

ISSN 0206-5657

**ВІСНИК**  
ЛЬВІВСЬКОГО  
УНІВЕРСИТЕТУ

СЕРІЯ БІОЛОГІЧНА

Випуск 64

2014

**VISNYK** | **ВІСНИК**  
**OF THE LVIV** | **ЛЬВІВСЬКОГО**  
**UNIVERSITY** | **УНІВЕРСИТЕТУ**

**Series Biology** | **Серія біологічна**

**Issue 64** | **Випуск 64**

Scientific journal | Збірник наукових праць

Published 3–4 issues per year | Виходить 3–4 рази на рік

*Published since 1962* | *Видається з 1962 року*

Ivan Franko | Львівський національний  
National University of Lviv | університет імені Івана Франка

2014

Друкується за ухвалою Вченої Ради  
Львівського національного університету  
імені Івана Франка

Свідоцтво про державну реєстрацію серія  
КВ №14810-3581Р від 28 жовтня 2008 р.,  
перереєстровано як фахове видання України  
(постанова Президії ВАК №1-05/2 від 27  
травня 2009 р.). Видання включене до Thom-  
son Scientific Master Journal List (список ISI)

У “Віснику Львівського університету. Серія біологічна” опубліковані статті з актуальних проблем біології. Для наукових працівників, аспірантів і студентів старших курсів.

Papers on current problems in biology are published in the Visnyk. For scientific staff, Ph. D. students and Bachelors.

Редакційна колегія:

д-р біол. наук, проф. *В. Федоренко* – головний редактор; д-р біол. наук, проф. *В. Манько* – заступник головного редактора; *Н. Цимбалюк* – секретар; д-р біол. наук, проф. *С. Волгін* (Волинський національний університет імені Лесі Українки); канд. біол. наук, проф. *С. Гудзь*; д-р біол. наук *А. Бабський*; канд. біол. наук, доц. *І. Хамар*; д-р біол. наук, проф. *О. Демків* (Інститут екології Карпат НАН України); д-р біол. наук, проф. *Г. Калачнюк* (Національний університет біоресурсів і природокористування України); д-р біол. наук, проф. *М. Клевець*; д-р біол. наук *М. Козловський* (Інститут екології Карпат НАН України); д-р біол. наук, проф. *Н. Сибірна*; д-р біол. наук, проф. *Д. Санагурський*; канд. біол. наук, доц. *С. Гнатуш*; чл.-кор. НАН України, д-р біол. наук, проф. *Р. Стойка*; д-р біол. наук, проф. *Л. Тасенкевич*; д-р біол. наук, проф. *О. Терек*; д-р біол. наук, доц. *Н. Федірко*; д-р біол. наук, проф. *Й. Царик*; д-р біол. наук, проф. *Ю. Чорнобай* (Державний природознавчий музей НАН України); д-р біол. наук, проф. *Г. Антоняк*; д-р біол. наук *Б. Осташ*

Dr. Biol. Sci., Professor *V. Fedorenko* – Editor-in-Chief

Dr. Biol. Sci., Professor *V. Manko* – Assistant Editor

*N. Tymbalyuk* – Managing Editor

Відповідальні за випуск: *В. Федоренко, Н. Цимбалюк*

**Адреса редколегії:**

Львівський національний університет  
імені Івана Франка, біологічний факультет  
вул. Грушевського, 4  
Львів 79005, Україна  
тел.: (032) 239-47-86

**Editorial office address:**

Ivan Franko National University  
of Lviv, Biology faculty  
4, Hrushevskiy St.  
Lviv 79005, Ukraine  
tel. (032) 239-47-86

E-mail: [biovisnyk@franko.lviv.ua](mailto:biovisnyk@franko.lviv.ua)

<http://www.lnu.edu.ua/faculty/biologh/wis/wis.htm>

Редактор: Л. СІДЛОВИЧ

Комп'ютерна верстка: В. ДЕМЧУК

---

Адреса редакції, видавця і виготовлювача:  
Львівський національний університет  
імені Івана Франка  
вул. Університетська, 1, Львів 79000, Україна  
Свідоцтво про внесення суб'єкта видавничої  
справи до Державного реєстру видавців,  
виготівників і розповсюджувачів видавничої  
продукції. Серія ДК №3059 від 13.12.2007 р.

Формат 70x100/<sub>16</sub>  
Ум. друк. арк. 27,3  
Тираж 100 прим. Зам.

© Львівський національний університет  
імені Івана Франка, 2014

ОГЛЯДИ

УДК: 541.64

**ОСОБЛИВОСТІ ЗАСТОСУВАННЯ ПОЛІМЕРНИХ НОСІЇВ НА ОСНОВІ  
ПОЛІЕТИЛЕНГЛІКОЛЮ ДЛЯ ДОСТАВКИ ЛІКІВ В ОРГАН-МІШЕНЬ**

**Ю. Здвіжков, М. Бура**

*Львівський національний університет імені Івана Франка  
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна  
e-mail: Zdvizhkov\_yura@ukr.net*

Під доставкою ліків розуміють сукупність методів, технологій і прийомів, що використовують для модифікації фізико-хімічних, фармакологічних та фармацевтичних властивостей лікарських засобів з метою покращення їх ефективності й підвищення безпеки. Особливе місце серед цих досліджень посідають розробки лікарських форм із застосуванням нанотехнологій. Лікарські засоби, що не мали успіху раніше через високу токсичність, можуть отримати шанс на друге життя завдяки включенню у системи доставки ліків. Окрім того, покращується біодоступність і стає можливим контрольоване вивільнення ліків. У даній статті описуються перспективи застосування модифікованого поліетиленгліколем полімерного носія (ВЕР-ГМА-ПЕР) для доставки антимікробних і протипухлинних препаратів в орган-мішень.

*Ключові слова:* полімер, доставка, лікарські засоби, біодоступність, орган-мішень.

Традиційні лікарські форми можуть бути непридатними для доставки таких біологічно активних речовин, як нуклеїнові кислоти чи білки. За допомогою наночастинок можна оптимізувати ефективність, звести до мінімуму побічні ефекти й покращити комплаєнс. Це поняття описує поведінку хворого щодо всього спектра медичних призначень: правильності прийому ліків, точності виконання нелікарських процедур, дотримання дієти, обмеження шкідливих звичок, формування здорового способу життя. Бурхливий розвиток у галузі створення цих нових лікарських засобів (ЛЗ) призвів до появи різноманітних лікарських форм: парентеральних, офтальмологічних, пероральних, зовнішніх тощо. Серед можливих шляхів введення систем доставки ліків на основі наноносіїв зазначають інгаляційний [12], аргументуючи це тим, що легені мають велику площу поверхні й не містять гістогематичних бар'єрів, які б обмежили всмоктування наночастинок у кров, забезпечуючи тим самим системний вплив на організм в цілому.

**Системи цільової доставки лікарських речовин на основі полімерних носіїв.** У доставці ЛЗ реалізують два основних механізми дії частинок останніх:

- пасивний (завдяки невеликим розмірам наночастинок можуть накопичуватися в органі-мішені);
- активний з використанням специфічних медіаторів для зв'язування з рецепторами на поверхні клітини-мішені [25].

Системи доставки ліків (СДЛ) є, як правило, колоїдними системами, і їх можна класифікувати залежно від агрегатного стану та морфологічних особливостей [1]. Згідно з цією класифікацією, їх поділяють на: наносуспензії; ліпосоми; змішані міцели; кристалічні структури (ліотропи); мікроемульсії; наноемульсії; нанокapsули, сурфактанти; полімерні наночастинок; тверді ліпідні наночастинок та наноліпідні носії.



Існує також класифікація, в основу якої покладено природу носія [25]. Згідно з нею, наночастинки для доставки ліків можуть бути:

- полімерні (включаючи міцели і дендримери);
- ліпідні (ліпосоми); сюди також можна віднести ліпідні нанокапсули [18], хіломікронподібні емульсії та рекомбінантні ліпопротеїни низької щільності [75] тощо;
- вірусні;
- органометалеві наночастинки (наприклад, нанотрубки).

За останні десятиліття розроблено багато нових СДЛ в орган-мішень на полімерних носіях природного та синтетичного походження [52]. Серед них важливе місце займають спеціально сконструйовані поверхнево-активні полімерні носії, які не лише здатні іммобілізувати лікарські сполуки, а й містять спеціальні вектори, що забезпечують цільову доставку до патологічних клітин, і фрагменти (наприклад, фосфатидил холін, фолієва кислота, поліетиленгліколь (ПЕГ), які полегшують подолання клітинної ліпідної мембрани [15]. Розробка нових нанорозмірних систем для доставки лікарських засобів у клітини пухлин є одним із найбільш пріоритетних завдань сучасної фармацевтичної промисловості. Такі носії протипухлинних препаратів повинні мати унікальні структурно-функціональні властивості, зокрема, малий розмір частинок, високу стабільність, а також специфічний гідрофільно-гідрофобний баланс.

До наноносіїв висуваються особливі вимоги. Так, зазначають, що для ефективних систем доставки ліків необхідно поєднати дві структури з несумісними властивостями: наноліки мають бути стабільними і зберігати хімічну структуру протягом певного періоду та водночас бути здатними до біодеградації (руйнування складних речовин, матеріалів, продуктів у результаті діяльності живих організмів). У роботі V. P. Torchilin (2006) до систем доставки ліків висуваються такі основні вимоги:

- 1) пролонгована циркуляція у крові;
- 2) здатність до акумуляції у зоні патологічного процесу;
- 3) здатність ефективно переносити молекули діючої речовини у клітину й окремі органели;
- 4) здатність нести певний контрастний агент, за допомогою якого можна у реальному часі спостерігати за накопиченням ЛЗ у зонах патологічного процесу.

У статті М. Головенко та В. Ларіонова (2008) міститься перелік параметрів «ідеального» наноносія. Окрім вищезазначених, це:

- розмір частинок <100 нм;
- фізична стабільність у цілісній крові;
- сумісність із білками, пептидами, нуклеїновими кислотами;
- мінімальний вплив наноносія на активну речовину;
- можливість зміни профілю вивільнення ЛЗ;
- економічна ефективність процесу виготовлення наночастинок.

Нанорозмірні системи доставки лікарських препаратів (5–250 нм) здатні змінити терапію різних захворювань завдяки, в першу чергу, підвищеній здатності долати різні біологічні бар'єри, збільшенню часу напіввиведення та адресній (цільовій) доставці лікарського засобу.

Основна **мета** створення наномолекулярних лікарських речовин:

- подолання біологічних бар'єрів, наявних в організмі (кишечник – кровоносне русло, кровоносне русло – тканина, гематоенцефалічний бар'єр) [40];
- подолання набутої резистентності (запобігання розвиткові стійкості) до лікар-

ських речовин. Молекулярне конструювання водорозчинних полімерів, які б, окрім таких характеристик, як нетоксичність та біодеградабельність, були універсальними носіями для ЛЗ різної природи та могли долати природні біологічні бар'єри як на тканинному, так і на клітинному рівнях [23, 36], є актуальним завданням сучасної біології та молекулярної біофізики;

- зменшення побічних ефектів (токсичність, алергенність);
- збільшення часу життя лікарського препарату в організмі.

Найбільш вивченими до теперішнього часу і безпечними є полімерні міцели і кон'югати *полімер - лікарська речовина*, оскільки вони не накопичуються в організмі [77]. Доведено, що гідрофільні полімери, такі як ПЕГ, можуть бути кон'юговані ковалентно або адсорбовані на поверхні наночастинок з метою формування «корони», яка забезпечує просторову стабілізацію та забезпечує «невидимість» для системи моонуклеарних фагоцитів і опсонізуючих білків (імуноглобулінів і факторів комплемента) [10, 71].

Завдяки унікальним розмірам і модифікації поверхні, наночастинок ідеально підходять для подолання низки фізіологічних бар'єрів (кишкова стінка, гематоенцефалічний бар'єр та ін.). З одного боку, це збільшує терапевтичну концентрацію в тканинах організму, з іншого – дає змогу подолати печінковий бар'єр. Відомо, що швидкий кліренс лікарських препаратів забезпечується системою моонуклеарних фагоцитів печінки та селезінки і прискорюється опсонізацією наночастинок факторами комплемента й імуноглобулінами.

Основний інтерес на даний момент становлять кон'югати *полімер-лікарська речовина*, отримані методом ковалентної адсорбції біологічних молекул на поліетиленгліколі. Перевагою таких препаратів є значно знижена токсичність, імуногенність і алергенність, а також пролонгований ефект.

Електронно-променева іммобілізація має незаперечну перевагу перед традиційною хімічною, багаторазово збільшує ефективність синтезу наноконструкцій.

Основою технології, що використовується у виробництві, є електронні прискорювачі. Дані прискорювачі дають змогу отримувати спрямований потік прискорених електронів з енергією кілька МеВ, здійснювати опромінення протягом довільно обраного часу, точно дозувати поглинену об'єктом дозу опромінення. До теперішнього часу знайдені технологічні рішення, коли при спільному опроміненні біологічноактивних молекул і водорозчинних інертних полімерів (поліетиленоксид, поліакриламід, декстрини) одночасно досягається ковалентне зшивання полімеру й активної речовини без пошкодження навіть нестійких молекул. Зшивання здійснюється шляхом активації вільно-радикальних процесів, характеризується формуванням міцних ковалентних зв'язків. Таким чином, можна отримувати композитні речовини із заданими властивостями (наприклад, багатошарові полімери).

Використання даної технології дає змогу створювати лікарські препарати з низькою токсичністю (відсутність алергічних реакцій), високою ефективністю (збільшення тривалості дії за рахунок іммобілізації на полімері-носії активних молекул, що не піддаються деградації), а також високою біодоступністю (полімер-носій дає активним речовинам змогу всмоктуватися в кишечнику, захищаючи від руйнування травними ферментами).

Наявні хімічні методи створення іммобілізованих на полімерних носіях препаратів характеризуються багатостадійністю, використанням високотоксичних сполук, що потребує багаторазового очищення й інактивації проміжних сполук на кожній стадії. Усе це робить процес іммобілізації громіздким, технологічно перевантаженим і малорентабельним.

Найвнї іммобілізованї хімічним шляхом комерційні препарати істотно дорожчі від своїх неіммобілізованих аналогів (наприклад, філґрастим і пегфілґрастим).

**Полімерні наноносії, їх класифікація, властивості й застосування у клініці.** Активне дослідження полімерних носіїв у сучасній нанофармакології пов'язане із тим, що вони виявляють ряд корисних властивостей і відповідають багатьом вимогам до наноносіїв. Полімерні наноносії можна класифікувати за структурою:

- *капсули* (полімерні наночастинки, або кон'югати «полімер-ЛЗ») [9]. У ролі носія може використовуватись альбумін, ПЕГ, N-(2-гідроксипропіл)- метакриламід кополімер. Прикладом полімерних наноліків є абраксан, його застосовують для лікування злоякісних пухлин молочної залози;
- *амфифільні макромолекули* зі серцевиною та корком (полімерні міцели). У ролі носія може застосовуватись полімер на основі ПЕГ [16, 24, 46, 62, 69, 72, 84].
- *розгалужені макромолекули, або дендримери*. Найрозповсюдженішим полімером, що застосовується для цих цілей, є поліамідоамін [30, 59].

Полімерні наночастинки можна класифікувати за походженням на **природні** (біополімери) та **синтетичні**.

Активно використовуються як системи доставки біополімери: білки та полісахариди. Їхні переваги полягають у високій біосумісності, здатності до деградації в організмі та подальшого виведення, подібності до позаклітинного матриксу. Полімери виступають у ролі своєрідних «скелетів», або «каркасів», переносячи активні біомолекули, такі як фактор росту, нестероїдні протизапальні засоби, кортикостероїди. Основними природними полімерами у системах доставки ліків є колаген, желатин, фібрин, хітозан, альгінат тощо [65]. Синтетичні полімери відкривають ширші можливості для модифікації структури, контрольованого вивільнення та розподілу в органах і тканинах. Дендримери – одні з найперспективніших носіїв серед вищезазначених полімерних носіїв. Вони здатні переносити молекули діючої речовини як всередині, так і адсорбовані на своїй поверхні. Структура дендримерів добре визначена [56] і може контролюватись у процесі синтезу. На сьогодні ЛЗ на їх основі для лікування генітального герпесу й інфекції вірусу імунодефіциту людини вже проходять заключний етап клінічних випробувань [30].

До нанофармацевтичних протиракових засобів висувають додаткові вимоги:

- після прийому вони мають проникати через фізіологічні бар'єри з мінімальною втратою активності та зниженням концентрації у крові;
- після потрапляння до тканини мають селективно нівелювати ракові клітини, не впливаючи на нормальні клітин;
- їх розміри мають бути достатньо великими, щоб запобігти раптовому проникненню через судини й уникнути токсичних ефектів, і водночас достатньо малими для того, щоб не затримуватись у ретикулоендотеліальній системі печінки та нирок, а також не бути захопленими макрофагами. Зокрема, для хіміотерапії злоякісних пухлин їх розміри не мають перевищувати 100 нм;
- поверхня наночастинок для доставки ЛЗ має бути гідрофільною, щоб уникати захоплення макрофагами [25, 51].

Незважаючи на низку переваг, є також певні недоліки, пов'язані зі складністю контролю за синтезом полімерів [65].

