008; Стецюк, 2009).

На сьогодні для Полтавщини виділяємо чотири основні осередки бореальної флори, в складі якої значна участь ВССР, – Котелевський, Нижньоворсклянський, Грунь-Ташанський та Гадяцький (Стецюк, 2009).

Останній із них знаходиться на території створеного у 2011 році регіонального ландшафтного парку (далі – РЛП) "Гадяцький" у середній течії р. Псел на площі 12803,3 га. Бореальні комплекси у його межах здебільшого приурочені до борової тераси р. Псел з угрупованнями різновікових соснових культур, а по периферії в умовах підвищеного зволоження – ценозів мішаних лісів із *Quercus robur* L., *Betula pendula* Roth., *Pinus sylvestris* L. Значну участь у них серед бореальних представників флористичного ядра складають саме ВССР.

На території РЛП "Гадяцький" ВССР нами вивчалися у контексті видового складу, еколого-ценотичних особливостей та стану збереженості місцезростань.

Матеріали і методи

Матеріал зібрано нами впродовж 2005-2014 рр. на території Гадяцького району Полтавської області, частина якого входить на сьогодні до складу РЛП "Гадяцький", у місцях із природним рослинним покривом. Нами застосовано загальноприйняті польові (детально-маршрутний, відбору гербарних зразків, рекогносцирування), камеральні (опрацювання літературних джерел, гербарних фондів) методи. У виявлених місцезнаходженнях виконано геоботанічні описи. Для екологічної характеристики місцезнаходжень рідкісних ВССР застосовано методи фітоіндикації (Дідух, Плюта, 1994) та ценофлор (Байрак, 1998). Екологічна характеристика видів вказується згідно концепції "Екофлори України". Назви рослин наводяться за зведенням С.Л. Мосякіна та М.М. Федорончука (Mosyakin, Fedoronchuk 1999). При укладанні систематичного списку використано класифікаційну схему, запропоновану С.Л. Мосякіним та О.В. Тищенко (2010) з уточненнями О.В. Вашеки та О.О. Безсмертної (2012) для *Polypodiophyta*.

Гербарні зразки вищих спорових судинних рослин із виявлених місцезнаходжень передано до Гербарію Інституту ботаніки НАН України (KW) та до фондів Полтавського краєзнавчого музею (PW).

Результати та їх обговорення

Із 31 виду вищих спорових судинних рослин, що наводяться для Полтавської області (Байрак, Стецюк, 2008), на території РЛП "Гадяцький" виявлено 24 види, що належать до 12 родин та 14 родів. Найчисельнішою є родина *Equisetaceae* – 7 видів (32 % від загальної кількості ВССР парку), менш представленими є родини *Dryopteridaceae* – 4 (17 %), *Lycopodiaceae* – 3 (12%), *Cystopteridaceae* – 2 (8%), одним видом репрезентовані родини *Huperziaceae*, *Athyriaceae*, *Onocleaceae*, *Thelypteridiaceae*, *Aspleniaceae*, *Dennstaedtiaceae*, *Polypodiaceae*, *Salviniaceae*. Нами проведений екологічний аналіз видів у відомих місцезнаходженнях на основі відомостей укладеної таблиці 1.

Таблиця 1. Екологічна характеристика вищих спорових судинних рослин РЛП "Гадяцький"