**Системи внутрішньоклітинної доставки ЛЗ та генна терапія.** Однією з ключових проблем доставки ліків є внутрішньоклітинний транспорт ЛЗ. Цей процес утруднений кількома факторами: неспецифічність носіїв або їх нездатність проникнути

крізь клітинну мембрану, лізосомальний гідроліз ЛЗ (пептидів, нуклеїнових кислот), що проникли ендцитотичним шляхом. Вирішенням цієї проблеми є застосування так званих пептидів, що проникають у клітину (cell penetrating peptides, CPP), вперше виявлених у вірусі імунодефіциту людини. Ці пептиди здатні переносити приєднані до них молекули гідрофільних ЛЗ через клітинну мембрану шляхом пептидної трансдукції. Молекули поділяють на три класи: похідні природних білків різних організмів (TAT-пептид), модельовані пептиди (отримані поєднанням двох пептидів із джерел різного походження, наприклад, вірусу імунодефіциту людини та SV40) і синтетично отримані поліаргініни. Для цих молекул описано кілька механізмів проникнення у клітину поза гідролізом лізосомальними ферментами [85]. Інший спосіб уникнення лізосомального руйнування описано у статті L. M. Vareford та P.W. Swaan (2007). Цей механізм полягає у навантаженні лізосом фоточутливими речовинами перед введенням ЛЗ. Після злиття ендосоми з діючою речовиною та лізосоною клітини опромінюють, а фоточутливі речовини утворюють реакційноздатні сполуки, що окиснюють мембрану лізосом. Мембрана руйнується, вивільняючи у цитоплазму молекули діючої речовини. Такий підхід можна застосувати у лікуванні ракових захворювань. Можливе також ковалентне сполучення вищезазначених проникаючих у клітину пептидів із молекулами ПЕГ, які екранують їх від зв'язування із клітинною мембраною через залишок гідразону. Гідразон при значеннях рН 5,0–6,0 руйнується, звільняючи тим самим молекулу CPP від «екрана» ПЕГ і даючи можливість взаємодіяти з клітинною мембраною. Завдяки цьому стає можливим контрольований внутрішньоклітинний транспорт ЛЗ [14, 85].

Велику увагу слід приділяти також токсикологічному аспекту використання наночастинок, який вивчено недостатньо. Відомо, що реакція імунної системи на наночастинок залежить від їхніх розмірів. Зокрема, наночастинок з діаметром  $\geq 200$  нм сильніше активують систему комплементу і швидше елімінуються із кровоносної системи. Вважається також, що зі зменшенням діаметра наночастинок зростає її токсичність унаслідок збільшення питомої поверхні. Це, в свою чергу, приводить до активізації окисно-відновних процесів, у яких беруть участь атоми наночастинок, і утворення вільних радикалів. Одним із напрямів використання наночастинок може стати доставка антигенів для вакцинації чи специфічної активації Т-клітинного імунітету [35]. Слід також відзначити статтю [33], присвячену етичним аспектам наномедицини. Висвітлюється проблема токсичності, неконтрольованого самозбирання та потреба контролю функцій наночастинок, які використовуються для доставки ліків.

Таким чином, дослідження щодо СДЛ дають змогу розробити нові лікарські препарати, які мають кращі фармакологічні, фізико-хімічні та фармацевтичні властивості, ніж традиційні. На жаль, недостатньо вивченим є токсикологічний аспект застосування цих нових препаратів. Незважаючи на те, що розробка наноносіїв стикається із певними труднощами, подальші досягнення у клітинній біології, нанотехнологіях і наномедицині дають змогу вирішити ці проблеми [2].

**Використання ПЕГ як носіїв для доставки ліків.** СДЛ з використанням полімерних носіїв, які ковалентно зв'язуються з досліджуваними молекулами, відіграє важливу роль у сучасній терапії [60, 90].

При доставці ліків найчастіше використовують неіонний полімер ПЕГ [60]. Через свою високу розчинність у воді полімер ПЕГ вважається універсальним кандидатом на зв'язування з проліками (хімічно модифіковані форми речовин, які в біосередовищах організму внаслідок метаболічних процесів перетворюються на ЛЗ). Як відомо, пегілювання

(тобто ковалентне приєднання ПЕГ пептидів білків, ліків і біологічно активних речовин) підвищує розчинність гідрофобних лікарських засобів у воді, продовжує час циркуляції, мінімізує неспецифічне поглинання і забезпечує конкретне цільове фокусування пухлини через ефект підвищеної проникності й ефект утримання (EPR-ефект). Ці властивості, за якими молекули певних розмірів, зазвичай ліпосоми, наночастинки та макромолекулярні лікарські речовини мають тенденцію до акумулювання у тканині пухлини [32, 67, 88]. EPR-ефект має важливе значення у доставці наночастинок і ліпосом до ракових клітин [64]. Він допомагає у перенесенні наночастинок та у поширенні (розповсюдженні) всередині тканини пухлини. Були розроблені численні терапії на основі використання ПЕГ, і декілька з них отримали визнання на ринку. Багато досвіду було накопичено в клініці, що допомогло розробити ПЕГ-пролікарські кон'югати з покращеною терапевтичною дією і пониженою системною токсичністю.

У 1975 р. було вперше запропоновано раціональну модель для фармакологічно-активних полімерів [76]. Ідеальна модель проліків зазвичай складається з кількох компонентів (рис. 1) [82]:

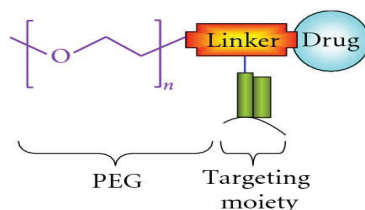


Рис. 1. Схематичне зображення проліків на основі ПЕГ із цільовим агентом [82]: PEG – полімер як носій; Drug – лікарський засіб, пептид або білок як біологічно активний компонент; Targeting moiety – молекула або цільовий фрагмент.

Ковалентне приєднання ПЕГ до досліджуваних молекул відіграло роль у встановленні системи доставки проліків [37, 49]. Пегілювання було вперше відкрито Девісом і Обуховським у 1970-х роках для модифікації альбуміну і каталази. Після цього була розроблена і значно розширена процедура пегілювання [6, 7, 31, 45, 53, 70, 81]. Властивості біологічно інертних (біосумісних) ПЕГ-вмісних полімерів походять від їх гідрофільності і гнучкості. Вважається, що ПЕГ є дещо гідрофобною речовиною через його розчинність у багатьох органічних розчинниках.

Як правило, більшість проліків на основі ПЕГ були розроблені для доставки протипухлинних агентів, таких як паклітаксел, метотрексат і цисплатин. Для зменшення побічних ефектів і отримання більш конкретного контролю ЛЗ до тканин пухлини [61] були розроблені високомолекулярні проліки, що містять цитотоксичні компоненти. Ймовірно, макромолекулярні протипухлинні проліки є стабільними у кровотоці й мають деградувати лише після досягнення клітини-мішені, або тканини. Тому ПЕГ-пролікарські сполуки можна застосувати для активації зовнішньо- або внутрішньоклітинними ферментами, вивільняючи лікарську речовину *in situ* (рис. 2) [76].

ПЕГ-модифікація пептидних препаратів, що запропонувала серйозні зміни в результаті лікування, намітила сьогодні великі перспективи при таких захворюваннях, як ферментні дефіцити, лейкемія, хронічні запальні захворювання, онкологія, хронічні вірусні інфекції, кардіоваскулярна патологія. Пегілювання лікарських препаратів пептидної структури має низку вагомих і безсумнівних переваг, які раніше були просто неможливими при використанні нативних аналогів: посилення біологічної активності, подовження періоду

“ефективного” напівжиття, сповільнення виведення, відсутність піків плазмової/тканинної концентрації, пониження токсичності й імуногенності. Проте було б невірним вважати, що пегілювання – це лише позитивний результат, а ПЕГ-кон’югати мають самі лише переваги перед нативними пептидами. До основних недоліків ПЕГ-кон’югованих пептидів, що використовуються у клінічних випробуваннях і як уже дозволені лікарські форми можна віднести: можливе зменшення активності білка, пов’язане з вибором «неправильного» розміру чи структури ПЕГ; з тою ж причиною може бути пов’язане і можливе подовження елімінації пептиду. Так чи інакше, отримані результати уже проведених досліджень і клінічних випробувань, що продовжуються з ПЕГ-модифікованими препаратами білкової структури, а також експериментальні дані свідчать про явну перевагу кон’югованих аналогів порівняно з нативними пептидами. Сам же напрям створення і використання ПЕГ-модифікованих білків, без перебільшення, можна вважати новацією, кінцеві можливості якої ще належить оцінити спеціалістам різних напрямів медичної науки.

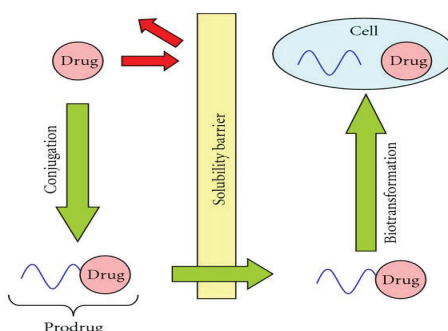


Рис. 2. Схематичне зображення концепції проліків [76]: Drug – лікарський засіб; Prodrug – проліки – хімічно модифікована форма лікарського засобу (ефір, сіль, сіль ефіру), що в біосередовищах у результаті метаболічних процесів перетворюється в саму лікарську речовину; Conjugation – кон’югація; Solubility barrier – біологічний бар’єр; Biotransformation – біотрансформація; Cell – клітина.

**Властивості ПЕГ і конструювання наноносія.** ПЕГ у найбільш загальній формі представлений лінійним або розгалуженим поліефіром із гідроксильними групами. ПЕГ синтезований аніонною полімеризацією етилен оксиду, ініційованою нуклеофільною атакою епоксидного кільця гідроксид-іонами. Найбільш корисним для поліпептидної модифікації є монометокси-ПЕГ (м-ПЕГ) (рис. 3).

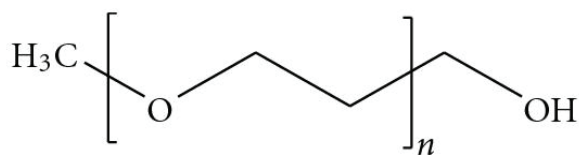


Рис. 3. Молекулярна структура монометокси-ПЕГ [76].

З іншого боку, м-ПЕГ синтезується шляхом аніонної полімеризації відкритого кільця, ініційованого метоксид іонами. Успішне зв’язування ПЕГ з біомолекулами залежить від хімічної структури, молекулярної маси, стеричних перешкод і реакційної здатності як біомолекули, так і полімеру. Для того, щоб синтезувати біологічну сполуку, обидві хімічні речовини (наприклад, біологічно активна речовина та полімер) мають володіти функціо-



нальною групою, такою як  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{OH}$ ,  $-\text{SH}$  або  $-\text{NH}_2$ . Таким чином, методика формування кон'югату включає в себе захист зняття захисту груп.

Одним із найважливіших параметрів молекул, модифікованих ПЕГ, є їх гідрофільність, яка формує принципово нові фізико-хімічні властивості зміненого пептиду. Велика концентрація атомів водню навіть в одній молекулі ПЕГ дає їй змогу зв'язуватися з 2-3 молекулами води. Подібна гідратація призводить до формування "водяної хмари" навколо модифікованої молекули ПЕГ+білок, за рахунок цього значно підвищується її гідродинамічний радіус [29, 42]. Ця гідратаційна оболонка, з одного боку, значно підвищує розчинність і біодоступність препарату, а з іншого боку – захищає молекулу від інших білків (нейтралізуючі антитіла, комплемент) [47]. Таким чином ПЕГ-модифіковані пептиди більш захищені від активного фаго- та ендцитозу клітинних структур макроорганізму. Довші ланцюги ПЕГ обумовлюють більшу тривалість періоду напівжиття кон'югату "ПЕГ-пептид" та його фармакологічну стабільність. Ще одним важливим фактором, який впливає на фармакодинаміку та фармакокінетику ПЕГ-модифікованих пептидів, є структура ПЕГ-ланцюгів: розгалужена молекула ПЕГ формує уповільнення активного метаболізму препарату, що також призводить до збільшення часу активної циркуляції препарату у крові. Із розгалуженим ланцюгом ПЕГ також пов'язана і значно менша імуногенність модифікованих препаратів при зберіганні їх фармакологічних властивостей [34]. Подібні ефекти можуть бути досягнуті також іншим шляхом – зв'язуванням пептиду не з однією молекулою ПЕГ, а з кількома, які мають лінійну структуру. Достатньо вивченим прикладом у цьому зв'язку є молекула інтерлейкіну-2 [42].

Хімічна кон'югація лікарських речовин чи інших біомолекул із полімерами та їх модифікаціями можуть утворювати стабільні зв'язки, такі як ефірні, амідні (пептидні) та дисульфідні. Отриманий зв'язок має бути відносно стабільним для того, щоб запобігти вивільненню лікарського засобу під час його транспортування та досягнення цілі. Ковалентні зв'язки (наприклад, ефірні чи амідні) є порівняно стійкі, вони можуть доставити препарат у цільову мішень. Тим не менш, у деяких випадках такі зв'язки не зовсім легко звільняють цільові сполуки і пептиди під впливом прийнятних змін навколишнього середовища [78]. Тому комплекс ПЕГ - лікарський засіб може бути адаптований для вивільнення вихідної лікарської речовини *in situ* активацією зовнішньо- чи внутрішньоклітинними ферментами або зміною рН.

ПЕГ має обмежену кон'югаційну здатність, оскільки містить лише одну (дві у разі модифікації поліетиленгліколів) кінцеву функціональну групу на кінці полімерного ланцюга. Для подолання цього обмеження було запропоновано зв'язування амінокислот, таких, як дикарбонові амінокислоти й аспарагінова кислота з ПЕГ [26, 27]. Такі дериватизації збільшують кількість активних груп вихідної молекули ПЕГ.

**Клінічне застосування речовин на основі ПЕГ.** До ПЕГ-кон'югатів, що мають клінічне використання у практиці, належать:

- **адаген** – це один із перших ПЕГ-білкових кон'югатів, що ввійшли у клінічну практику [28]. Застосовується для лікування важкого комбінованого імунодефіциту (ВКІ). ВКІ є аутосомно-рецесивним генетичним розладом, спричиненим дефіцитом аденозин деазмінази. Він зазвичай призводить до смерті у дітей, якщо пацієнт не перебуває в захисній ізоляції або не підлягає пересадці кісткового мозку. Як альтернатива, адаген вводять внутрішньом'язово кожні 7 днів. Це замісна терапія, і її повторюють до кінця життя пацієнтів, дотримуючись графіку дозування: 10 од. · кг<sup>-1</sup>, 15 од. · кг<sup>-1</sup> і 20 од. · кг<sup>-1</sup> для перших трьох доз і тижневої підтримуючої дози 20 од. · кг<sup>-1</sup>. Тим не менше, проблеми, пов'язані з імуні-

тетом, зареєстровані для пегадемази (важкий комбінований імунодефіцит при вродженій недостатності аденозин дезамінази, якщо трансплантація кісткового мозку неможлива), і її користь довготривалого лікування ще підлягає з'ясуванню [17, 20, 47].

- **онкаспар** (мПЕГ-L-аспарагіназа), або пегаспаргас – це протипухлинний лікарський засіб, ПЕГ-модифіковане похідне ферменту L-аспарагінази, застосовується для лікування гострого лімфобластного лейкозу [21]. Шляхом пегілювання зроблена спроба подолати декілька факторів, що обмежують корисність аспарагінази як терапевтичного засобу, таких як високе очищення, імунологічні фактори, а також інактивація в результаті конвертації в аспарагін через аспарагін синтетазу. Також імунологічні побічні ефекти, такі як гіперчутливість реакції (до 73%), були основними факторами, що обмежували клінічну корисність L-аспарагінази [57].

Пегаспаргас був розроблений у 1970–1980 рр., впроваджений в клінічних випробуваннях у 1980 р. [11, 43]. Клінічні дослідження продемонстрували безпеку з точки зору незначного падіння реакції гіперчутливості і тривалої дії. Випробування визначили різні протоколи (щотижня або кожні два тижні) та рецепти з режимом множинного застосування ліків для лікування різних злоякісних новоутворень [50].

- **мірцера** (активатор еритропоєтинових рецепторів або метоксиполіетиленгліколь-епоєтин бета) – хімічно синтезований активатор рецепторів еритропоєтину тривалої дії, ковалентний кон'югат білка, який синтезується шляхом використання технології рекомбінантної ДНК в клітинах яєчника китайського хом'яка, з лінійним ПЕГ. У даний час використовується для лікування ниркової анемії у пацієнтів із хронічною нирковою недостатністю. Пегілювання еритропоєтину продовжує період напіврозпаду приблизно до 130 год [63]. Дарбепоедин альфа (Aranesp) – це аналог еритропоєтину, який стимулює продукцію червоних кров'яних клітин. У зв'язку з включенням амінокислотної мутації має більш високу швидкість глікозилювання і, отже, потребує раз на один або на два тижні ін'єкцій.

- **пегасис** (пегінтерферон альфа-2а) – це лікарська речовина, яка використовується для лікування хронічного гепатиту С, окремо, або в комбінації з антимікробним рибавірином. Пегасис складається з ПЕГ-інтерферону альфа-2а, призначеного опосередковувати противірусну імунну відповідь. Пегільований інтерферон продемонстрував більш високу ефективність, збільшуючи час кліренсу білка, що дає змогу підтримувати рівень концентрації інтерферону в крові для контролю хронічного гепатиту С. Клінічні дослідження пегасиса показали, що 180 мкг пегінтерферону альфа-2а, при вживанні один раз на тиждень у пацієнтів з гепатит С-пов'язаним цирозом або фіброзом були значно ефективнішими, ніж 3 млн одиниць стандартного інтерферону альфа-2а [38, 74, 92].

- **ПЕГ-інтрон** (пегінтерферон альфа-2b) [66] застосовується для дезактивації вірусної інфекції гепатиту С. ПЕГ кон'югування з  $\alpha$ -інтерфероном було схвалено FDA для використання у 2001 р. Рекомендоване дозування для автономної ПЕГ-інтрон терапії становить 1 мг/кг на тиждень протягом 52 тижнів [22, 66]. Тим не менш, у деяких дослідженнях припускають, що пегінтерферон  $\alpha$ -рибавірин комбінована терапія має більш високий ризик нейтропенії і тромбоцитопенії, ніж інтерферон  $\alpha$ -рибавірин [13, 58], хоча обидва види терапії, як повідомлялося, мають подібні побічні ефекти.

- **сомаверт** (пегвісомант) – це кон'югат, що використовується для лікування акромегалії, не даючи гормоніві росту людини (ГР) зв'язуватися з його рецептором, оскільки це зв'язування активує сигнальні шляхи, які ведуть до генерації інсулінозалежного фактора росту-1. Це генетично сконструйований аналог ГР, кон'югований з ПЕГ, який був ухвалений для використання з 2003 р. [8]. Акромегалія – це хронічне порушення обміну речовин,



що спричинюється при виробленні гіпофізом надлишку ГР після закриття епіфізарних пластинок. Пегвісомант інгібує димеризацію рецептора ГР через його підвищену афінність до сайту 1 рецептора ГР [8]. Загалом, пегілювання знижує активність антагоніста рецептора гормона росту. Тим не менш, 4–6 ПЕГ-5000 фрагменти, які додаються до пегвісоманту, продовжують термін його напіврозпаду і дають можливість вживати його один раз на день, оскільки швидкість виведення з організму значно знижується, що робить його ефективним засобом для лікування акромегалії [73]. Рекомендоване дозування для пацієнтів починається з підшкірного введення дози 40 мг. Пацієнт може самостійно вводити 10 мг соматерту щодня з корективою у дозуванні в 5 мг, збільшуючи дозу залежно від підвищення або зниження інсулінового фактора росту-1 [86, 87]. Однак, оскільки пегвісомант може збільшити толерантність до глюкози, призначають догляд за хворими на цукровий діабет.

- **невласта** (пегфілграстим) – кон'югат утворений з 20 кДа лінійного монометокси-ПЕГ альдегіду та гранулоцитарним макрофагальним колонієстимулюючим фактором G-CSF [68]. Невласта використовується для пригнічення інфекції фебрильної нейтропенії (нейтропенічної лихоманки) і була ухвалена для використання у 2002 році. Пегілювання збільшує період напіврозпаду білкової сироватки до 42 год порівняно з напіврозпадом сироватки 3,5-3,8 годин для немодифікованого G-CSF. Таким чином, загальна доза зводиться до однієї дози циклу, котрий є настільки ж ефективним, як щоденна доза G-CSF [44, 68, 89]. Рекомендована доза невласти – одноразове підшкірне введення 6 мг один раз за цикл хіміотерапії [91].

- **критекса** (пеглотиказа) – пегілювана уратоксидаза ссавців (уриказа) [79]. Це рекомбінантна тетрамерна уратоксидаза, що використовується для лікування хронічної подагри. Пеглотиказа запобігає запаленню та болю через утворення уратних кристалів у плазмі. Перевага критекси над іншими стандартними методиками – це вища ефективність у лікуванні подагри [48]. Тим не менше, пеглотиказа є імуногенною, оскільки показано, що підшкірні та внутрішньовенні ін'єкції пеглотикази в клінічних випробуваннях стимулювали синтез антитіл [39, 55, 83]. Проте було встановлено, що продукування антитіл було обумовлено ПЕГ, а не уриказою. Крім того, пероксид водню може бути отриманий у процесі перетворення сечової кислоти в алантоїн уриказою, необхідно встановити довгостроковий захист пеглотикази. Перехідний локальний біль, повільне поглинання, алергічні реакції, викликані підшкірними ін'єкціями пеглотикази, не спостерігалися після внутрішньовенних ін'єкцій. Тим не менш, внутрішньовенні ін'єкції є незручними при введенні самому собі та можуть викликати інфузійні реакції у мультидозових випробуваннях [19, 80, 93].

На кафедрі органічної хімії «Львівської політехніки» здійснено синтез нового ряду біологічно толерантних поліетиленглікольовмісних олігомерних носіїв і нанорозмірних систем доставки антимікробних та протипухлинних препаратів в орган-мішень на основі олігомерів з бічними пероксидними й епоксидними групами [3]. Бінарні кополімери поєднують у своїй структурі пероксидні групи, здатні до утворення вільних радикалів у заданому температурному діапазоні, та епоксидні групи, що забезпечують взаємодію з поліоксиетиленгліколями, спиртами, амінами й іншими сполуками, зокрема, продуктами природного походження, які містять рухливий атом водню.

З метою створення розчинних у воді олігомерних носіїв, а також покращення проникності їхніх кон'югатів із ліками крізь клітинну мембрану, в молекули введено гідрофільний монозаміщений поліетиленгліколь (м-ПЕГ), молекулярною масою 750 г/моль.

Полімерний гребенеподібний ПЕГ-вмісний носій є кополімером 2-трет-бутилперокси-2-метил-5-гексен-3-ін (ВЕП) і гліцидил метакрилату (ГМА), модифікованого монометиловим етером поліетиленгліколю (мПЕГ)-полі-(ВЕП-ГМА)-графт-мПЕГ [4].

Кополімери ВЕП-ГМА містять контрольовану кількість реакційно здатних пероксидних і епоксидних фрагментів, добре розчиняються у полярних органічних розчинниках, але є нерозчинними у воді, що обмежує їхнє використання як носіїв для лікарських препаратів.

**Полімерний носій ВЕП-ГМА-ПЕГ і його використання.** Відомо, що амфифільні ПЕГ-вмісні полімери у водних розчинах утворюють міцелоподібні структури. Важливою для таких міцел є їх здатність солубілізувати погано розчинні ліки, підвищуючи їх біосумісність. Окрім того, перебуваючи у кон'югованій міцелярній формі, лікарські речовини захищені від можливих взаємодій із навколишнім біологічним середовищем, тому можуть довше перебувати в організмі, не втрачаючи стабільності, накопичуватись в органі-мішені та не спричиняти небажаних побічних ефектів [41].

Застосування спеціальних носіїв для доставки лікарських препаратів у клітини-мішені може допомогти подолати цілу низку проблем, що виникають при лікуванні тяжких захворювань, у першу чергу ракових. Це – негативні наслідки неспецифічного впливу ліків на здорові клітини організму, низька чутливість ракових клітин до деяких протипухлинних препаратів, використаних у нетоксичній для організму дозі, резистентність клітин злоякісних пухлин до хіміотерапевтичних чинників і резистентність патогенних мікроорганізмів до антибіотиків. У роботі [5] було досліджено ефективність застосування нової нанорозмірної системи доставки ліків у клітини пухлин, як чутливих, так і резистентних до дії протипухлинних препаратів, зокрема доксорубіцину.

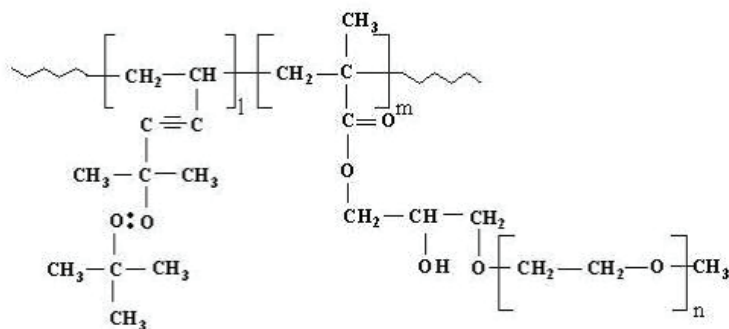


Рис. 4. Хімічна структура полімеру (VEP-GMA)-graft-mPEG.

Для цього використовували модифікований поліетиленгліколем полімерний носій ВЕП-ГМА, синтезований на кафедрі органічної хімії Національного університету «Львівська політехніка» (рис. 4).

Показано, що доксорубіцин, іммобілізований на такому носії, значно сильніше, ніж вільний доксорубіцин, пригнічує проліферацію клітин лінії A549 карциноми легені людини, лінії HCT116 колоректальної карциноми людини, лінії MCF-7 та її резистентної до доксорубіцину сублінії MCF-7/ADR карциноми молочної залози людини. Застосування полімерного носія ВЕП-ГМА-ПЕГ дало змогу знизити діючу дозу доксорубіцину щонайменше у 10 разів зі збереженням антинеопластичного ефекту цього препарату, що передбачає суттєве зменшення негативних побічних ефектів такої хіміотерапії. Встановлено пришвидшене поглинання пухлинними клітинами доксорубіцину у складі транспортного комплексу з носієм, порівняно з поглинанням його вільної форми. Показано, що макрофіноцитоз чи ендодитоз не задіяні у поглинанні клітинами таких комплексів доксорубіцину з полімерним носієм. Проводяться роботи з подальшого вдосконалення

створеного нанорозмірного полімерного носія шляхом його додаткової функціоналізації з метою підвищення адресності його дії на пухлинні клітини *in vitro* та *in vivo*.

Результати даного експерименту показали, що ні колхіцин, ні цитохалазин Б не впливають на інтенсивність поглинання комплексу доксорубіцину з полімерним носієм пухлинними клітинами лінії MCF-7. Звідси можна припустити, що полімерний компонент даного комплексу, що містить у своїй структурі ПЕГ, допомагає доксорубіцину ефективно долати таку біологічну перешкоду, як плазматична мембрана клітини. Очевидно, така інкапсуляція робить доксорубіцин недоступним для мембранних транспортерів ABC, які забезпечують клітинам резистентність до різних ксенобіотиків, у т.ч. протипухлинних препаратів. Оскільки доксорубіцин у вільному стані майже не нагромаджувався пухлинними клітинами ліній A549 та MCF-7/ADR, на відміну від його суттєвого нагромадження в цих клітинах за дії на них комплексів доксорубіцину з полімерним носієм, можна вважати, що такий носій допомагає цьому препаратів долати наявну в даних клітинах систему, котра забезпечує множинну резистентність до ліків.

Одержані в роботі результати свідчать про те, що доставка доксорубіцину в пухлинні клітини-мішені за допомогою синтезованих нанорозмірних полімерів класу AP із вбудованим у їхню структуру поліетиленгліколем дає змогу суттєво (у 10 разів) знизити ефективну діючу концентрацію цього протипухлинного препарату зі збереженням його цитотоксичного ефекту. Отже, завдяки застосуванню таких носіїв можна значно знизити дозу протипухлинних препаратів, які характеризуються сильною побічною токсичністю для і без того ослабленого організму пацієнта, що піддається хімотерапії. Полімерний носій ВЕП-ГМА-ПЕГ був синтезований на основі олігомерних сполук. На цих носіях було іммобілізовано протипухлинний препарат доксорубіцин, який широко використовують у клініці для хімотерапії пацієнтів із раковими захворюваннями.

Під час дослідження ізотерм поверхневого натягу розчинів носія та його кон'югату з доксорубіцином встановлено, що поверхнева активність кон'югату збільшується, а зменшення величини, при якій спостерігається перетин на ізотермі та який можна віднести до критичної концентрації утворення міцелоподібних гідрофобних зон, – про утворення достатньо стабільного поверхнево-активного кон'югату зі збільшенням гідрофобної складової внаслідок кон'югації. Утворення системи доставки, яка містить стабільний кон'югат, є дуже важливим, адже багато систем доставки ліків непридатні для використання через їхню нестабільність [54].

У разі збільшення кількості доксорубіцину в системі розмір частинок переважно зменшується, очевидно, внаслідок гідрофобізації та ущільнення міцелоподібних структур, які містять кон'юговану з носієм речовину, в результаті утворення водневих зв'язків. Витіснення молекул води та утворення водневих зв'язків кисневих атомів фрагментів  $-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-$  поліетиленгліколевих ланцюгів носія призводить до гідрофобізації останніх і утворення гідрофобних міцелоподібних структур у розчині, стабілізованих іншими ПЕГ ланцюгами, які не задіяні в кон'югації з доксорубіцином.

Наявність фракції частинок у розчині полімерного носія та в системах, що містять його кон'югат із доксорубіцином, пояснюється, очевидно, як полідисперсністю вихідного кополімеру (коефіцієнт полідисперсності – 3,5), так і наявністю вторинних структур, утворюваних молекулами носія або кон'югатів у результаті їх агрегації [3].

Також у роботах [4] було показано, що синтезований на основі олігопероксиду з бічними епоксидними групами ПЕГ-вмісний олігомер є водорозчинною поверхнево-активною речовиною, здатною іммобілізувати не розчинний у воді антибіотик левоміцетин

і утворювати нанорозмірні водні системи його цільової доставки, які забезпечують підвищену антимікробну активність препарату.

Таким чином, на основі літературних даних можна вважати перспективною розробку нових стабільних нанорозмірних систем доставки лікарських речовин в орган-мішень на основі ПЕГ, який має унікальні властивості, що забезпечить новий підхід у профілактиці та лікуванні багатьох захворювань.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Головенко М., Ларіонов В. Адресна доставка наносистемами лікарських засобів до головного мозку // Вісн. фармакології та фармації. 2008. Т. 4. С. 8–16.
2. Прискока А. О., Чекман І. С. Нанотехнології у розробці систем доставки лікарських засобів // Укр. мед. часопис. 2010. Т. 75. № 1. С. 14–18.
3. Рябцева А., Мітіна Н., Гаврилюк Д. та ін. Нанорозмірні системи доставки протиракових препаратів, іммобілізованих на поліетиленглікольвмісному полімерному носії // Вісн. Нац. ун-ту «Львів. політехніка». 2012. № 726. С. 377–383.
4. Рябцева А., Остапчук Ю., Мітіна Н. та ін. Поліетиленглікольвмісні олігомерні носії та нанорозмірні системи доставки антимікробних речовин на їх основі // Вісн. Нац. ун-ту «Львів. політехніка». 2011. № 700. С. 367–373.
5. Сеньків Ю., Рябцева А., Хеффетер П. та ін. Іммобілізація доксорубіцину на олігоелектролітному полімерному носії ВЕП-ГМА-ПЕГ підвищує швидкість надходження цього протипухлинного препарату в ракові клітини та ефективність його цитотоксичної дії // Біологічні Студії. 2012. Т. 6. № 2. С. 5–16.
6. Abuchowski A., McCoy J. R., Palczuket N. C. et al. Effect of covalent attachment of polyethylene glycol on immunogenicity and circulating life of bovine liver catalase // J. Biol. Chem. 1977. Vol. 252. N 11. P. 3582–3586.
7. Abuchowski A., Van Es T., Palczuket N. C., Davis F. F. Alteration of immunological properties of bovine serum albumin by covalent attachment of polyethylene glycol // J. Biol. Chem. 1977. Vol. 252. N 11. P. 3578–3581.
8. Alconcel S. N. S., Baas A. S., Maynard H. D. FDA-approved poly(ethylene glycol)-protein conjugate drugs // Polymer Chemistry. 2011. Vol. 2. N 7. P. 1442–1448.
9. Alexis F., Pridgen E., Molnar L. K., Farokhzad O. C. Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles // Mol. Pharm. 2008. N 5. P. 505.
10. Avgoustakis K. Pegylated poly(lactide) and poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles: preparation, properties and possible applications in drug delivery // Curr. Drug Deliv. 2004. Vol. 1. N 4. P. 321–333.
11. Avramis V. I., Tiwari P. N. Asparaginase (native ASNase or pegylated ASNase) in the treatment of acute lymphoblastic leukemia // Int. J. Nanomedicine. 2006. Vol. 1. N 3. P. 241–254.
12. Bailey M. M., Berkland C. J. Nanoparticle formulations in pulmonary drug delivery // Med. Res. Rev. 2009. Vol. 29. N 1. P. 196–212.
13. Bailon P., Palleroni A., Schaffer C. A. et al. Rational design of a potent, long-lasting form of interferon: a 40 kDa branched polyethylene glycol-conjugated interferon  $\alpha$ -2a for the treatment of hepatitis C // Bioconjugate Chem. 2001. Vol. 12. N 2. P. 195–202.
14. Bareford L.M., Swaan P.W. Endocytic mechanisms for targeted drug delivery // Adv. Drug Deliv. Rev. 2007. Vol. 59. N 8. P. 748–758.
15. Barry R. L. PEG as a tool to gain insight into membrane fusion // Eur. Biophys. J. 2007. Vol. 36. N 4–5. P. 315–326.

16. *Batrakova E. V., Vinogradov S. E., Robinson S. M.* et al. Polypeptide point modifications with fatty acid and amphiphilic block copolymers for enhanced brain delivery // *Bioconjugate Chem.* 2005. Vol. 16. N 4. P. 793–802.
17. *Bax B. E., Bain M. D., Fairbanks L. D.* et al. In vitro and in vivo studies with human carrier erythrocytes loaded with polyethylene glycolconjugated and native adenosine deaminase // *British J. Haematology.* 2000. Vol. 109. N 3. P. 549–554.
18. *Béduneau A., Hindré F., Clavreul A.* et al. Brain targeting using novel lipid nanovectors // *J. Control. Release.* 2008. Vol. 126. N 1. P. 44–49.
19. *Biggers K., Scheinfeld N.* Pegloticase, a polyethylene glycol conjugate of uricase for the potential intravenous treatment of gout // *Curr. Opin. Investig. Drugs.* 2008. Vol. 9. N 4. P. 422–429.
20. *Booth C., Hershfield M., Notarangelo L.* et al. Management options for adenosine deaminase deficiency; proceedings of the EBMT satellite workshop // *Clin. Immunol.* 2007. Vol. 123. N 2. P. 139–147.
21. *Broome J. D.* Evidence that the L-asparaginase activity of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects // *Nature.* 1961. Vol. 191. N 4793. P. 1114–1115.
22. *Bukowski R. M., Tendler C., Cutler D.* et al. Treating cancer with PEG intron: pharmacokinetic profile and dosing guidelines for an improved interferon-alpha-2b formulation // *Cancer.* 2002. Vol. 95. N 2. P. 389–396.
23. *Caruthers S. D., Wickline S. A., Lanza G. M.* Nanotechnological applications in medicine // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2007. Vol. 18. N 1. P. 26–30.
24. *Chen H., Kim S., He W.* et al. Fast release of lipophilic agents from circulating PEG-PDLLA micelles revealed by in vivo forster resonance energy transfer imaging // *Langmuir.* 2008. Vol. 24. N 10. P. 5213–5217.
25. *Cho K., Wang X., Nie S.* et al. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer // *Clin. Cancer Res.* 2008. Vol. 14. N 5. P. 1310–1316.
26. *Choe Y. H., Conover C. D., Wu D.* et al. Anticancer drug delivery systems: N4-acyl poly(ethylene glycol) prodrugs of ara-C: I. Efficacy in solid tumors // *J. Control. Release.* 2002. Vol. 79. N 1–3. P. 41–53.
27. *Choe Y. H., Conover C. D., Wu D.* et al. Anticancer drug delivery systems: multi-loaded N4-acyl poly(ethylene glycol) prodrugs of ara-C. II. Efficacy in ascites and solid tumors // *J. Control. Release.* 2002. Vol. 79. N 1–3. P. 55–70.
28. US Patent 4179337. Non-immunogenic polypeptides / *Davis F. F., Van Es T., Palczuk N. C.* 1979.
29. *Delgado C., Francis G. E., Fisher D.* The uses and properties of PEG - linked proteins // *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 1992. Vol. 9. N 3–4. P. 249–304.
30. *Domalia T. A., Reyna L. A., Svenson S.* Dendrimers as multi-purpose nanodevices for oncology drug delivery and diagnostic imaging // *Biochem. Soc. Trans.* 2007. Vol. 35. P. 61–67.
31. *Dreborg S., Akerblom E. B.* Immunotherapy with monomethoxypolyethylene glycol modified allergens // *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 1990. Vol. 6. N 4. P. 315–365.
32. *Duncan R., Sat Y.-N.* Tumour targeting by enhanced permeability and retention (EPR) effect // *Annals Oncology.* 1998. Vol. 9. P. 39.
33. *Ebbesen M., Jensen T. G.* Nanomedicine: techniques, potentials, and ethical implications // *J. Biomed. Biotechnol.* 2006. Vol. 5. P. 1–11.
34. *Edwards C. K.* PEGylated recombinant human soluble tumor necrosis factor receptor type I (r - HU - sTNF - RI): novel high affinity TNF receptor designed for chronic inflammatory diseases // *Ann. Rheum. Dis.* 1999. Vol. 58. N 1. P. 173–181.