		Біоморфа	Життєва форма за К. Раункієром	Геліоморфа	Гігроморфа	Едафотоп	Фітоценоцикл	Роль виду в угрупованні	Еколого-ценотична характеристика	Постійність	Ареалогічний діагноз
1.	<i>Lycopodiaceae</i> <i>Lycopodium annotinum</i> L.	Pk	Ch	Sh	M	P, Mes	1	A	7	norm	sm/mo-temp-arct. ok ₁₋₃ CIRCIPOL
2.	<i>Lycopodium clavatum</i> L.	Pk	Ch	Sh	M	P, So	1	A	7	rar	(m)/ mo-sm/mo-temp-b.oz ₁₋₃ CIRCIPOL
3.	<i>Diplazium complanatum</i> (L.) Holub	Frt	Ch	Sh	M	P, So	1	A	7	raris	trop/mo-sm-temp-b.k ₁₋₃ CIRCIPOL
4.	<i>Huperziaceae</i> <i>Huperzia selago</i> (L.) Bernh.ex Schrank et Mart.	Pk	Ch	Sh	M	Ac, Se	2	A	7	raris	austr-m/mo-temp/mo-b-arct.ok 1-3 CIRCIPOL + disj AUST + AM
5.	<i>Equisetaceae</i> <i>Equisetum arvense</i> L.	Pk	Hf	H	Km	Ac, Se	4	D	16	norm	(m)/ mo-sm-arct.oz ₍₁₋₃₎ k ₁ CIRCIPOL
6.	<i>Equisetum fluviatile</i> L.	Pk	Hd	Sh	Hih	Sac, Se	2	D	12	norm	sm-b.oz ₁₋₃ CIRCIPOL
7.	<i>Equisetum hyemale</i> L.	Frt	Ch	Sh	Hih	N, Se	1	A	7	raris	m/mo-sm/mo-temp-(b)·(oz ₍₁₋₃₎) CIRCIPOL
8.	<i>Equisetum palustre</i> L.	Pk	Hf	Sh	Hih	Sac, Se	1	D	12	com	m/mo-sm/mo-temp-b.oz ₍₁₋₃₎ CIRCIPOL
9.	<i>Equisetum pratense</i> L.	Pk	Hf	H	M	N, Mes	4	Sd	5	norm	sm/mo-b·(k) ₍₁₋₃₎ CIRCIPOL

Закінчення табл. 1

		Біоморфа	Життєва форма за К. Раункієром	Геліоморфа	Гігроморфа	Едафотоп	Фітоценоцикл	Роль виду в угрупованні	Еколого-ценотична характеристика	Постійність	Ареалогічний діагноз
10.	<i>Equisetum ramosissimum</i> Desf.	Pk	Hf	H	Km	Sac, E	3	A	3	com	austr-strop/ disj AFR-m-sm-(temp)·k ₁₋₃ EURAS
11.	<i>Equisetum sylvaticum</i> L.	Pk	Hf	Hs	Hih	Ac, Mes	1	A	7	rar	sm/mo-temp-b·oz ₁₃ CIRCPO
12.	Salviniaceae <i>Salvinia natans</i> (L.) All.	Mka	Hd	Sh	Hd	N, Se	1	Sd	14	com	stropOAS-m-sm-(temp)·oz ₂₋₃ EURAS
13.	Dennstaedtiaceae <i>Pteridium aquilinum</i> (L.) Kuhn	Pk	Hf	Sh	M	Ac, Mes	3	A	7	raris	austr-boreostrop/ mo hum-m-(b)·(oz ₁₋₃) CIRCPO
14.	Cystopteridaceae <i>Cystopteris fragilis</i> (L.) Bernh.	Pk	Hk	Sh	M	N, Se	2	A	6	al	austr-trop/mo·oz ₁₋₃ -temp-arct CIRCPO
15.	Gymnocarpium <i>dryopteris</i> (L.) Newman	Pk	Hf	Hs	M	Ac, Se	1	A	7	rar	(m/mo-sm/mo)·(oz ₁₋₃)-temp-b-(arct)CIRCPO
16.	Aspleniaceae <i>Asplenium trichomanes</i> L.	Pk	Hk	Hs	M	Sac, Mes	1	A	7	raris	austr-trop/mo disj-m/mo-temp-(b)·oz ₁₋₃ CIRCPO
17.	Thelypteridaceae <i>Thelypteris palustris</i> Schott	Pk	Hf	Hs	Hih	Sac, Se	1	D	12	com	austr+trop/mo disj CIRCPO+(m)/mo-sm-temp-(b)·oz ₁₋₃ EURAS+OAM
18.	Athyriaceae <i>Athyrium filix-femina</i> (L.) Roth	Pk	Hk	Hs	M	Ac, Mes	3	A	7	com	subtrop/mo disj+m/mo-sm(oz ₁₋₃)-temp-b CIRCPO
19.	Onocleaceae <i>Matteuccia struthiopteris</i> (L.) Tod.	Pk	Hk	Hs	Hih	Sac, Se	1	A	9	raris	sm/mo-temp/demo-(b)·oz ₍₁₋₃₎ CIRCPO
20.	Dryopteridaceae <i>Dryopteris dilatata</i> (Hoffm.) A. Gray	Pk	Hk	Hs	M	Ac, Mes	2	A	7	raris	sm/salp-temp/mo+b-(arct)oz ₁₋₍₃₎ CIRCPO
21.	<i>Dryopteris carthusiana</i> (Vill.) H.P. Fuchs	Pk	Hk	Hs	M	Ac, Mes	1	A	7	com	sm/mo-temp-(b)·oz ₁₋₃ EUR·SIB+O(W)AM
22.	<i>Dryopteris cristata</i> (L.) A. Gray	Pk	Hk	Hs	M	Ha, Mes	1	A	7	rar	(sm)/mo-temp-(b)·oz ₍₁₋₃₎ EUR·WSIB+OAM
23.	<i>Dryopteris filix-mas</i> (L.) Schott	Pk	Hk	S	M	Ha, Mes	2	D	7	com	aust-trop/mo disj AM+m/mo-temp-(b)·oz ₁₋₃
24.	Polypodiaceae <i>Polypodium vulgare</i> L.	Pk	Hk	Sh	M	N, Se	1	A	7	raris	austrAFR+KERGUELEN+m/mo-sm-(b)·oz ₁₋₃ CIRCPO