35. *Emerich D. F., Thanos C. G.* The pinpoint promise of nanoparticle-based drug delivery and molecular diagnosis // *Biomol. Eng.* 2006. Vol. 23. N 4. P. 171–184.
36. *Euliss L. E., DuPont J. A., Gratton S.* et al. Imparting size, shape, and composition control of materials for nanomedicine // *Chem. Soc. Rev.* 2006. Vol. 35. N 11. P. 1095–1104.
37. *Filpula D., Zhao H.* Releasable PEGylation of proteins with customized linkers // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2008. Vol. 60. N 1. P. 29–49.
38. *Fried M. W., Shiffman M. L., Rajender Reddy K.* et al. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection // *N. Engl. J. Med.* 2002. Vol. 347. N 13. P. 975–982.
39. *Ganson N. J., Kelly S. J., Scarlett E.* et al. Control of hyperuricemia in subjects with refractory gout, and induction of antibody against poly(ethylene glycol) (PEG), in a phase I trial of subcutaneous PEGylated urate oxidase // *Arthritis Research Therapy.* 2005. Vol. 8. N 1. R12.
40. *Garcia-Garcia E., Andrieux K., Gil S.* et al. Colloidal carriers and blood–brain barrier (BBB) translocation: A way to deliver drugs to the brain? // *Int. J. Pharm.* 2005. № 298. P. 274–292.
41. *Glen S. Kwon.* *Polymeric Drug Delivery Systems: Book.* Boca Raton: Taylor & Francis. 2005. 653 p.
42. *Glue P., Rouizer-Panis R., Raffanel C.* et al. A dose ranging study of pegylated interferon-alfa2b and ribavirin in chronic hepatitis C. The Hepatitis C Intervention Therapy Group // *Hepatology.* 2000. Vol. 32. N 3. P. 674–653.
43. *Graham M. L.* Pegaspargase: a review of clinical studies // *Advanced Drug Delivery Rev.* 2003. Vol. 55. N 10. P. 1293–1302.
44. *Green M. D., Koelbl H., Baselga J.* et al. On behalf of the International Pegfilgrastim 749 Study Group // *Annals Oncology.* 2003. Vol. 14. P. 29–35.
45. *Greenwald R. B.* Drug delivery systems: anticancer prodrugs and their polymeric conjugates // *Expert. Opin. Ther. Pat.* 1997. Vol. 7. N 6. P. 601–609.
46. *He G., Ma L.L., Pan J., Venkatraman S.* ABA and BAB type triblock copolymers of PEG and PLA: A comparative study of drug release properties and «stealth» particle characteristics // *Int. J. Pharm.* 2007. Vol. 334. N 1–2. P. 48–55.
47. *Hershfield M. S., Buckley R. H., Greenberg M. L.* Treatment of adenosine deaminase deficiency with polyethylene glycol-modified adenosine deaminase // *N. Engl. J. Med.* 1987. Vol. 316. N 10. P. 589–596.
48. *Hershfield M. S., Sundry J. S., Ganson N. J., Kelly S. J.* Development of PEGylated mammalian urate oxidase as a therapy for patients with refractory gout // *PEGylated Protein Drugs: Basic Science and Clinical Applications.* 2009. P. 217–227.
49. *Hinds K. D.* Protein conjugation, cross-linking, and PEGylation // *Biomaterials for Delivery and Targeting of Proteins and Nucleic Acids.* 2005. P. 119–185.
50. *Ho D. H., Brown N. S., Yen A.* Clinical pharmacology of polyethylene glycol-L-asparaginase // *Drug. Metab. Dispos.* 1986. Vol. 14. N 3. P. 349–352.
51. *Igarashi E.* Factors affecting toxicity and efficacy of polymeric nanomedicines // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2008. Vol. 229. N 1. P. 121–134.
52. *Ijeoma F. Uchehgbu.* *Polymers in drug delivery: Book.* CRC Press. 2006. P. 243.
53. *Inada Y., Furukawa M., Sasaki H.* et al. Biomedical and biotechnological applications of PEG- and PM-modified proteins // *Trend Biotech.* 1995. Vol. 13. N 3. P. 86–91.
54. *Jones M.C., Leroux J.C.* Polymeric micelles – a new generation of colloidal drug carriers // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 1999. N 48. P. 101–111.
55. *Jung S. K., DeLuca P. P., Kang C. L.* Emerging PEGylated drugs // *Expert Opin. Emer. Drug.* 2009. Vol. 14. N 2. P. 363–380.

56. *Kaneshiro T. D., Wang X., Lu Z. R.* Synthesis, characterization, and gene delivery of poly-L-lysine octa(3-aminopropyl) silsesquioxane dendrimers: Nanoglobular drug carriers with precisely defined molecular architectures // *Mol. Pharm.* 2007. Vol. 4. N 5. P. 759–768.
57. *Killander D., Dohlwitz A., Engstedt L.* Hypersensitive reactions and antibody formation during L-asparaginase treatment of children and adults with acute leukemia // *Cancer.* 1976. Vol. 37. N 1. P. 220–228.
58. *Kirkwood J. M., Ibrahim J. G., Sondak V. K.* et al. High-dose low-dose interferon alfa-2b in high-risk melanoma: first analysis of intergroup trial E1690/S9111/C9190 // *J. Clin. Oncol.* 2000. Vol. 18. N 12. P. 2444–2458.
59. *Kitchens K. M., Foraker A. B., Kolhatkar R. B.* et al. Endocytosis and interaction of poly(amidoamine) dendrimer with Caco-2 cells // *Pharm. Res.* 2007. Vol. 24. N 11. P. 2138–2145.
60. *Knop K., Hoogenboom R., Fischer D., Schubert U. S.* Poly(ethylene glycol) in drug delivery: pros and cons as well as potential alternatives // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2010. Vol. 49. N 36. P. 6288–6308.
61. *Kopecek J.* Synthesis of tailor-made soluble polymeric drug carriers // *Recent advances in Drug Delivery Systems.* 1984. P. 41–62.
62. *Kumar R., Chen M. H., Parmar V. S.* et al. Supramolecular assemblies based on copolymers of PEG600 and functionalized aromatic diesters for drug delivery applications // *J. Am. Chem. Soc.* 2004. Vol. 126. N 34. P. 10640–10644.
63. *Lea J. P., Norris K., Agodoa L.* The role of anemia management in improving outcomes for african-americans with chronic kidney disease // *Am. J. Nephrol.* 2008. Vol. 28. N 5. P. 732–743.
64. *Maeda H.* Macromolecular therapeutics in cancer treatment: The EPR effect and beyond // *J. Control. Release.* 2012. Vol. 164. N 2. P. 138–144.
65. *Malafaya P. B., Silva G. A., Reis R. L.* Natural-origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2007. Vol. 59. N 4–5. P. 207–233.
66. *Manns M. P., McHutchison J. G., Gordon S. C.* et al. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial // *Lancet.* 2001. Vol. 358. N 9286. P. 958–965.
67. *Matsumura Y., Maeda H.* A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumor-tropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs // *Cancer Research.* 1986. Vol. 46. N 12. Part 1. P. 6387–6392.
68. *Molineux G.* The design and development of pegfilgrastim (PEG-rmetHuG-CSF, Neulasta) // *Current Pharmaceutical Design.* 2004. Vol. 10. N 11. P. 1235–1244.
69. *Oh K. T., Bronich T. K., Bromberg L.* et al. Block ionomer complexes as prospective nanocontainers for drug delivery // *J. Control. Release.* 2006. Vol. 115. N 1. P. 9–17.
70. *Okahata Y., Mori T.* Lipid-coated enzymes as efficient catalysts in organic media // *Trends. Biotechnol.* 1997. Vol. 15. N 2. P. 50–54.
71. *Otsuka H., Nagasaki Y., Kataoka K.* PEGylated nanoparticles for biological and pharmaceutical applications // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2003. Vol. 55. N 3. P. 403–419.
72. *Pai A. S., Rubinstein I., Onyuksel H.* PEGylated phospholipid nanomicelles interact with b-amyloid (1–42) and mitigate its b-sheet formation, aggregation and neurotoxicity *in vitro* // *Peptides.* 2006. Vol. 27. N 11. P. 2858–2866.
73. *Parkinson C., Scarlett J. A., Trainer P. J.* Pegvisomant in the treatment of acromegaly // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2003. Vol. 55. N 10. P. 1303–1314.

74. *Rajender Reddy K., Modi M. W., Pedder S.* Use of peginterferon alfa-2a (40 KD) (Pegasys) for the treatment of hepatitis C // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2002. Vol. 54. N 4. P. 571–586.
75. *Rensen P. C., de Vruueh R. L., Kuiper J.* et al. Recombinant lipoproteins: lipoprotein-like lipid particles for drug targeting // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001. Vol. 47. N 2–3. P. 251–276.
76. *Ringsdorf H.* Structure and properties of pharmacologically active polymers // *J. Polymer Sci. Part C.* 1975. N 51. P. 135–153.
77. *Sapra P., Tyagi P., Allen T. M.* Ligand-targeted liposomes for cancer treatment // *J. Curr. Drug Deliv.* 2005. Vol. 2. N 4. P. 369–381.
78. *Satchi-Fainaro R., Wrasidlo W., Lode H. N.* et al. Synthesis and characterization of a catalytic antibody-HPMA copolymer-conjugate as a tool for tumor selective prodrug activation // *Bioorg. Med. Chem.* 2002. Vol. 10. N 9. P. 3023–3029.
79. *Schlesinger N., Yasothan U., Kirkpatrick P.* Pegloticase // *Nature Rev. Drug Discov.* 2011. Vol. 10. N 1. P. 17–18.
80. *Scott L. C., Yao J. C., Benson A. B.* et al. A phase II study of pegylated-camptothecin (pegamotecan) in the treatment of locally advanced and metastatic gastric and gastro-oesophageal junction adenocarcinoma // *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2009. Vol. 63. N 2. P. 363–370.
81. *Sehon A. H.* Suppression of antibody responses by conjugates of antigens and monomethoxy-poly(ethylene glycol) // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1991. Vol. 6. N 2. P. 203–217.
82. *Shashwat S., Banerjee, Aher N., Patil R., Khandare J.* Poly(ethylene glycol)-Prodrug Conjugates: Concept, Design, and Applications // *J. Drug Deliv.* 2012. P. 17.
83. *Sundy J. S., Ganson N. J., Kelly S. J.* et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of intravenous PEGylated recombinant mammalian urate oxidase in patients with refractory gout // *Arthritis and Rheum.* 2007. Vol. 56. N 3. P. 1021–1028.
84. *Tan B. H., Tam K. C.* Review on the dynamics and micro-structure of pH-responsive nano-colloidal systems // *Adv. Colloid Interface. Sci.* 2008. Vol. 136. N 1–2. P. 25–44.
85. *Torchilin V. P.* Tat peptide-mediated intracellular delivery of pharmaceutical nanocarriers // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2008. Vol. 60. N 4–5. P. 548–558.
86. *Trainer P. J., Drake W. M., Katznelson L.* et al. Treatment of acromegaly with the growth hormone-receptor antagonist pegvisomant // *N. Engl. J. Med.* 2000. Vol. 342. N 16. P. 1171–1177.
87. *Van Der Lely A. J., Hutson R. K., Trainer P. J.* et al. Longterm treatment of acromegaly with pegvisomant, a growth hormone receptor antagonist // *Lancet.* 2001. Vol. 358. N 9295. P. 1754–1759.
88. *Vasey P. A., Kaye S. B., Morrison R.* et al. Phase I clinical and pharmacokinetic study of PK1 [N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymer doxorubicin]: first member of a new class of chemotherapeutic agents-drug-polymer conjugates // *Clin. Cancer Res.* 1999. Vol. 5. N 1. P. 83–94.
89. *Vogel C. L., Wojtukiewicz M. Z., Carroll R. R.* et al. First and subsequent cycle use of pegfilgrastim prevents febrile neutropenia in patients with breast cancer: a multicenter, double-blind, placebo-controlled phase III study // *J. Clin. Oncol.* 2005. Vol. 23. N 6. P. 1178–1184.
90. *Webster R., Didier E., Harris P.* et al. PEGylated proteins: evaluation of their safety in the absence of definitive metabolism studies // *Drug Metab. Dispos.* 2007. Vol. 35. N 1. P. 9–16.
91. *Welte K., Gabrilove J., Bronchud M. H.* et al. Filgrastim (r-metHuG-CSF): the first 10 years // *Blood.* 1996. Vol. 88. N 6. P. 1907–1929.
92. *Zeuzem S., Feinman S. V., Rasenack J.* et al. Peginterferon alfa-2a in patients with chronic hepatitis C // *N. Engl. J. Med.* 2000. Vol. 343. N 23. P. 1666–1672.
93. *Zhao H., Lee C., Sai P.* et al. 20-O-acylcampthothecin derivatives: evidence for lactone stabilization // *J. Organ. Chem.* 2000. Vol. 65. N 15. P. 4601–4606.



**PARTICULAR QUALITIES OF APPLICATION OF  
POLYETHYLENE GLYCOL-BASED POLYMERIC CARRIER  
FOR DRUG DELIVERY TO THE GOAL TARGET**

**Y. Zdvizhkov, M. Bura**

*Ivan Franko National University of Lviv  
4, Hrushevskiy St., Lviv 79005, Ukraine  
e-mail: Zdvizhkov\_yura@ukr.net*

Drug delivery refers to approaches, formulations, technologies, and systems, which are used to modify physico-chemical, pharmacological and pharmaceutical properties with the aim of improving their efficiency and safety. A special place among these studies take up the development of dosage forms using nanotechnology. Particular attention among these studies is paid to drug forms development using nanotechnology. Drugs that have not been successful before due to the high toxicity, have a chance at a new life thanks to their inclusion in drug delivery systems. In this article prospects of polymeric carrier application, modified by polyethylene glycol are described (VEP-GMA-PEG) to deliver antimicrobial and antineoplastic drugs to the goal targets.

*Keywords:* drugs, drug delivery, polymeric carrier (VEP-GMA-PEG), goal target.

**ОСОБЕННОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПОЛИМЕРНЫХ НОСИТЕЛЕЙ  
НА ОСНОВЕ ПОЛИЭТИЛЕНГЛИКОЛЯ ДЛЯ ДОСТАВКИ  
ЛЕКАРСТВ В ОРГАН-МИШЕНЬ**

**Ю. Здвижков, М. Бура**

*Львовский национальный университет имени Ивана Франко  
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина  
e-mail: Zdvizhkov\_yura@ukr.net*

Под доставкой лекарств понимают совокупность методов, технологий и приёмов, которые используют для модификации физико-химических, фармакологических и фармацевтических свойств лекарственных препаратов с целью улучшения их эффективности и повышения безопасности. Особое место среди этих исследований занимают разработки лекарственных форм с использованием нанотехнологий. Препараты, не имевшие успеха ранее в связи с высокой токсичностью, могут получить шанс на вторую жизнь благодаря включению их в системы доставки лекарств. В данной статье излагаются перспективы применения модифицированного полиэтиленгликолем полимерного носителя (ВЕР-ГМА-ПЭГ) для доставки антимикробных и противоопухолевых препаратов в орган-мишень.

*Ключевые слова:* полимер, доставка лекарств, лекарственные препараты, орган-мишень.

## РЕЄСТР ПРІСНОВОДНИХ КРУГОВІЙЧАСТИХ ІНФУЗОРІЙ УКРАЇНИ

**Л. Константиненко**

*Житомирський державний університет імені Івана Франка  
вул. Пушкінська, 42, Житомир 10002, Україна  
e-mail: lkonstantynenko1@rambler.ru*

У прісних водоймах на території України виявлено 227 видів круговійчастих інфузорій. Ці протисти є краще вивченими у р. Дніпро та його водосховищах. У водах басейну цієї ріки зареєстровано 150 видів перитрих. У непроточних водоймах їх виявлено лише у дев'яти областях України. Перспективним у подальшому є цілеспрямоване вивчення круговійчастих інфузорій різних водних об'єктів.

*Ключові слова:* круговійчасті інфузорії, кількість видів, природні водойми.

Актуальною проблемою сучасності є підтримання якості водного середовища та збереження видового різноманіття гідробіонтів, причиною зниження якого є забруднення водойм речовинами різноманітного походження. Круговійчасті інфузорії є досить поширеними у природних водоймах і мають важливе значення в біологічному самоочищенні води. Вивчення видового складу круговійчастих інфузорій є абсолютно необхідним для ефективного проведення екологічного моніторингу, що є одним із пріоритетних напрямів сучасної біології.

Деякими авторами було проведено аналіз видового складу інфузорій на території України, на основі чого складені їх списки [22, 32, 35, 36]. Першою такою працею є «Практичне значення інфузорій та історія їх дослідження на Україні» Г.М. Гасовського 1935 р. [22]. З того часу з'явилися все нові дані про перитрих у роботах дослідників, здійснено низку ревізій і описано нові види для науки, на основі чого була змінена класифікація інфузорій. У «Кадастрі прісноводних вільноживучих інфузорій України» наведений поновлений список вільноживучих прісноводних інфузорій, серед яких 75 видів і форм – круговійчасті інфузорії [32].