Примітка: Біоморфа: Pk – полікарпик, Mka – монокарпик; Frt – напівкущик; Життєва форма за К. Раункієром: Ch – хамефіт, Hk – гемікриптофіт, Hf – геофіт, Hd – гідрофіт Геліоморфа: H – геліофіт, Hs – геліосціофіт, Гігроморфа: Hih – гігрофіт, Mk – мезоксерофіт, Km – ксеромезофіт, M – мезофіт, Hd – гідрофіт, Едафотоп: P – перацидофіл, Ac – ацидофіл, Sac – субацидофіл, N – нейтрофіл, Ha – геміацидофіл, Mes – мезотроф, So – семіоліготроф, Se – семіевтроф, E – евтроф, Shl – субелікотроф, Фітоценоцикл: 1 – стенотопний, 2 – гемістенотопний, 3 – геміевритопний, 4 – евритопний; Роль виду в угрупованні: A – асектатор, D – домінанта, Sd – співдомінанта; Еколого-ценотична характеристика: 1 – степовий, 2 – лучно-степовий, 3 – піщано-степовий, 4 – піщано-лучний, 5 – лучний, 6 – неморально-лісовий, 7 – бореально-лісовий, 8 – узлісний, 9 – болотно-лісовий, 10 – лучно-болотний незасолених місцезростань, 11 – лучно-болотний засолених місцезростань, 12 – болотний, 13 – прибережно-водний, 14 – водний, 15 – група видів із широкою екологією, 16 – рудеральний; Постійність: port – звичайно, com – досить звичайно, rar – рідко, rarіs – дуже рідко.

За результатами проведеного аналізу відомостей, наведених у таблиці 1, встановлено, що за основною біоморфою серед ВССР парку переважають трав'янисті багаторічники (22 види із 24), два види є напівкущиками, один – однорічником. За класифікацією життєвих форм К. Раункієра переважають гемікриптофіти та геофіти (9 та 8 видів відповідно), дещо менше у кількісному відношенні складають хамефіти (5 видів). Два види (*Salvinia natans*, *Equisetum fluviatile*) представляють групу гідрофітів.