В одній із попередніх робіт автора [48] проаналізовано стан вивченості круговійчастих інфузорій в Україні. У результаті аналізу близько 90 робіт авторів [1-42, 49-87, 89], у яких згадуються види вільноживучих і паразитичних перитрих, та на основі власних досліджень [43-47] було складено доповнений список видів цих інфузорій з урахуванням синонімії (див. таблицю). У роботі використовували систему Ciliophora за Д. Лінном [88].

За літературними даними та власними дослідженнями у прісних водоймах, у тому числі очисних спорудах, встановлено, що на території України з урахуванням синонімії відмічено 227 видів перитрих, які належать до 35 родів.

Найбільше видове багатство (150 видів) відмічене у водоймах басейну Дніпра, 92 види вказані для басейну Дунаю, 77 видів – для басейну Сіверського Донця, 70 видів – для басейну Дністра та 44 види – для басейну Південного Бугу. Ці дані вказують на кращу вивченість перитрих у водах Дніпра та його водосховищ, хоча автори згадують у своїх роботах переважно лише про один-два види перитрих.

Перитрихи непроточних водойм зареєстровані лише у дев'яти областях України: Волинській, Львівській, Закарпатській, Івано-Франківській, Тернопільській, Рівненській, Київській, Сумській, Харківській і Донецькій. В інших регіонах дослідження круговійчастих інфузорій цього типу водойм не проводили.

© Константиненко Л., 2014

## Видовий склад круговічастих інфузорій України

Вид	Системи очищення стічних вод (аеротенки, біофільтри, вторинні відстійники)		Басейн р. Дніпро		Басейн р. Дністер		Басейн р. Сіверський Донець		Басейн р. Дунай		Басейн р. Південний Буг		Крим (прісні водойми, соляні озера) Водойми-охолоджувачі ТЕС, АЕС	
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
<b>Ряд Mobilida Kahl, 1933</b>														
<b>Родина TRICHODINIDAE Claus, 1874</b>														
<b>Рід <i>Semitrichodina</i> Kazubski, 1958</b>														
<i>Semitrichodina alburni</i> (Vojtek, 1957)		+	+											
<i>S. incisa</i> Lom, 1959		+		+			+						+	
<i>S. meridionalis</i> (Dogiel, 1940)														+
<b>Рід <i>Trichodina</i> Ehrenberg, 1830</b>														
<i>Trichodina acuta</i> Lom, 1961		+												+
<i>Tr. anguilli</i> Wu, 1961														+
<i>Tr. asocis</i> Lom, 1960			+											+
<i>Tr. baltica</i> (Quennerstedt, 1869)				+										+
<i>Tr. barbasi</i> Kostenko et Kulakowskaja, 1976														+
<i>Tr. borealis</i> (Dogiel, 1940)														+
<i>Tr. cobitis</i> Lom, 1960			+	+										+
<i>Tr. domerquei</i> (Wallengren, 1897)			+	+	+	+	+	+					+	+
<i>Tr. esocis</i> (Lom, 1960)														+
<i>Tr. fultoni</i> Davis, 1947														+
<i>Tr. intermedia</i> Lom, 1960				+										+
<i>Tr. jadratica</i> (Raabe, 1959)														+
<i>Tr. janovice</i> Lom, 1960				+										+
<i>Tr. lampetri</i> Kostenko et Kulakowskaja, 1976								+						+
<i>Tr. modesta</i> Lom, 1970								+						+
<i>Tr. mutabilis</i> Kazubski et Migala, 1968														+
<i>Tr. nemachili</i> Lom, 1960			+	+										+
<i>Tr. nigra</i> (Lom, 1960)			+	+										+
<i>Tr. nobilis</i> Chen, 1963					+									+
<i>Tr. ovonucleata</i> (Raabe, 1958)														+
<i>Tr. pediculus</i> (Müller, 1786)		+	+	+	+		+		+	+				+

Продовження таблиці

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
<i>Tr. polycirra</i> Lom, 1960			+											+
<i>Tr. polystriata</i> Kostenko, 1969														+
<i>Tr. ranae</i> Da Cunha, 1950			+											
<i>Tr. rectuncinata</i> Raabe, 1958														+
<i>Tr. reticulata</i> Kirschman et Partsch, 1955			+	+	+	+		+						+
<i>Tr. rostrata</i> Kulemina, 1968			+											+
<i>Tr. sapae</i> Kostenko et Kulakowskaja, 1976			+											
<i>Tr. spathulata</i> Kulemina, 1968			+											
<i>Tr. strelkovi</i> Chan, 1961			+											+
<i>Tr. tenuidens</i> Fauri-Fremiet, 1943			+											+
<i>Tr. tisaе</i> Lom, 1970			+	+										
<i>Tr. unionis</i> Hampl, 1955			+	+				+						
<i>Tr. urinaria</i> Dogiel, 1940			+	+	+			+	+					+
<b>Рід <i>Trichodinella</i> Šrámek-Hušek, 1953</b>														
<i>Trichodinella carasii</i> (Dogiel, 1940)														+
<i>T. lotae</i> (Chan, 1961)			+	+										
<i>T. minuta</i> (Chen, 1956)														+
<i>T. percarum</i> (Dogiel, 1940)			+		+									+
<b>Рід <i>Tripartiella</i> Raabe, 1963</b>														
<i>Tripartiella bulbosa</i> Davis, 1947					+									+
<i>T. copiosa</i> Lom, 1959			+					+						+
<i>T. lata</i> Lom, 1963			+											
<i>T. obliqua</i> Lom, 1963			+											+
<b>Ряд Sessilida Kahl, 1933</b>														
<b>Родина ASTYLOZOIDAE Kahl, 1935</b>														
<b>Рід <i>Astylozoon</i> Engelmann, 1862</b>														
<i>Astylozoon fallax</i> Engelmann, 1862														+
<i>A. faurei</i> Kahl, 1935			+		+	+								+
<i>A. oxyopus</i> Lepsi, 1960														+
<i>A. pyriforme</i> Schewiakof, 1893				+	+	+								+
<b>Рід <i>Hastatella</i> Erlanger, 1890</b>														
<i>Hastatella aesculacantha</i> Jar et Jacub. 1927					+	+								+
<i>H. radians</i> Erlanger, 1890					+	+		+						+
<b>Родина EPISTYLIDIDAE Kahl, 1933</b>														
<b>Рід <i>Apiosoma</i> Blanchard, 1885</b>														
<i>Apiosoma campanulata</i> Timofeev, 1962			+											
<i>A. conica</i> Timofeev, 1962			+											
<i>A. minuta</i> (Chen, 1961)			+											
<i>A. piscicola</i> Blanchard, 1885			+											
<b>Рід <i>Campanella</i> Goldfuss, 1820</b>														
<i>Campanella umbellaria</i> (Linnaeus, 1758)				+	+			+						+
<b>Рід <i>Epistylis</i> Ehrenberg, 1830</b>														
<i>Epistylis anastatica</i> (Linne, 1767)			+	+				+						+
<i>E. articulata</i> Fromentel, 1974			+	+				+						+
<i>E. astaci</i> Nenninger, 1948			+	+				+						+
<i>E. balatonica</i> Stiller, 1931			+	+				+						+
<i>E. bimarginata</i> Nenninger, 1948			+											+
<i>E. boristhenicus</i> Boshko, 1987			+	+				+						+
<i>E. breviformis</i> Stiller, 1931				+										+
<i>E. chrysemydis</i> Bishop et Jahn, 1941			+											+
<i>E. coronata</i> Nusch, 1970			+											+
<i>E. crassicolis</i> Stein, 1867			+	+				+						+
<i>E. cyclopi</i> Banina, 1977			+	+										+
<i>E. digitalis</i> (Linnaeus, 1758)			+	+										+
<i>E. elegans</i> Boitsova, 1977			+											+
<i>E. entzii</i> Stiller, 1935			+	+	+	+	+	+						+

Продовження таблиці

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
<i>E. epibioticum</i> Banina, 1983	+	+	+			+				+	+	+		
<i>E. fugitans</i> Kellicott, 1884		+												
<i>E. galea</i> Ehrenberg, 1831				+										
<i>E. gammari</i> Precht, 1935		+												
<i>E. helenae</i> Green, 1974		+	+											
<i>E. kolbi</i> Nenninger, 1948		+	+			+			+	+			+	
<i>E. lacustris</i> Imhoff, 1884								+	+					
<i>E. longicaudatum</i> Banina, 1983	+													
<i>E. microdiscum</i> Stiller, 1963		+	+											
<i>E. niagarae</i> Kellicott, 1883		+	+							+	+		+	
<i>E. nympharum</i> Emgelmann, 1862						+			+					
<i>E. pilosus</i> Boitsova, 1976		+	+											
<i>E. plicatilis</i> Ehrenberg, 1831	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	
<i>E. polyarthris</i> Kostenko et Ovander, 1982				+										
<i>E. procumbens</i> Zacharias, 1897			+					+	+					
<i>E. pyriformis</i> Jankowskij, 1983						+								
<i>E. pygmaeum</i> (Ehrenberg, 1838)		+	+											
<i>E. thinemanni</i> (Nenninger, 1948)	+													
<b>Рід <i>Rhabdostyla</i> Kent, 1881</b>														
<i>Rhabdostyla brevipes</i> Claparède et Lachmann, 1857						+								
<i>R. inclinans</i> (Müller, 1773)										+				
<i>R. putrina</i> (Müller, 1776)										+	+			
<b>Родина LAGENOPHRYIDAE Bütschli, 1889</b>														
<b>Рід <i>Lagenophrys</i> Stein, 1852</b>														
<i>Lagenophrys ampulla</i> Stein, 1851		+	+	+		+				+			+	
<i>L. aselli</i> Plate, 1886		+	+											
<i>L. discoidea</i> Kellicott, 1887		+												
<i>L. labiata</i> Stockes, 1877										+				
<i>L. nassa</i> Stein, 1851		+	+			+			+	+			+	
<i>L. orchestiae</i> Abonyi, 1928		+	+								+		+	
<i>L. platei</i> Wallengren, 1900		+	+											
<i>L. pontocaspica</i> Boshko, 1995		+	+			+			+	+			+	
<i>L. vaginicola</i> Stein, 1852		+	+											
<b>Родина OPERCULARIIDAE Fauré-Fremiet in Corliss, 1979</b>														
<b>Рід <i>Entziella</i> Stiller, 1951</b>														
<i>Entziella orchestis</i> Jankowski, 1993		+	+			+				+	+		+	
<b>Рід <i>Opercularia</i> Goldfuss, 1820</b>														
<i>Opercularia articulata</i> Goldfuss, 1820	+	+												
<i>O. asellicola</i> Kahl, 1935		+												
<i>O. cema</i> Jankowski, 1993		+												
<i>O. coarctata</i> (Claparède et Lachmann, 1858)	+						+		+					
<i>O. custaceorum</i> Biegel, 1954		+	+			+				+	+	+		
<i>O. discoconipes</i> Banina, 1977		+	+											
<i>O. lichtensteini</i> Stein, 1869		+	+			+								
<i>O. microdiscum</i> Fauré-Fremiet, 1904	+													
<i>O. nutans</i> (Ehrenberg, 1838)		+	+			+	+		+	+	+	+	+	
<i>O. plicatilis</i> Stokes, 1884		+	+			+				+	+	+	+	
<i>O. protecta</i> Penard, 1922		+												
<i>O. stenostoma</i> Stein, 1854										+				
<b>Рід <i>Orbopercularia</i> Lust in Guhl, 1979</b>														
<i>Orbopercularia astacicola</i> (Mattes, 1950)		+	+			+				+	+	+	+	
<i>O. strelkowi</i> (Shubernetskii et Chorik, 1977)		+	+											
<i>O. tranzeli</i> (Matthes, 1950)		+	+											
<b>Рід <i>Pyxidium</i> Kent, 1881</b>														
<i>Pyxidium invaginatum</i> Stokes, 1887								+	+					
<i>P. nutans</i> Stokes, 1899								+	+					

Продовження таблиці

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
<b>Родина OPHRYDIIDAE Ehrenberg, 1838</b>														
<b>Рід <i>Ophrydium</i> Bory, 1824</b>														
<i>Ophrydium eichhorni</i> Ehrenberg, 1838				+				+		+				
<i>O. versatile</i> Müller, 1786								+						
<b>Родина SCYPHIDIDAE Kahl, 1933</b>														
<b>Рід <i>Mantoscyphidia</i> Jankowski, 1980</b>														
<i>Mantoscyphidia hydrobiae</i> (Kahl, 1933)		+					+			+		+		
<i>M. limacina</i> (Lachmann, 1856)		+								+		+		
<i>M. physarum</i> (Lachmann, 1856)		+					+			+	+	+		
<i>M. radixi</i> Boshko, 1993		+	+				+			+		+		
<i>M. sphaeriidarum</i> Boshko, 1993		+					+			+		+		
<i>M. theodoxis</i> Boshko, 1993		+	+				+			+		+		
<b>Родина VAGINICOLIDAE Fromentel, 1874</b>														
<b>Рід <i>Cothurnia</i> Ehrenberg, 1831</b>														
<i>Cothurnia curvula</i> Entz, 1884										+				
<i>C. harpactici</i> Kahl, 1933										+				+
<i>C. ingenita</i> Fromentel, 1874										+				
<i>C. maritima</i> Ehrenberg, 1838								+	+	+				
<i>C. nodosa</i> Claparède et Lachmann, 1858														+
<i>C. patula</i> Fromentel, 1874								+		+				
<i>C. vaga</i> Roux, 1901								+		+				
<b>Рід <i>Cothurniopsis</i> Stokes, 1893</b>														
<i>Cothurniopsis astaci</i> (Stein, 1854)		+	+				+				+	+		
<i>C. bavarica</i> (Matthes et Guhl, 1972)		+	+				+				+	+		
<i>C. curva</i> (Stein, 1854)		+	+				+				+	+		
<i>C. imberbis</i> (Ehrenberg, 1838)										+				+
<i>C. sieboldii</i> (Stein, 1854)		+	+	+			+				+	+		
<b>Рід <i>Cyclodonta</i> Matthes, 1958</b>														
<i>Cyclodonta bipartite</i> Stokes, 1885		+	+											
<b>Рід <i>Pachytrocha</i> Kent, 1882</b>														
<i>Pachytrocha cothurnoides</i> Kent, 1881										+				+
<i>P. zhytomirensis</i> Boshko et Konstantynenko, 2009										+				
<b>Рід <i>Platycola</i> Kent, 1882</b>														
<i>Platycola decumbens</i> (Ehrenberg, 1830)								+		+				
<i>P. dilatata</i> (Fromentel, 1874)										+			+	
<b>Рід <i>Pyxicola</i> Kent, 1882</b>														
<i>Pyxicola affinis</i> Kent, 1881		+			+			+		+				
<i>P. carteri</i> Kent, 1882										+				
<i>P. constricta</i> Stokes, 1884														+
<i>P. thuricolae</i> (Shubernetskii, 1978)			+	+							+		+	
<b>Рід <i>Sincothurnia</i> Jankowski, 1985</b>														
<i>Sincothurnia branchiata</i> Boshko, 1995		+										+		
<i>S. limanica</i> Jankowski, 1993		+												
<b>Рід <i>Thuricola</i> Kent, 1881</b>														
<i>Thuricola folliculata</i> Kent, 1881					+									
<i>T. innixa</i> Stokes, 1882					+					+				
<i>T. kellicottiana</i> (Stokes, 1887)		+												
<i>T. similis</i> Bock, 1963		+												
<i>T. valvata</i> (Wright, 1858)										+				
<b>Рід <i>Vaginicola</i> Lamarck, 1816</b>														
<i>Vaginicola crystallina</i> (Ehrenberg, 1830)		+		+	+			+	+	+	+			
<i>V. gigantea</i> (d'Udekem, 1862)								+		+				
<i>V. grandis</i> Perty, 1852								+		+				
<i>V. incisa</i> (var Daday, 1907)								+		+				
<i>V. ingenita</i> (Müller, 1786)														+
<i>V. striata</i> (Fromentel, 1874)														+
<i>V. tinkta</i> Ehrenberg, 1830								+		+				





Закінчення таблиці

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
<b>Рід <i>Pseudohaplocaulus</i> Warren, 1988</b>														
<i>Pseudohaplocaulus anabaena</i> (Stiller, 1940)		+												+
<b>Рід <i>Zoothamnium</i> Bory, 1824</b>														
<i>Zoothamnium adamsi</i> Stokes, 1885		+												
<i>Z. affine</i> Stein, 1859		+	+				+			+	+			+
<i>Z. arbuscula</i> Ehrenberg, 1931			+						+					+
<i>Z. aselli</i> Claparède et Lachmann, 1858			+							+				
<i>Z. constrictum</i> Stiller, 1953		+	+							+	+			+
<i>Z. duplicatum</i> Kahl, 1933		+	+				+	+		+	+	+		+
<i>Z. elegans</i> D'Udekem, 1862		+		+		+								
<i>Z. gammari</i> Korfsmeier, 1948		+	+				+			+	+			+
<i>Z. hentscheli</i> Kahl, 1935		+	+					+		+				
<i>Z. kahli</i> Stiller, 1953		+	+				+				+	+		+
<i>Z. kentii</i> Grenfell, 1884			+											
<i>Z. marinum</i> Mereschkowsky, 1879									+					
<i>Z. musedo</i> Entz, 1884									+					
<i>Z. ovatum</i> Boitsova, 1977			+											
<i>Z. parasiticum</i> Stein, 1859	+					+								
<i>Z. procerius</i> Kahl, 1935			+											
<i>Z. ramosissimum</i> Sommer, 1951		+	+				+				+	+		+
<i>Z. simplex</i> Kent, 1881		+	+	+		+	+			+		+		+
<i>Z. varians</i> Stiller, 1931		+	+				+				+			+
Загальна кількість видів	33	125	91	33	26	50	41	9	68	79	33			
		150			70		77		92			44	17	8

Перспективним у подальшому є цілеспрямоване вивчення видового складу, морфології, екології та систематики круговійчастих інфузорій різних водних об'єктів України, що є необхідним для ефективного проведення екологічного моніторингу.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Андруцишин О. П. Інфузорії придонного шару водойм західного регіону України: автореф. дис. ... канд. біол. наук: 03.00.18. К., 1996. 24 с.
2. Бабко Р. В. Війчасті найпростіші річки Либідь // Урбанізоване навколишнє середовище: охорона природи та здоров'я людини. К., 1996. С. 237.
3. Бабко Р. В., Ковальчук А. А. Матеріали до кадастру вільноживучих інфузорій Сумської області // Проблеми охорони і раціонального використання природних ресурсів Сумщини. Суми: Вид-во Сумськ. пед. ін-ту, 1992. С. 113–125.
4. Бабко Р. В., Кузьміна Т. М. Фауна інфузорій (Protozoa: Ciliophora) річки Битиці і супутніх заплавної водойми // Вакалівщина. Суми. 1998. С. 4–20.
5. Бабко Р. В., Кузьміна Т. Н. Ресничные простейшие (Protista, Ciliophora) эпифитона высших водных растений в малой реке // Гидробиол. журнал. 2004. Т. 14. № 2. С. 23–39.
6. Бауер О. Н. Эпизоотическое состояние рыб в прудовых хозяйствах СССР и очередные задачи борьбы с паразитарными заболеваниями в них // Вопросы ихтиологии. 1957. Вып. 8. С. 179–187.
7. Белинг Д. Днепровская биологическая станция // Русский гидробиол. журнал. 1923. Т. 2. № 1–2. С. 42–44.
8. Бошко Е. Г. Фаунистический комплекс беспозвоночных организмов, населяющих речных раков в водоёмах Украины // Паразиты и другие симбионты водных беспозвоночных и рыб. К.: Наук. думка, 1987. С. 22–36.
9. Бошко Е. Г. *Epistylis borysthenicus* sp. n. (Peritricha, Epistylididae) – новая кругоресничная инфузория из моллюсков родов *Unio* и *Anodonta* водоёмов бассейна Днепра // Зоол. журнал. 1987. Т. 66. Вып. 2. С. 295–298.