Одними із визначальних екологічних факторів едафотопу є вологість та трофність. За характером гідроморф серед ВССР парку переважають мезофіти (15 видів), які приурочені до вологих лісо-лучних екотопів із тимчасовим надмірним зволоженням кореневмісного шару ґрунту ґрунтовими водами. У таких екологічних умовах зростають більшість хвощів та деякі папороті. Добре представленою є група гігрозомезофітів (7 видів), яку формують рослини свіжих лісо-лучних екотопів із повним промочуванням кореневмісного шару

грунту опадами і талими водами. Як правило, вони входять до флористичних комплексів соснових лісів. Серед них переважають плауни та папороті. Група гігрофітів представлена одним видом *Dryopteris cristata*, який зростає в умовах сирих лісо-лучних екоотопів із практично сталим капілярним зволоженням кореневмісного шару ґрунту. *Salvinia natans* є субгідрофітом (Екофлора, 2000).

Основними показниками трофотопу, які визначають умови зростання ВССР парку, є кислотність і засоленість ґрунту. За показником кислотності ґрунту більшість досліджуваних рослин є ацидофілами (7 видів) – рослини кислих (рН 4,5-5,5) дерново-підзолистих ґрунтів, які зустрічаються в зниженнях борової тераси р. Псел, зайнятої різновіковими сосновими насадженнями. Групи нейтрофілів, які зростають на нейтральних (рН 6,5-7,1) ґрунтах, та субацидофілів, рослин слабкислих (рН 5,5-6,5) ґрунтів, налічують по 6 видів. Інші види представляють групи перацидофілів (3 види), приурочених до досить кислих (рН 3,7-4,5) ґрунтів борів, та геміацидофілів (2 види).

Загальний сольовий режим є дуже важливою характеристикою ґрунтів, оскільки впливає на процеси ґрунтоутворення і визначає адаптацію рослинних організмів. За особливостями сольового режиму досліджуваних екоотопів найбільш представленими серед спорових рослин парку виявилися семіевтрофами (11 видів) – рослини бідних на солі сильно вилужених ґрунтів, та мезотрофами (9 видів), приурочені до екоотопів із небагатьма на солі ґрунтами (95-150 мг/л), здебільшого із гідрокарбонатами. Семіоліготрофна екологічна група репрезентована двома видами, які приурочені до бідних на солі (концентрація в межах 75-100 мг/л) сильно вилужених ґрунтів. Субглікотрофи та еутрофи представлені одним видом.

За широтою екологічної амплітуди досліджувані види розподілилися між чотирма групами. Найбільш представленою є група видів, поширених у межах 1-2 союзів – стеноотопів (13 видів), тих, що поширені в межах одного класу, – гемістенотопів (6 видів). Групу геміевритопів – рослин, які трапляються у межах двох-трьох класів – представляють три види. Евритопи репрезентовані двома видами. В цілому, досліджувані ВССР виявляють особливості стенобіонтів, що слід враховувати при розробці шляхів збереження цих видів у природних умовах.

Рослини, які мають подібні адаптації за відношенням до світла, розглядаються як геліоморфи. За цією екологічною характеристикою ВССР парку розподілилися між чотирма екологічними групами. Найбільш представленими є перехідні групи субгеліофітів (11 видів) та гемісциофітів (9 видів). В умовах достатньої кількості світла зростають 3 види. Групу сціофітів представляє тільки *Dryopteris filix-mas*.

Із 20 рідкісних і зникаючих видів ВССР Полтавської області (Байрак, 1997) для території парку нині відомо 14 (75 % від загальної кількості раритетної фракції вищих судинних спорових області) (Байрак, Стецюк, 2005), у тому числі: 4 види класу *Lycopodiopsida*, 2 – *Equisetopsida* (із 8 виявлених), 8 – *Polypodiopsida* (із 13). Раритетна частка флори ВССР парку (Смоляр, Ханнова, 2012) включає 4 види, занесених до Червоної книги України (*Lycopodium annotinum*, *Diphasiastrum complanatum*, *Huperzia selago*, *Salvinia natans*) та 10 регіонально рідкісних, що охороняються в Полтавській області (табл. 2).

Надаємо загальну характеристику місцезнаходжень видів, включених до Червоної книги України.