10. Бошко Е. Г. Паразиты и комменсалы длиннопалого речного рака // Беспозвоночные и рыбы Днепра и его водохранилищ. К.: Наук. думка, 1989. С. 189–200.
11. Бошко Е. Г. Комменсальные раковинные перитрихи ракообразных водоёмов бассейна Днепра // Цитология. 1992. Т. 34. № 4. С. 32.
12. Бошко Е. Г. Новые виды инфузорий рода *Mantoscaphidia* (Ciliophora, Peritricha) от пресноводных моллюсков // Вестн. зоологии. 1993. № 6. С. 14–19.
13. Бошко Е. Г. Новые виды комменсальных кругоресничных инфузорий родов *Sincothurnia* и *Lagenophrys* (Peritricha, Vaginicolidae, Lagenophryidae) // Зоол. журнал. 1995. Т. 74. Вып. 7. С. 5–9.
14. Бошко Е. Г. О заселённости моллюсков водоёмов Украины комменсальными сидячими кругоресничными инфузориями // Наук. зап. Терноп. держ. пед. ун-ту. Сер. біол. Спец. випуск: Гідроекологія. 2001. С. 31–33.
15. Бузакова А. М., Лубянов И. П. Некоторые особенности распределения микрозообентоса и придонного зоопланктона Ленинского водохранилища после сооружения Днепродзержинской ГЭС на Днепре // Науч. докл. высшей школы. Биол. науки. 1967. № 12. С. 22–27.
16. Бошко Е. Г. Комменсалы бокоплавов водоёмов Украины // XII конф. Укр. наук. т-ва паразитологов: тези доп. К., 2002. С. 16–17.
17. Бошко О. Г. Круговійчасті інфузорії – коменсали ракоподібних басейну середнього Дніпра // Сучасні проблеми зоологічної науки: матеріали Всеукр. наук. конф. „Наукові читання, присвячені 170-річчю заснування кафедри зоології та 100-річчя з дня народження проф. О.Б. Кістяківського”. К., 2004. С. 20–22.
18. Бошко Е. Г. Состояние изученности сидячих кругоресничных инфузорий (Ciliophora, Peritrichia) – облигатных комменсалов водных моллюсков // Эколого-функціональні та фауністичні аспекти дослідження моллюсків, їх роль у біоіндикації стану навколишнього середовища: зб. наук. праць. Житомир: Волинь, 2004. С. 10–14.
19. Бошко Е. Г. Сидячие комменсальные инфузории (Ciliophora, Peritrichia) водных моллюсков Украины // Эколого-функціональні та фауністичні аспекти дослідження моллюсків, їх роль у біоіндикації стану навколишнього середовища: зб. наук. праць. Вип. 2. Житомир: Вид-во ЖДУ ім. І. Франка, 2006. С. 34–37.
20. Бошко Е. Г. Эколого-фаунистическое изучение комменсальных инфузорий бокоплавов Украины // IV Междунар. симпозиум, посвященный памяти чл.-кор. Ю.И. Полянского. Тольятти, 2011. С. 15.
21. Галаджиев М. А. Материалы к фауне Protozoa окрестных вод в окрестности Севастополя // Тр. Крымского НИИ. 1927. Т. 1. Вып. 2. С. 105–117.
22. Гасовський Г. М. Практичне значення інфузорій та історія їх дослідження на Україні // Зб. праць зоол. музею. К., 1960. № 29. С. 58–90.
23. Гурвич В. В. До вивчення фауни інфузорій Каховського водоймища // ДАН УРСР. 1960. № 6. С. 836–839.
24. Добровлянський В. В. Список пресноводних простейших окрестностей г. Киева // Тр. Днепров. биол. станции. 1914. № 1. С. 35–47.
25. Догель В. А. К вопросу о систематике рода *Trichodina* // Тр. Ленинград. об-ва. естествоисп. 1940. Т. 68. Вып. 4. С. 8–31.
26. Иванцев В. В. Систематический анализ симбиофауны двустворчатых моллюсков сем Unionidae некоторых водоемов Украины // Паразиты и другие симбионты водных беспозвоночных и рыб. К.: Наук. думка, 1987. С. 36–46.
27. Ивасик В. М., Кулаковская О. П. Паразитофауна рыб озер Нобель, Островское, Дубновское, Иванье, Крымно, Перекальская группа, Черное большое // Тр. Н.-и. ин-та пруд. и оз.-реч. рыбн. хоз. УАСХН. 1958. № 11. С. 175–185.

28. *Истомина Л. П., Кириченко А. Г., Ракитин Е. Г.* О видовом составе простейших и водорослей активного ила сточной воды, очищенной в аэротенках // Гидробиол. журнал. 1973. Т. 9. № 5. С. 43–48.
29. *Ивасик В. М.* Паразити та паразитарні захворювання коропа у ставкових господарствах західних областей УРСР // Праці інституту агробіології. 1954. Т. 5. С. 57–79.
30. *Ковальчук А. А.* Предварительные исследования фауны и экологии инфузорий р. Уж // Лимнология горных водоёмов. 1984. С. 107–108.
31. *Ковальчук А. А.* Вільноживучі інфузорії внутрішніх водойм України та їх роль у продукційно-деструкційних процесах: автореф. дис. ... д-ра. біол. наук: 03.00.18. К., 1994. 48 с.
32. *Ковальчук А. А.* Кадастр прісноводних вільноживучих інфузорій України // Наук. вісн. Ужгород. ун-ту. Сер. біол. 2000. № 7. 21 с.
33. *Ковальчук А. А.* Эпифитонные инфузории днепровских водохранилищ // Гидробиол. журнал. 2000. Т. 36. № 6. С. 14–28.
34. *Ковальчук А. А.* Инфузории, другие простейшие и микробеспозвоночные водоёмов зоны подтопления и поймы водохранилищ Днепра // Гидробиол. журнал. 2006. Т. 42. № 2. С. 3–39.
35. *Ковальчук А. А., Бабко Р. В., Ковальчук Н. Е.* Состояние изученности и перспективы изучения пресноводных свободноживущих инфузорий Украины // Гидробиол. журнал. К., 1987. В. 87. Ч. 1. 24 с. Деп. в ВИНТИ. № 3948.
36. *Ковальчук А. А., Бабко Р. В., Ковальчук Н. Е.* Состояние изученности и перспективы изучения пресноводных свободноживущих инфузорий Украины // Гидробиол. журнал. К., 1988. В. 88. Ч. 2. 14 с. Деп. в ВИНТИ. № 3739.
37. *Ковальчук А. А., Ковальчук Н. Е.* Предварительные исследования фауны и экологии инфузорий р.Уж (Закарпатская обл. УССР) // Лимнология горных водоёмов. Ереван, 1984. С. 107–108.
38. *Комарова Т. И.* Паразитофауна молоді окуневих риб верхів'я Кременчуцького водоймища // Паразити, паразитози та шляхи їх ліквідації. К.: Наук. думка, 1972. Вип. 1. С. 104–119.
39. *Комарова Т. И.* Эколого-фаунистический анализ паразитов молоді рыб Кременчугского водохранилища // Проблемы гидропаразитологии. К.: Наук. думка, 1978. С. 77–78.
40. *Комарова Т. И.* Паразиты молоді рыб Кременчугского водохранилища и их влияние на организм хозяев. К.: Наук. думка, 1982. 224 с.
41. *Коновалова Е. И.* Альгофлора и микрофауна некоторых рыбоводных прудов Харьковской области // Тр. н.-и. ин-та биол. и биол. факульт. Харьков. гос. ун-та. 1956. Т. 23. С. 247–257.
42. *Коновалова Е. И.* Смена организмов планктона при самоочищении малых стоячих водоёмов // Тр. н.-и. ин-та биол. и биол. факульт. Харьков. гос. ун-та. 1956. Т. 23. С. 221–235.
43. *Константиненко Л. А.* Видовий склад перитрих (*Ciliophora, Peritrichia*) активного мулу очисних споруд з різним складом стічних вод // Вісн. ДАУ. 2007. № 1 (18). С. 270–276.
44. *Константиненко Л. А.* Залежність інтенсивності живлення перитрих (*Ciliophora, Peritrichia*) від гідрохімічних показників активного мулу // Наук. зап. Терноп. нац. пед. ун-ту. 2010. № 4. С. 64–69.
45. *Константиненко Л. А.* Круговійчасті інфузорії (*Ciliophora, Peritrichia*) в аеротенках очисних споруд м. Житомир // Вестн. зоол. 2007. Т. 41. № 2. С. 169–174.
46. *Константиненко Л. А.* Круговійчасті інфузорії (*Ciliophora, Peritrichia*) очисних споруд Житомира: дис. ... канд. біол. наук: 03.00.08. Житомир, 2008. 198 с.

47. *Константиненко Л. А.* Сезонна динаміка чисельності та видового складу круговійчастих інфузорій (Ciliophora, Peritrichia) в очисних спорудах // Вісн. ЖНАУ. 2010. № 1. С. 211–219.
48. *Константиненко Л. А.* Стан вивченості прісноводних круговійчастих інфузорій (Ciliophora, Peritrichia) в Україні // Наук. часопис НПУ ім. М.П. Драгоманова. Сер. №20. Біологія: зб. наук. праць. 2011. № 3. С. 125–131.
49. *Костенко С. М.* К изучению паразитических инфузорий (семейства Scyphidiidae и Dendrosomidae) рыб среднего Днепра // Тез. 5 науч. конф. молодых специалистов. К., 1967. С. 29–30.
50. *Костенко С. М.* Экология паразитических инфузорий рыб среднего Днепра // Успехи протозоологии. Л.: Наука, 1969. С. 285.
51. *Костенко С. М.* Урцеоларіїди (Перитрихи, мобілії). К.: Наук. думка, 1981. 148 с. (Фауна України. Т. 36. Вип. 4).
52. *Костенко С. М.* Приуроченность кругоресничных инфузорий к субстратам и хозяевам-носителям в некоторых водоёмах Украины. Ред. Вестн. зоологии. К., 1987. В. 87. 22 с. Деп. в ВИНТИ. № 8182.
53. *Костенко С. М., Кулаковская О. П.* Паразитофауна инфузорий редких и эндемичных рыб водоёмов Украины // Матер. II Всесоюзн. з'їзду протозоологів. К., 1976. № 1. С. 74–75.
54. *Костенко С. М., Овандер Э. Н.* Обнаружение эпибионтных инфузорий (Peritricha, Sessilina) на некоторых коловратках // III съезд Всесоюзн. общ. протозоологов. Вильнюс, 1982. С. 179.
55. *Кравченко В. М.* О фауне инфузорий водоёмов бассейна Северского Донца // Вестн. зоологии. 1969. № 3. С. 69–75.
56. *Кравченко В. М.* Инфузории временных водоёмов северо-восточной Украины // Матер. II Всесоюзн. з'їзду протозоологів. К., 1976. № 1. С. 75–76.
57. *Кравченко В. М.* Динамика численности инфузорий реки Псел // III съезд Всесоюзн. об-ва протозоологов. Вильнюс, 1982. С. 182.
58. *Кравченко В. М.* Инфузорії р. Псел і її притоків // Проблеми охорони і раціонального використання природних ресурсів Сумщини. Суми: Вид-во Сумськ. пед. ін-ту, 1992. С. 135–140.
59. *Крашенинників С. М.* Матерьяли до фавни Protozoa оз. Заспи та найблизших до цього озера стоячих водозборів (бувш. оз. Домаха) // Зап. Київськ. вет.-зоотех. ін-ту. 1925. Т.3. С. 38–42.
60. *Кузьміна Т. М.* Війчасті найпростіші епіфітону в умовах вищої водної рослинності різних екологічних груп та їх роль у продукційно-деструкційних процесах: автореф. дис. ... канд. біол. наук: 03.00.17. К., 2000. 19 с.
61. *Курандина Д. П.* Паразиты и другие симбионты ракообразных и насекомых // Беспозвоночные и рыбы Днепра и его водохранилищ. К.: Наук. думка, 1989. С. 200–210.
62. *Лубянов И. П.* Донная фауна пойменных водоёмов среднего течения Днепра в районе подтопа Днепродзержинского водохранилища // Зоол. журнал. 1959. Т. 38. Вып. 11. С. 1612–1619.
63. *Малевицкая М. А.* Паразитарные заболевания молоди карпа в рыбхозах восточных областей УССР // Тр. н.-и. ин-та прудового и озерно-речного рыбного хозяйства. 1952. № 8. С. 117.
64. *Маркевич А. П.* Паразитофауна пресноводных рыб УССР. К.: Изд-во АН УССР, 1951. С. 96–98.

65. *Мирошниченко А. И.* Аборигенные и пришлые представители паразитофауны рыб Крыма // I Всесоюзн. съезд паразитологов. К., 1978. Ч. 3. С. 100–102.
66. *Мовчан В. А.* Экология простейших в искусственных водоёмах // III съезд Всесоюзн. об-ва протозоологов. Вильнюс, 1982. С. 236.
67. *Мовчан В. А.* Простейшие в микрозообентосе и перифитоне канала Северский Донец – Донбасс // Вопросы гидробиологии водоемов Украины: сб. науч. тр. К.: Наук. думка, 1988. С. 32–37.
68. *Мовчан В. А.* Инфузории и раковинные амёбы бентоса канала Северский Донец – Донбасс: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.18. К., 1989. 24 с.
69. *Монченко В. І., Бошко О. Г., Кражан С. А.* *Cothurnia harpacticі* (Ciliophora, Peritricha) – новый вид инфузорій у фауні України // Історія зоології у Київському університеті. 2004. С. 60–61.
70. *Монченко В. І., Костенко С. М.* О составе видов сидячих инфузорий (Peritricha, Sessilina) на циклопах в окрестностях Киева // III съезд Всесоюзн. об-ва протозоологов. Вильнюс, 1982. С. 237.
71. *Небрат А. А.* Динамика численности и биомассы планктонных инфузорий открытых зон Кременчугского водохранилища, их продукция и роль в деструкции органического вещества // Гидробиол. журнал. 1975. Т. 11. № 2. С. 18–27.
72. *Небрат А. А.* Видовой состав планктонных инфузорий Киевского и Кременчугского водохранилищ // Гидробиол. журнал. 1980. Т. 16. № 4. С. 30–35.
73. *Нестеренко Г. В.* Свободноживущие инфузории водоёмов-охладителей ТЭС и АЭС и их роль в продукционно-деструкционных процессах: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.18. К., 1991. 19 с.
74. *Олексив И. Т.* Видовой состав и численность планктонных инфузорий в прудах // Гидробиол. журнал. 1985. Т. 21. № 5. С. 89–93.
75. *Олексив И. Т.* Планктонные инфузории прудов западной части УССР: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.18. К., 1985. 21 с.
76. *Палій М. А.* Про паразитофауну риб Бережанського ставкового господарства та боротьбу з нею // Наук. зап. Львів. держ. ун-ту. Сер. біол. 1954. Т. 26. Вип. 7. С. 64–72.
77. *Переяславцева С. М.* Некоторые сведения об инфузориях, встречающихся в окрестностях г. Харькова // Тр. об-ва испыт. природы при Харьков. ун-те. 1872. Т. 6.
78. *Поліщук В. В.* Гідрофауна пониззя Дунаю в межах України. К.: Наук. думка, 1974. С. 144–146, 187–193.
79. *Синица Т. И.* Некоторые данные о жизни одного озероподобного водоёма бассейна р. Донца // Тр. Харьковск. об-ва испытателей природы. 1929. Т. 52. № 1. С. 317–148.
80. *Стадниченко А. П.* Перлівницеві. Кулькові (Unionidae. Cycladidae). К.: Наук. думка, 1984. 384 с. (Фауна України. Т. 29. Вип. 9).
81. *Стром А. Д., Данилевская И. П., Тихонрук И. Ф.* та ін. Роль простейших в биологической очистке сточных вод нефтехимической промышленности // Гидробиол. журнал. 1974. Т. 10. № 2. С. 49–54.
82. *Фадеев Н. Н.* Каталог водных животных, найденных в бассейне р. Донца и прилежащих местностях за период работ с 1917 по 1927 гг. // Тр. Харків. т-ва дослідників природи. 1929. Т. 52. № 1. С. 7–32.
83. *Шевченко Н. Н.* Паразиты рыб реки Северного Донца в среднем течении // Тр. н.-и. ин-та биол. и биол. факульт. Харьков. гос. ун-та. 1956. Т. 23. С. 269–301.
84. *Шкорбатов Л. А.* Планктон озера Белого, Змиевского района, Харьковской области // Тр. н.-и. ин-та биол. и биол. факульт. Харьков. гос. ун-та. 1956. Т. 23. С. 157–205.
85. *Boshko E. G., Konstantynenko L. A.* A new species of *Pachytrocha* Kent, 1882 (Ciliophora, Peritrichia: Vaginicolidae) // Zootaxa. 2009. Vol. 2198. P. 61–66.