Lycopodium annotinum. – зникаючий палеарктичний вид на південній межі ареалу. У межах парку зростає в соснових лісах борової тераси р. Псел на території Вельбівського лісництва, де разом із *Lycopodium clavatum* L. утворює нечисленні куртини на плескатих знижених ділянках із свіжими дерново-підзолистими ґрунтами. Зустрічається рідко.

Diphasiastrum complanatum – зникаючий голарктичний вид на південній межі ареалу. РЛП "Гадяцький" – єдине місцезнаходження виду в Полтавській області й на території Лівобережно-Дніпровського лісостепоного краю. Зростає на боровій терасі р. Псел у соснових лісах Вельбівського та Лютенського лісництв ДП "Гадяцьке лісове господарство". Вид приурочений до піщаних ґрунтів. У першому локалітеті утворює ценопопуляцію в мікророзниженні типу "болота-блюдця" із участю *Betula pendula* Roth., *Populus tremula* L. разом із *Lycopodium clavatum* L. та зеленими мохами. У складі нечисельної ценопопуляції наявні вегетуючі та спороносні особини. У другому локалітеті зафіксовано вісім вегетуючих екземплярів виду на зрідженому покриві із зелених мохів. Очевидно в даному локалітеті рослини тільки заселились.

Huperzia selago – зникаючий голарктичний вид на південній межі ареалу. РЛП "Гадяцький" – єдине місцезнаходження виду в Полтавській області й на території Лівобережно-Дніпровського лісостепоного краю. Місцезнаходження виявлено на території Вельбівського лісництва (насадження віком 80-90 років) у воронкоподібному зниженні на боровій терасі р. Псел серед масиву соснового лісу, зайнятого березово-осиковою колкою з участю *Pinus sylvestris* L. Виявлено разом із *Lycopodium clavatum* один екземпляр, що має вісім пагонів, добре розвинутий і спороносний.

Salvinia natans – рідкісний реліктовий голарктичний вид. Трапляється досить часто в складі водної рослинності р. Псел (евтрофні та евмезотрофні замкнуті та проточні водойми з мулистопіщаними ґрунтами). Утворює щільні популяції. Детальні відомості щодо поширення рідкісних ВССР наведена у таблиці 2.

Таблиця 2. Особливості поширення рідкісних спорових судинних рослин на території РЛП "Гадяцький"

Вид	Наукова цінність	Ценоотоп, ценофлора	К-ть місцезнаходжень
** <i>Lycopodium annotinum</i> L.	Зникаючий вид на південній межі ареалу	Соснові насадження, мішані ліси; Cladonio-Pinophytum	1
* <i>Lycopodium clavatum</i> L.	Вразливий вид на південній межі ареалу	Соснові насадження, мішані ліси; Cladonio-Pinophytum, Sphagno-phytum	5
** <i>Diphasiastrum complanatum</i> (L.) Holub	Зникаючий вид на південній межі ареалу	Соснові насадження, мішані ліси; Cladonio-Pinophytum	2
** <i>Huperzia selago</i> (L.) Bernh. ex Schrank et Mart	Зникаючий вид на південній межі ареалу	Соснові насадження; Cladonio-Pinophytum	1
* <i>Equisetum hyemale</i> L.	Рідкісний вид	Соснові насадження, мішані, листяні ліси; Asaro-Quercophytum, Cladonio-Pinophytum, Aristolochio-Populo-phytum	4
* <i>Equisetum sylvaticum</i> L.	Вразливий вид на південній межі ареалу	Соснові насадження, мішані ліси; Sphagno-phytum	3

Закінчення табл. 2

Вид	Наукова цінність	Ценотоп, ценофлора	К-ть місцезнаходжень
** <i>Salvinia natans</i> (L.) All.	Рідкісна реліктова водна папороть	Евтрофні та евмезотрофні замкнуті або проточні водойми; Hydrochario-phytum	1
* <i>Pteridium aquilinum</i> (L.) Kuhn	Рідкісний вид	Соснові насадження, мішані ліси; Pteridio-phytum	2
* <i>Gymnocarpium dryopteris</i> (L.) Newm.	Вразливий вид на південній межі ареалу	Соснові насадження, евмезотрофні болота; Sphagno-phytum	2
* <i>Asplenium trichomanes</i> L.	Зникаючий вид, що зростає у нетипових умовах	Стінка штучної розмежувальної канами серед соснових насаджень; Cladonio-Pinophytum	1
* <i>Matteuccia struthiopteris</i> (L.) Tod.	Реліктовий вразливий вид	Вільхові ліси, евмезотрофні болота; Alnophytum	1
* <i>Dryopteris dilatata</i> (Hoffm.) A. Gray	Вразливий вид на південній межі ареалу	Соснові насадження Cladonio-Pinophytum	2
* <i>Dryopteris cristata</i> (L.) A. Gray	Вразливий вид на південній межі ареалу	Евмезотрофні болота; Sphagnophytum	2
* <i>Polypodium vulgare</i> L.	Вразливий гірсько-лісовий	Соснові насадження; Cladonio-Pinophytum	1

Примітка: * – регіонально рідкісні види, що охороняються в Полтавській області, ** – види, включені до Червоної книги України

За категоріями рідкості, що визначені у Червоній книзі України (2009), виявлені на території РЛП "Гадяцький" ВССР належать до груп зникаючих (4 види), вразливих (8 видів) та рідкісних, популяції яких є різночисельними (3 види). Категорія зникаючих видів включає 3 види *Lycopodiophyta* та один вид *Polypodiophyta* (табл. 2). Серед вразливих видів переважають *Polypodiophyta* (5 видів), які зростають на південній межі ареалу, а також два види *Equisetophyta* та один *Lycopodiophyta*. Групу рідкісних складають два види *Polypodiophyta* та один *Equisetophyta*, які в окремих локалітетах є домінантами або субдомінантами, проте мають обмежене поширення на території парку. Серед зникаючих та вразливих переважають види, які зростають у регіоні на південній межі поширення. Здебільшого це бореальні та голарктичні види, що приурочені до соснових лісів. І хоча майже всі масиви соснових лісів на території парку, як і в цілому в регіоні, мають штучне походження, і за екологічними умовами, флористичним та ценотичним складом істотно відрізняються від північних варіантів (навіть Українського Полісся), вони є важливими оселищами на міграційних шляхах для бореальних видів рослин, які просуваються по борових терасах річок із півночі на південь.

Найціннішою в соціологічному відношенні стосовно ВССР парку є ценофлора *Cladonio-Pinophytum* варіант *Juniperophytum*, яка репрезентує флору старих за віком соснових ценозів із участю типових бореальних видів у розрідженому трав'яному покриві. Найбільшу кількість видів рідкісних ВССР на території парку виявлено у місцезнаходженнях на боровій терасі р. Псел у кв. 100, 102 Вельбівського лісництва ДП "Гадяцьке лісове господарство" (*Diphasiastrum complanatum*, *Huperzia selago*, *Lycopodium annotinum*, *L. clavatum*, *Asplenium trichomanes*, *Equisetum hyemale*, *Polypodium vulgare*, *Dryopteris dilatata*, *Gymnocarpium dryopteris*, *Pteridium aquilinum* (Смоляр, Ханнанова, 2014). Добру збереженість деяких інших рідкісних ВССР можна пояснити знаходженням їх місцезростань на території об'єктів природно-заповідного фонду (ботанічних пам'яток природи "Гадяцький бір", "Березовий гайок", заповідного урочища "Гадяцький бір", ботанічного заказника "Гадяцький бір", гідрологічного заказника "Болото Моховате" (*Polypodium vulgare*, *Pteridium aquilinum*, *Equisetum hyemale*, *Lycopodium clavatum*) та ін.), які увійшли свого часу до складу РЛП "Гадяцький".