86. *Faszynski J.* Badania fauny planktonowej stawu Janowskiego w roku 1909 z uwzględnieniem fauny przybrzeżnej // *Kosmos*. 1910. Vol. 35. P. 941–993.
87. *Jaworowski A.* Fauna studzienna miast Krakowa i Lwowa // Komisji fizyograficznej. Materiały dla fizyografii krajowej. 1893. T. 28. № 2. С. 29–48.
88. *Lynn D. H.* The Ciliated protozoa: characterization, classification, and guide to the Literature. Guelph: Springer, 2008. 605 p.
89. *Nusbaum-Hilarowicz J.* Spis wymoczków (Infusoria) znalezionych przez Dra W.L. Wietrzykowskiego w wodach Stacji biologicznej w Drozdowicach pod Gródkiem Jagiellońskim podczas wiosny w r 1914 podał // *Rozpr. i Wiadom. z. Museum im Dzieduszyckich*. 1915. T. 2. № 1–2. S. 102–106.

*Стаття: надійшла до редакції 01.02.13*

*доопрацьована 10.06.13*

*прийнята до друку 30.10.13*

## THE LIST OF THE FRESHWATER PERITRICHIA OF THE UKRAINE

**L. Konstantynenko**

*Ivan Franko State University of Zhytomyr*

*e-mail: lkonstantynenko1@rambler.ru*

227 peritrichia species are founded in the fresh reservoir of the Ukraine. These protists are better studied in Dnipro and his storage reservoirs then other. 150 peritrichia species are registered in the water of the Dnipro basin. The peritrichia of the stagnant reservoir are founded only in nine region of the Ukraine. Single-mindedness study of the peritrichia in diverse reservoir is promising in future.

*Keywords:* peritrichia, species numer, fresh reservoir.

## РЕЕСТР ПРЕСНОВОДНЫХ КРУГОРЕСНИЧНЫХ ИНФУЗОРИЙ УКРАИНЫ

**Л. Константиненко**

*Житомирский государственный университет имени Ивана Франко*

*ул. Пушкинская, 42, Житомир 10002, Украина*

*e-mail: lkonstantynenko1@rambler.ru*

В пресных водоемах Украины обнаружено 227 видов кругоресничных инфузорий. Эти протисты лучше изучены в р. Днепре и его водохранилищах. В водах бассейна этой реки зарегистрировано 150 видов перитрих. В непроточных водоемах они обнаружены лишь в девяти областях Украины. Перспективным в дальнейшем является целенаправленное изучение кругоресничных инфузорий разных водных объектов.

*Ключевые слова:* кругоресничные инфузории, количество видов, природные водоемы.

## РОЛЬ ТРАНСМЕМБРАННОГО ПОТЕНЦІАЛУ І ЦИКЛІН-ЗАЛЕЖНИХ КІНАЗ У КОНТРОЛІ ПРОЛІФЕРАЦІЇ ТА ДИФЕРЕНЦІАЦІЇ КЛІТИН

**І. Стадник**

*Львівський національний університет імені Івана Франка  
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна  
e-mail: irysjastadnyk@gmail.com*

В огляді розглянуто основні механізми переключення між процесами проліферації та диференціації у клітинах різних видів живих організмів. Зосереджено увагу на генетичних системах контролю процесів проліферації та диференціації, а також на ролі зміни мембранного потенціалу клітини у можливості її переходу зі стану проліферації у стан диференціації.

*Ключові слова:* проліферація, диференціація, генетичні системи контролю, трансмембранний потенціал.

Усі клітини зазнають важливого переключення у процесі свого життя, змінюючись із неспеціалізованих клітин, які зазнають швидкого росту, на специфічні типи клітин, які виконують свої функції у спеціалізованих тканинах чи органах; цей процес має назву диференціація. Багато дослідників почали вивчати процеси, що ведуть до цієї важливої фази. Клітинна диференціація є популярною темою дослідження серед науковців різних галузей біології. У процесі розвитку багато клітин спочатку зазнають швидкого росту перед виконанням специфічної функції. Розуміння цього процесу може сприяти розвиткові потенційної терапії стовбуровими клітинами. МікроРНК розглядають як можливий шлях до зміни диференційованих клітин у плюрипотентні стовбурові клітини, які згодом можна буде використати у терапевтичних цілях, включаючи зцілення ран і тканинну регенерацію. Іншою галуззю, для якої важлива клітинна диференціація, є біологія раку, де стрімкий ріст клітин спричиняє хворобу. Детальне розуміння диференціації може сприяти ефективнішому лікуванню раку [18].

Генетичний контроль проліферації та диференціації клітин є складним процесом, у якому задіяні низка генів, білків, у тому числі і транскрипційних факторів. У даному огляді розглянуто механізми контролю проліферації та диференціації клітин на генному, хромосомному і клітинному рівнях.

### **І. Гени та їхні продукти, задіяні у контролі проліферації та диференціації клітин**

У кожній клітині існує близько 2000 видів транскрипційних факторів, і специфічні транскрипційні фактори є активними лише в певний проміжок часу, залежно від стану, в якому перебуває клітина. Транскрипційні фактори не діють поодиночі. Вони часто формують сітки, які впливають на активність одна одної, тим самим ускладнюючи їхнє вивчення.

Дослідники зі Сан-Дієго [67] наблизилися до розгадки таємниці того, як клітини людини переключаються зі стану проліферації у стан диференціації. У своєму дослідженні вони використали серію комп'ютерних і біологічних інтегративних підходів для того, щоб побачити, як змінюється з плином часу активність сіток транскрипційних факторів у міелоїдних клітинних лініях. Ними було започатковане дослідження з використанням біоінформативних технологій для аналізу всієї транскрипційної активності, яка проходить у клітинних лініях лейкемії протягом усього часу, і для визначення того, які транскрипційні фактори задіяні під час різних етапів розвитку клітин. Під час лабораторної стадії проекту



авторами був знайдений компонент, який зупиняє проліферацію клітин у мієлоїдних клітинних лініях. Потім вони зібрали інформацію про активність сіток транскрипційних факторів під час процесу диференціації та дозрівання моноцитів і макрофагів. Математичні підрахунки лабораторних даних дали змогу виявити специфічні підсітки транскрипційних факторів, які були активовані у конкретні проміжки часу. Моніторинг активності транскрипційних сіток через одну годину після настання диференціації допоміг виявити ген, який, імовірно, відіграє важливу роль у клітинній диференціації лейкоцитів. У цьому ж дослідженні, з використанням глибокого секвенування, було виміряно всегеномну динаміку транскрипційних подій у клітинних ліній THP-1 моноцитів людини упродовж арешту клітинного циклу та диференціації. Моделюючи динаміку експресії в межах передбачуваних цис-регуляторних сайтів, виявили ключові транскрипційні регулятори, їхню залежну від часу активність і гени-мішені [67].

Надалі авторами був здійснений почерговий нокаут 52 транскрипційних факторів для того, щоб вивчити їхню індивідуальну роль у межах сіток. Більшість поодиноких нокаутів не призвела до зміни клітинної диференціації чи форми клітин. Систематичні si-РНК нокауту 52 транскрипційних факторів підтвердили роль окремих факторів у регуляторних сітках. Результати показали, що стани клітини обмежуються складними сітками, які включають як позитивні, так і негативні регуляторні взаємодії між великою кількістю транскрипційних факторів, а також що немає єдиного транскрипційного фактора, який би був необхідним і ефективним для запуску процесу диференціації. Використовуючи ці дані, дослідники визначили специфічні гени і транскрипційні фактори, задіяні під час різних етапів розвитку клітин [67].

Дослідження [18] показують, що гени, які контролюють переключення з проліферації на спеціалізацію, можуть бути зведені лише до кількох генів. У ході дослідження розглядали мікроРНК – малі ланцюги РНК, які знижують концентрацію транскрипційних факторів, та білки, що приєднуються до ДНК і включають чи виключають гени. Ці мікроРНК блокують три специфічні гени і запобігають диференціації клітини у специфічні типи клітин.

Проліферація клітин в онтогенезі контролюється складною сіткою сигнальних шляхів, що інтегрують інформацію з позаклітинного та внутрішньоклітинного середовищ для регулювання циклін-залежних кіназ (Cdk) у комплексі з цикліном. Точна регуляція клітинного циклу під час розвитку є критичною для визначення розміру клітини, розміру і форми кожної тканини та подій, що ведуть до правильної клітинної диференціації. Більшість клітин виходять з клітинного циклу для диференціації під час фази  $G_1$ . Тому молекули, що інгібують  $G_1$  прогресію, розглядаються як чудові кандидати для контролю клітинного циклу у тканинах, що розвиваються [101].

Активність Cdk-циклінових комплексів може інгібуватися шляхом зв'язування Cdk інгібіторів (CKI). CKI можуть належати до родин CIP/KIP чи INK4 на основі їхньої структури і відрізняються за способом інгібування Cdk, субклітинною локалізацією, субстратною специфічністю та відповіддю на стимуляцію мітогеном [60, 74]. Члени CIP/KIP родини (p21, p27, p57 та p53) інгібують усі Cdk-циклінові комплекси  $G_1$  фази, в той час як члени INK4 родини (p16, p15, p18 та p19) зв'язують та інгібують лише Cdk4-циклінові та Cdk6-циклінові комплекси. Те, що CIP/KIP білки виконують функцію регуляторів у багатьох тканинах, які диференціюються, передбачає, що ці білки можуть відігравати роль у виході з циклу проліферації та настанні диференціації.

Нещодавнє дослідження на *Drosophila* виявили єдиний CIP/KIP гомолог – білок Dacapo [21, 48]. Було показано, що він здатний зв'язувати і специфічно інгібувати у *Drosophila* Cdk2-циклін E комплекс і вхід клітин до  $G_1$  фази у разі його надекспресії.

Багато досліджень на клітинних культурах показали роль білка p27 як ключового регулятора припинення росту у відповідь на дію трансформуючого фактора росту  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) [65], рапаміцин [62], контактне інгібування [65] і дефіцит факторів росту [17]. Але p27 не є постійним компонентом арешту клітинного циклу у відповідь на ці умови інгібування росту.

Блок p57 є найбільш структурно складним СКІ з консервативним аміно-термінальним Cdk-циклін-інгібіторним доменом, наявним у всіх CIP/KIP, та центральним пролін-збагаченим доменом [50, 57]. p57 експресується у свіжодиференційованих і в багатьох дорослих тканинах [57, 99]. Таким чином, p57 відіграє ключову роль у запобіганні клітинному поділові у диференційованих постмітотичних тканинах.

p107 і p130 зв'язують та інгібують різні підмножини родини E2F транскрипційних факторів і таким чином знижують експресію генів, необхідних для входу в  $G_1$  фази [101].

У більшості біологічних систем зниження проліферації є необхідним для ініціації ключових кроків у процесах диференціації. Було розглянуто регуляторні механізми, що контролюють експресію залежних від клітинного циклу генів гістонів, які є функціонально поєднаними зі синтезом ДНК у проліферуючих клітинах, та під час настання диференціації у кількох типах клітин, включаючи адипоцити [78]. У проліферуючих клітинах транскрипція генів гістонів збільшується з настанням S фази. Було виявлено [78] проксимальний промоторний елемент гена гістона H4, позначений як Site II, який опосередковує транскрипційний контроль клітинного циклу. Фактор, що взаємодіє з Site II, включає в себе cdc2, циклін A, RB – регульований білок та інтерферон – регуляторні фактори (IRFs). Мутаційний аналіз показав, що дистальна частина Site II є критичною для регуляції клітинного циклу. Не менш важливим для розвитку транскрипційного контролю є те, що експресія генів гістонів репресується, коли ініціюється диференціація. *In vivo* не було встановлено приєднання регуляторних білків до Site II. *In vitro* фактор, що зв'язується з Site II, є відсутнім під час проліферації. Делеційний аналіз показав, що проксимальний Site II опосередковує диференційну відповідь транскрипції H4 гена у адипоцитах [78].

В іншому дослідженні був розглянутий білковий комплекс BAF і те, як він контролює скручування ДНК довкола гістонового комплексу хромосом [36]. Оскільки BAF змінює структуру спіралі ДНК, то він контролює доступ транскрипційних факторів до цих генів. АТФ-залежні хроматинремодуючі комплекси ссавців (BAF) є необхідними для формування тотипотентних і плюрипотентних клітин раннього ембріона. Протеомні дослідження [36] показують, що в ембріональних стовбурових клітинах експресуються відмінні комплекси (esBAF), які визначаються наявністю генів *Brg*, *BAF155* і *BAF60A* і відсутністю генів *Brm*, *BAF170* і *BAF60C*. Було показано [36], що такий склад цього комплексу є необхідним для підтримки ембріональних стовбурових клітин та їхньої плюрипотентності. Протеомний аналіз [36] також показав, що комплекси esBAF безпосередньо взаємодіють з ключовими регуляторами плюрипотентності, тим самим автори припускають, що комплекси esBAF є спеціалізованими для взаємодії з специфічними регуляторами ембріональних стовбурових клітин, і дають можливе пояснення необхідності комплексів esBAF у підтримці плюрипотентності [36].

Зменшення кількості популяції висококонсервативних основних ядерних білків корелює з втратою проліферативного потенціалу в асоціації з процесом кінцевої диференціації мезенхімних стовбурових клітин миші та кератиноцитів людини [58]. Ці білки, позначені як P<sup>2</sup>Ps для білків проліферативного потенціалу, мають приблизну молекулярну масу 30-40 кД, є асоційовані з 30-40S субодинамиці ядерного рибонуклеопротеїнового комплексу і “впізнаються” антитілами проти корових білків рибонуклеопротеїнових частинок. Вони



також мають спільний епітоп з білком теплового шоку-90 і “впізнаються” двома антитілами проти білка теплового шоку-90. Двовимірний електрофорез у поєднанні з Вестерн-блот аналізом показують, що P<sup>2</sup>Ps належать до популяції білків рибонуклеопротеїнового комплексу. Клітини, які володіють цими білками, мають потенціал до проліферації, а також це клітини, які швидко ростуть, і нетермінально диференційовані клітини. На противагу, клітини, які незворотно втратили свій проліферативний потенціал, такі як термінально диференційовані клітини, характеризуються значним зниженням кількості P<sup>2</sup>Ps, як було виявлено за допомогою імунодетекції на Вестерн-блотах. Існує кореляція між наявністю цієї популяції ядерних білків і проліферативним потенціалом у двох типів клітин. Ці результати [58] показують здатність P<sup>2</sup>Ps опосередковувати посттранскрипційний контроль процесингу специфічних РНК, які необхідні для клітинної проліферації.

Диференціація клітин ссавців визначається складними молекулярними змінами, включно з активацією і репресією великої кількості генів [75, 77]. Одним із важливих біологічних процесів, асоційованих із диференціацією, є незворотна втрата проліферативного потенціалу, яка трапляється під час специфічної кінцевої події під час диференціації [70, 94]. Багато типів клітин, включно з гематопоетичними клітинами, клітинами м'язів, нейронами, зазнають кінцевої диференціації, аналогічно адипоцитам і епітеліальним клітинам [37, 94, 95]. Для кращого розуміння феномена втрати проліферативного потенціалу, асоційованого з диференціацією, цей процес вивчали на мезенхімних клітинах миші 3Т3 [70, 93, 94] і нормальних кератиноцитах людини [71, 95]. У клітинах 3Т3 були виявлені некінцеві та кінцеві стани диференціації, і перехід із некінцевого у кінцевий стан був експериментально охарактеризований [16, 46, 70, 92]. На додачу, біохімічні зміни специфічно асоційовані з втратою проліферативного потенціалу під час кінцевої диференціації були чітко виокремлені від тих, які беруть участь у некінцевій диференціації [93]. Започатковано вивчення змін в експресії різних антигенів під час процесу некінцевої та кінцевої диференціації у клітин миші 3Т3 і нормальних кератиноцитів людини методом Вестерн-блот аналізу. Ці дослідження [58] показали, що кількість 30-40 кД білків, визначена моноклональними антитілами проти обох гетерогенних рибонуклеарних корових білків і білка теплового шоку-90, були селективно знижені, коли клітини втрачали свій проліферативний потенціал в асоціації з термінальною диференціацією. На противагу цьому, білки, позначені як P<sup>2</sup>Ps для білків проліферативного потенціалу, наявні у відносно великих кількостях у клітинах, які зберегли свою здатність до росту. Додаткові біохімічні дослідження підтверджують висновки, що P<sup>2</sup>Ps відображають популяцію рибонуклеопротеїнів, які можуть виконувати регуляторну роль у процесингу РНК, які є важливими у визначенні проліферативного потенціалу клітини [58].

Переключення між проліферацією і диференціацією є важливим рішенням, яке має прийняти клітина, і цей процес контролюється низкою генів. Це переключення призводить до виходу клітини з клітинного циклу і початку складної програми експресії генів, яка утворює відповідний білок у відповідний час. Помилки в цьому процесі можуть призвести до ембріональної летальності чи деяких захворювань, включно з раком.

У дослідженні [49] було розглянуто мейоз клітин дріжджів як модель диференціації, увага була сфокусована на зрозумінні епігенетичного перемикання, що веде клітину дріжджів до зупинки проліферації та початку диференціації. Мейотична диференціація потребує трьох тимчасових хвиль транскрипції, загалом названих як рання, середня і пізня. Робота була сконцентрована на негативному регуляторі ранніх мейотичних генів, білку Утебр, який взаємодіє з ДНК сиквенс-специфічним шляхом із промотором ранніх мейо-

тичних генів. Тут він приєднує гістон деацетилазу, відому як Rpd3p, яка зберігає хроматин у деацетильованому стані, і внаслідок чого відбувається репресія генів. Нещодавно було виявлено, що коли клітини входять у мейоз, індукція ранніх мейотичних генів потребує деградації Umebr. Це відкриття змінило уявлення про те, що мейотична індукція ранніх мейотичних генів потребує транзиції Umebr із репресора генів на активатора генів. Коли Umebr є зруйнованим, Rpd3p дисоціює з промоторів ранніх мейотичних генів, що полегшує ацетилювання гістонів та індукцію генів. Це дає клітинам змогу прогресувати через програму мейотичної диференціації. Важливість руйнування Umebr і ацетилювання гістонів для мейотичної диференціації є найкраще висвітленим у дріжджових штамів-мутантів. У дріжджів, які мають стабілізовану форму Umebr, мейоз є відмінним. На додачу, руйнування Umebr контролюється системою, котра здатна сприймати мейоз-специфічні сигнали, які вказують на те, що клітина припинила проліферацію і диференціює. Використовуючи Umebr як відправну точку, намагаються виявити сигнальний шлях, який контролює переключення між проліферацією і диференціацією у дріжджів [49].