Отже, в умовах Лівобережно-Дніпровського лісостепового краю, в межах якого знаходиться РЛП "Гадяцький", більшість ВССР мають обмежене поширення, є

рідкісними і потребують охорони. Вивчення сучасних умов поширення цих видів є передумовою розробки заходів щодо їх збереження у природних умовах та культурі. Нині фітосоціологічні дослідження на території парку спрямовані на виявлення нових місцезнаходжень рідкісних рослин, у тому числі й спорових судинних, та здійснення моніторингу відомих із метою вивчення стратегій ценопопуляцій та розробки ефективних заходів охорони. Проте не лише рідкісні види ВССР потребують охорони, а й інші, оскільки вони представляють в основному хвойно-лісову бореальну групу, які в регіоні, як правило, знаходяться на південній межі ареалів. Враховуючи, що при створенні парку "Гадяцький" до його меж увійшли не всі характерні структурні елементи і площі природно-територіальних комплексів долини р. Псел, зокрема борової тераси, актуально постають питання фітосоціологічних досліджень прилеглих до парку територій із метою виявлення та забезпечення охороною нових місцезнаходжень рідкісних видів.

Список використаних джерел

1. Байрак О.М. Конспект флори Лівобережного Придніпров'я / О.М. Байрак ; за ред. С.Л. Мосіякіна. – Полтава : Верстка, 1997. – 164 с.
2. Байрак О.М. Сучасні погляди на ценофлору та принципи їх виділення / О.М. Байрак // Укр. бот. журн. – 1998. – 55, №6. – С. 620-624.
3. Байрак О.М. Атлас рідкісних і зникаючих рослин Полтавщини / О.М. Байрак, Н.О. Стецюк. – Полтава : Верстка, 2005а. – 248 с.
4. Байрак О.М. Конспект флори Полтавщини. Вищі судинні рослини / О.М. Байрак, Н.О. Стецюк. – Полтава : Верстка, 2008. – 196 с.
5. Байрак О.М. Еколого-ценотичні особливості рідкісних вищих спорових судинних рослин Полтавської області / О.М. Байрак, Н.О. Стецюк // Збірник наукових праць Полтавського державного педагогічного університету імені В.Г. Короленка. – Серія "Екологія. Біологічні науки". – 2005б. – Випуск 4(43). – С. 3-11.
6. Вашека О.В. Атлас папоротей флори України: монографія / О.В. Вашека, О.О. Безсмертна. – К. : ПАЛИВОДА А.В., 2012. – 160 с.
7. Дідух Я.П. Фітоіндикація екологічних факторів / Я.П. Дідух, П.Г. Плюта. – К. : Наукова думка, 1994. – 280 с.
8. Екофлора України / за ред. Я.П. Дідуха. – К., 2000. – Т. 1. – 248 с.
9. Мосіякін С.Л. Прагматична філогенетична класифікація спорових судинних рослин флори України / С.Л. Мосіякін, О.В. Тищенко // Укр. бот. журн. – 2010. – Т. 67, №6. – С. 524-527.
10. Смоляр Н.О. Раритетний флорофонд вищих спорових судинних рослин регіонального ландшафтного парку "Гадяцький" (Полтавська область) / Н.О. Смоляр, О.Р. Ханнанова // "Рослинний світ у Червоній книзі України: впровадження глобальної стратегії збереження рослин" : М-ли II Міжнар. наук. конф. – Київ : ПАЛИВОДА А.В. – 2012. – С.304-308
11. Смоляр Н.О. До питання підвищення статусу деяких об'єктів у межах РЛП "Гадяцький" / Н.О. Смоляр, О.Р. Ханнанова // "Біорізноманіття України в світі ноосферної концепції академіка В.І. Вернадського" : М-ли Всеукр. наук.-практ. конф. – Полтава : Астрія. – 2014. – С.127-130.
12. Стецюк Н.О. Загальні показники біорізноманітності проектового регіонального ландшафтного парку "Гадяцький" / Н.О. Стецюк, С.В. Гапон, І.С. Беседина, М.В. Слюсар // "Біорізноманіття: теорія, практика та методичні аспекти вивчення в загальноосвітній та вищій школі" : М-ли Міжнар. наук.-практ. конф. – Полтава : ПДПУ. – 2008. – С. 256-261.

13. Стецюк Н.О. Еколого-ценотична та флористична характеристика осередків раритетної фіторізноманітності Гадяцького району (Полтавська область) / Н.О. Стецюк // Збірник наукових праць Полтавського державного педагогічного університету імені В.Г. Короленка. Серія "Екологія. Біологічні науки". – 2008. – Випуск 5 (63). – С. 118-126.

14. Стецюк Н.О. Збереження бореальних фітосистем у регіональній екологічній мережі (Полтавська область) / Н.О. Стецюк // Збірник наукових праць Полтавського державного педагогічного університету імені В.Г. Короленка. Серія "Екологія. Біологічні науки". – 2009. – Вип. 1. – С. 73-78.

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

16. Mosyakin S.L. Vascular plants of Ukraine. A nomenclature checklist / S.L. Mosyakin, M.M. Fedoronchuk. – Kiev, 1999. – XXIV. – 345 p.

Надійшла до редколегії 09.06.15

О. Ханнанова, канд. биол. наук

Полтавский национальный педагогический университет имени В.Г. Короленка, Полтава, Украина,

Н. Смоляр, канд. биол. наук

Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

ВЫСШИЕ СПОРОВЫЕ СОСУДИСТЫЕ РАСТЕНИЯ РЕГИОНАЛЬНОГО ЛАНДШАФТНОГО ПАРКА "ГАДЯЦКИЙ":

ВИДОВОЙ СОСТАВ, ЭКОЛОГО-ЦЕНОТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ И СОСТОЯНИЕ СОХРАННОСТИ

Обобщена информация по распространению, экологических условий местообитаний и состояния сохранности высших споровых сосудистых растений на территории регионального ландшафтного парка "Гадяцкий" (Полтавская область). Проведен анализ экологических характеристик видов в известных местоположении. Определены перспективы относительно дальнейших соэкологических исследований этой группы растений.

Ключевые слова: высшие споровые сосудистые растения, редкие виды, бореальное флористическое ядро, центр сохранения, экологические группы, ценофлор, региональный ландшафтный парк.

O. Hananova, PhD

Poltava V.G. Korolenko National Pedagogical University, Poltava, Ukraine,

N. Smolyar, PhD

Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

HIGHER DISPUTE VASCULAR PLANTS REGIONAL LANDSCAPE PARK "HADIACH": SPECIES COMPOSITION, ECOLOGICAL AND COENOTIC FEATURES AND CONSERVATION STATUS

The information on distribution, habitats and ecological conditions higher spore state of preservation of vascular plants was generalized in the regional landscape park "Gadyachskij" (Poltava region). The environmental performance of types was analyzed in certain locations. Prospects for further sozological researchs of this group of plants are outlined.

Key words: spore higher vascular plants, rare species, boreal floristic core focus of conservation, environmental groups, coenofloras, regional landscape park.

Наукове видання



ВІСНИК

КИЇВСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОГО УНІВЕРСИТЕТУ ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

**ПРОБЛЕМИ РЕГУЛЯЦІЇ
ФІЗІОЛОГІЧНИХ ФУНКЦІЙ**

Випуск 1 (18)

Друкується за авторською редакцією

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

Автори опублікованих матеріалів несуть повну відповідальність за підбір, точність наведених фактів, цитат, статистичних даних, відповідної галузевої термінології, імен власних та інших відомостей. Редколегія залишає за собою право скорочувати та редагувати подані матеріали. Рукописи та матеріали на електронних носіях не повертаються.



Формат 60x84^{1/8}. Ум. друк. арк. 9,7. Наклад 300. Зам. № 215-7370.
Гарнітура Arial. Папір офсетний. Друк офсетний. Вид. № Б 6.
Підписано до друку 14.07.15

Видавець і виготовлювач
Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет"
01601, Київ, б-р Т. Шевченка, 14, кімн. 43
☎ (38044) 239 3222; (38044) 239 3172; тел./факс (38044) 239 3128
e-mail: vpc@univ.kiev.ua
[http: vpc.univ.kiev.ua](http://vpc.univ.kiev.ua)
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 1103 від 31.10.02