Гени *PASTICCINO (PAS)* необхідні для координованої клітинної проліферації та диференціації під час розвитку рослини. Проліферація та диференціація клітин рослин контролюється багатьма чинниками і, зокрема, гормонами ауксином і цитокініном. Декілька цитокінін сигнальних генів і генів ранньої відповіді були виявлені як такі, що задіяні в контролі клітинної проліферації та диференціації [32]. Приєднання цитокіну здійснюється трьома мембраноасоційованими рецепторами (AtHK2, AtHK3, і AtHK4/CRE1/WOL), схожими до двокомпонентної системи нижчих еукаріотів. На додаток, ген *CKII*, який структурно є подібним до *CRE1*, також здатний активувати цитокінін сигнальний шлях, але не зв'язує цитокінів, принаймні у фізіологічних концентраціях [38].

Гени *PAS* є негативними регуляторами проліферації клітин шляхом репресії клітинного поділу або індукування клітинної диференціації. Негативна регуляція експресії *KNAT* генами *PAS* є ймовірно задіяна у підтримці клітин у диференційованому стані, уникаючи неконтрольованої проліферації клітин і розвитку пухлин. Здатність до поділу клітин залежить від клітинної відповіді на цитокіни й ауксин. Гени *PAS* контролюють амплітуду відповідей цитокінів і ауксину, відображаючи таким чином відповідь нових регуляторів гормональної природи на контроль поділу та диференціації клітин [34].

Дослідження генетичного контролю клітинної проліферації та диференціації у процесі сперматогенезу *Drosophila* [26] показують, що припинення мітотичної проліферації та настання мейотичної програми регулюється генами *bam* і *bagn*, що функціонують у межах чоловічих гермінальних клітин та сигнального каскаду TGF- $\beta$  в оточуючих соматичних клітинах. Настання сперматидної диференціації регулюється тканиноспецифічною транскрипційною програмою, що контролюється генами *aly*, *can*, *mia* і *sa* [26].

Нещодавно дослідниками з Китаю було ідентифіковано пару транскрипційно обернено-пропорційних модулів, кожен із яких складається зі сотень генів у багато-клітинних взаємодіючих генних сітках у межах різних організмів і популяцій [40]. Два модулі асоційовані з клітинною проліферацією та диференціацією, відповідно. Модуль проліферації є консервативним в еукаріотичних організмів, тоді як модуль диференціації є специфічним для багатоклітинних організмів. Розглядаючи диференціацію у різних тканинах і клітинних лініях різних організмів, ці дослідники встановили, що експресія модуля проліферації є більш загально супресована, тоді як модуль диференціації регулюється тканино- чи видоспецифічно.

Ці результати показують, що навіть на тканинному і організмовому рівнях модулі проліферації / диференціації можуть відповідати за два альтернативні стани молекулярних

сіток і відбивати універсальні симбіотичні взаємозв'язки в багатоклітинному організмі. Авторами передбачається, що білки, які опосередковують взаємодії між цими модулями, можуть слугувати модуляторами переключення проліферації/диференціації [40].

Також вищезазначені автори вважають, що переключення, яке тимчасово розподіляє модулі проліферації чи диференціації, може також бути виявлене у мозку дорослої людини та у дорослої плодової мушки. Експресія двох модулів є добре скоординована на системному рівні. Через перевірку динаміки сіток, які взаємодіють між собою, автори виявили дві великі сітки – модулі «П» (проліферація) та «Д» (диференціація), які є транскрипційно обернено-пропорційні у дорослому організмі, як у мозку людини, так і у плодової мушки. Ці модулі наповнені генами проліферації та диференціації, відповідно, і відображають альтернативно низьку або високу експресію переключення клітинної проліферації/диференціації. Більшість генів «П» модуля є консервативні в межах вищих організмів та одноклітинних організмів, таких як дріжджі, проте більшість генів «Д» модуля відсутні в одноклітинних організмів. Таким чином, ці модулі можуть відповідати за характеристики альтернативних клітинних станів вищих організмів.

Кластер «Д» збагачений сітками циркуляції/ангіогенезу, апоптозу та іонними і нейротрансмітерними каналами, які є характерною ознакою нервової диференціації, регуляторами клітинного циклу, поверхневими клітинними рецепторами та стероїдними рецепторами. Кластер «П» збагачений генами транскрипції, ядерного та внутрішньоклітинного транспорту, клітинного циклу і клітинної рухливості. Інтерфейс «П» збагачений транскрипційними факторами, а інтерфейс «Д» збагачений генами контролю клітинного циклу, репарації ДНК, рецепторів. Усі ці процеси є важливими регуляторними механізмами в переключенні проліферації/диференціації. Частково «Д» білки включають у себе багато відомих генів-супресорів онкогенезу, таких як *BRCA-1* і *p53*, і багато рецепторів і транскрипційних регуляторів, таких, що відповідають за диференціацію нейронів (*MYC*, *TOP2B*, інтегрин, естроген, *FGF*, *PDGF*, і *TSH* рецептори). «П» інтерфейс містить гени, що стимулюють клітинну проліферацію, такі як *K-RAS*, *HDACs*, *SRF*, *CREB*, *CREBBP*, *IL4R*, і *INSR*. Він також містить гени, що інгібують функції *p53* і *BRCA-1*, такі як *PARC* і *LMO4*. Унаслідок цього авторами припускається, що модулі «П» і «Д» можуть бути асоційовані з процесами клітинної проліферації та диференціації, відповідно [40].

Перемикання між диференціацією та проліферацією було показане на мишачих міобластах C2C12 [40]. Інгібування «П-Д» поверхневого білка HDAC4 призвело до пришвидшення диференціації та інгібування проліферації, в той час як інгібування іншого поверхневого білка, SRF, мало обернений ефект. Обидва HDAC4 і SRF білки пригнічуються в ході диференціації конкурентним збільшенням диференційних маркерів і їхніми антагоністами мікроРНК. Рівні  $\alpha_5\beta_1$  інтегрину, зв'язаного з фібронектином, також контролюють переключення між проліферацією та диференціацією клітин C2C12. Переключення проліферації/диференціації також спостерігається у клітинах-попередниках нейронів, а PI3K, цАМФ, raf і MAPK-шлях, які всі задіяні у білкових взаємодіях «П/Д», є також задіяними у регуляції переключення. Ці та інші відкриття вказують на наявність переключення між проліферацією та диференціацією на клітинному рівні [40].

Спостерігається зниження «П» експресії та збільшення «Д» експресії, коли різні типи клітин мушки, щура, миші чи людини переключаються зі стану проліферації у стан диференціації внаслідок індукції різного роду зовнішніми чинниками. У цьому аналізі [40] використано попередньо опубліковані дані з диференціації клітин стромы ендометрію людини, індукованої цАМФ; міобласти C2C12 миші, гладком'язових клітин миші, індукованої ретиноїдною кислотою; інгібування проліферації та індукції диференціації

трансформуючим фактором росту з хондроцитів щура та диференціації попередників нейронів плодової мушки. Відповідно до консервативності модуля «П», «П» є більш консервативно пригнічений у процесі диференціації в різних тканинах різних організмів. Наприклад, експресія генів «П» плодової мушки супресується у всіх типах клітин. На противагу цьому, експресія модуля «Д» у мозку людини є сильно індукована в ході диференціації клітин строми ендометрію, і меншою мірою, під час диференціації клітин миші та плодової мушки, експресія генів «Д» мушки є лише сильно індукована у клітинах мушки, але меншою мірою у клітинах інших організмів. Невідомо, чи переключення клітинної проліферації/диференціації є скоординованим на тканинному й організменому рівнях, особливо в постмітотичних тканинах або серед дорослих організмів [40].

Автори також виявили, що в той час як будова модуля «П» є здебільшого однаковою і в мозку людини, і у плодової мушки, будова модуля «Д» значно відрізняється між цими двома видами. Зокрема, шляхи апоптозу містяться лише в модулі «Д» мозку людини. Маркери диференціації у модулях «Д» також відрізняються. Був проаналізований відсоток ортологів генів людини, які виявлені у дріжджів, черв'яків, мушок та мишей. Було виявлено, що 60% генів «Д» є специфічними для миші та людини і лише 8% мають дріжджове походження, в той час як 35% генів «П» мають дріжджових гомологів і менш ніж 30% є специфічними для ссавців.

Вищенаведені спостереження зазначають, що модуль «П» є більш консервативним і у одноклітинного організму – дріжджів, і у багатоклітинних організмів *C. elegans*, *Drosophila*, миші, людини, в той час як модуль «Д» є багатоклітинно-специфічним і піддається видо-специфічним, чи й, можливо, також тканинспецифічним модифікаціям.

Функціональна незалежність і різні еволюційні походження двох модулів передбачають, що модулі «П» та «Д» є два “симбіотичних колеги”, що потребують строгого контролю і координації на клітинному, тканинному та організменому рівнях, шляхом тимчасового переключення між двома фазами – проліферації та диференціації. Модулі «П» та «Д», ймовірно, є асоційовані з клітинною проліферацією та диференціацією, і супресуються чи індукуються переключенням клітинної проліферації чи диференціації, відповідаючи на альтернативні стани клітинної сітки. Можливим сценарієм антикореляції може бути тимчасове розділення біологічних функцій у клітинних сітках [40].

За допомогою статистичного аналізу було виявлено 629 послідовностей нуклеотидів у геномі, які по-різному регулювалися у проліферуючих і диференціюючих міобластах [59]. Ці гени авторами були згруповані у кластери, щоб виявити набори корегульованих генів, і були призначені функціональним категоріям, які аналізували за внеском у експресію генних кластерів. Кластери були ідентифіковані за статистично значимим внеском у категорії, які включали в себе м'язове скорочення, клітинну адгезію, функціонування позаклітинного матриксу, клітинний метаболізм, мітохондріальний транспорт, реплікацію ДНК, контроль клітинного циклу, транскрипцію мРНК та імунну відповідь [59].

Міогенна програма складається з двох розділених у часі процесів: проліферації та диференціації міобластів. Проліферуючі одноядерні міобласти, які експресують MyoD і Myf5, продовжують проліферацію за наявності мітогенів в умовах високої концентрації сироватки *in vitro*. В умовах позбавлення сироватки міобласти активують транскрипцію Міогеніну і зазнають незворотного арешту клітинного циклу, за яким іде транскрипція інгібітора циклін-залежної кінази, p21, і дефосфорилування pRb [5, 89]. Диференціація скелетних м'язів потім продовжується через індукцію експресії м'язо-специфічних генів і злиття міобластів у м'язові волокна [5, 31, 33, 63, 90].

Багато з генів, які були виявлені як диференційно регульовані транскрипти, були попередньо охарактеризовані в клітинах C2C12 або інших клітинних лініях скелетних м'язів завдяки методам транскрипції мРНК і функціонального аналізу *Igf2* [22],  $p21^{Cip1}$  (*Cdkn1a*) [33], *Bin1* [55], кавеоліну 3 (*Cav3*) [27, 84], М-кадгерину (*Cdh15*) [47, 102], *FasL* [69], декорину (*Dcn*) [68], *Idb1* [39], *Idb3* [6, 13], і ДНК метилтрансферази (*Dnmt1*) [52, 82]. Також висвітлено гени, які відіграють потенційну роль у диференціації скелетних м'язів: транскрипційний фактор *Osf2* та інші білки матриксу остеобластів, остеомодулін/остеоадгерин (*Omd*) і остеогліцин (*Ogn*). Експресія мРНК *Osf2* є збільшена внаслідок БМК лікування C2C12 клітин, що спричиняє трансформацію з міогенної до остеобластної диференціації [51]. Також виявлено високий рівень експресії генів, які задіяні в різних клітинних процесах: ангиогенезу (*MCP1*), ремоделювання тканин (*Plaur*, *Fmod*, *Col3a1*), сигнальної трансдукції (*Sgk*), хромосомної сегрегації (*Ranbp1*). Гени, які регулюють клітинний цикл фібробластів, також по-різному регулюються під час диференціації C2C12, і до них входять гени, які задіяні в контролі клітинного циклу (*Ccna2*, *Ccnb1*, *Cdc2*, *Cdkn1a*), проліферації та диференціації (*Notch3*, *Inhbb*, *Gadd45a*, *Gro1*), та гени позаклітинного матриксу (*Matn2*, *Nid2*, *Plaur*, *Hmmer*, *Tm4sf1*) [14].

При диференціації сателітних клітин можна виділити окремі фази, які характеризуються експресією різних транскрипційних факторів. Транскрипційний фактор Pax7, маркер, який широко використовують для ідентифікації сателітних клітин, експресується в сателітних клітинах у стані спокою [72]. Активовані сателітні клітини також підтримують експресію Pax7 і, крім того, експресують MyoD, члена родини міогенних регуляторних факторів. Експресія MyoD зберігається під час проліферації та ранньої диференціації [25, 30, 97, 98, 100]. Настання диференціації характеризується початком експресії Міогеніну, іншого члена родини міогенних регуляторних факторів [25, 30, 97, 98, 100]. Під час кінцевої диференціації постмітотичні нащадки сателітних клітин зливаються у м'язові волокна і починають експресувати структурні білки м'язів, такі як міозин. Грунтуючись на експресії цих транскрипційних факторів, регенеративний біогенез дорослих особин дуже нагадує ембріональну програму диференціації м'язів [51].

Фактор росту гепатоцитів (ФРГ) є одним із ключових регуляторів під час активації сателітних клітин у стані спокою. Різні дослідження показують, що ФРГ, виділений з позаклітинного м'язового матриксу негайно після поранення, сигналізує рецептору ФРГ c-met, який експресується в сателітних клітинах у стані спокою [2, 85, 86]. Експансія пулу сателітних клітин позитивно регулюється фактором росту фібробластів (ФРФ), який активує проліферацію синергічно з ФРГ [73]. Було повідомлено, що експресія рецептора 4 ФРФ перебуває на високому рівні під час активації сателітних клітин [41]. Окрім потенційної ролі під час активації сателітних клітин, ФРФ контролює проліферацію сателітних клітин *in vitro* та *in vivo* [23, 98].

Іншою важливою групою сигнальних чинників, які регулюють диференціацію сателітних клітин, є члени родини трансформуючого фактора росту  $\beta$  (TGF $\beta$ ). Tgf $\beta$ 1, найбільш охарактеризований член родини під час морфогенезу у дорослих особин, як було показано, інгібує проліферацію та диференціацію сателітних клітин *in vitro* та негативно регулює ріст і регенерацію м'язів *in vivo* [2]. Сигналізація (TGF $\beta$ ) потребує зв'язування ліганда до рецепторів I і II типу, що призводить до утворення гетеротетрамерного рецепторного комплексу. Фосфорилування молекул рецепторів типу I і II призводить до фосфорилування рецептор-регульованих SMAD білків, які утворюють гетеродимери зі спільним коактиватором Smad 4. Ці комплекси транслокуються до ядра, де вони функціонують як транскрипційні фактори, які регулюють експресію генів-мішеней TGF $\beta$  [56].



Білки морфогенезу кісток (БМК) утворюють підгрупу родини факторів росту TGF $\beta$ . БМК регулюють експресію генів-мішеней шляхом фосфорилування Smad 1, 5 і 8. Активність БМК негативно регулюється секретованими БМК інгібіторами, такими як Ноггін і Хордин, які інгібують зв'язування факторів росту з їхніми рецепторами [11]. БМК були початково виявлені за їхньою здатністю індукувати утворення кісток, коли були введені у м'язи дорослих шурів [87]. Остеогенний ефект БМК інтенсивно досліджувався на клітинах C2C12, клітинна лінія, одержана з регенеруючих м'язів миші. Клітини C2C12 утворюють багатоядерні м'язові волокна під час голодування за сироваткою, але диференціюються в остеобласти внаслідок стимулювання БМК [9, 42, 43]. З огляду на ці дослідження, сигналізація БМК не вивчалася інтенсивно в контексті біогенезу дорослих особин. На протипагу цим дослідженням на клітинних лініях, деякі дослідження виявили БМК як регуляторів ембріогенезу курчат [3, 4, 91].

Ґрунтуючись на цих відкриттях, інша група дослідників [51] проаналізувала роль БМК сигналізації під час диференціації сателітних клітин, використовуючи клітини C2C12 і первинні сателітні клітини дорослої миші. Було встановлено, що важливу роль під час диференціації сателітних клітин м'язів відіграють білки морфогенезу кісток (БМК). На відміну від біогенної клітинної лінії C2C12, первинні сателітні клітини не диференціюються в остеобласти через сигналізацію БМК. Натомість сигналізація БМК інгібує міогенну диференціацію первинних сателітних клітин *ex vivo*. На протипагу цьому, інгібування БМК сигналізації призводить до виходу з клітинного циклу і подальшої диференціації міобластів і утворення м'язових волокон. Виявлено [51] інгібітор БМК – Хордин – у культурах сателітних клітин і в регенеруючих м'язах. В обох системах експресія Хордину переважає експресії Міогеніну, маркера клітин у стані диференціації. Таким чином БМК сигналізація відіграє критичну роль у балансі між проліферацією та диференціацією активованих сателітних клітин і їхніх нащадків [23]. Початково БМК сигнали підтримують нащадків сателітних клітин у стані проліферації, збільшуючи кількість клітин. Після того, як клітини вступають у процес диференціації, у них збільшується експресія БМК інгібітору Хордину, спонукаючи кінцеву диференціацію й утворення м'язових волокон за механізмом негативного зворотного зв'язку. Таким чином, було виявлено, що БМК підтримують нащадків сателітних клітин у стані проліферації, в той час як вихід із клітинного циклу і утворення м'язових волокон індукуються інгібуванням БМК сигналізації [51].

Активізація мутацій генів, що кодуєть трансмембранні тирозин кіназні рецептори 1-3 фактора росту фібробластів і гаплонедостатність транскрипційного фактора TWIST, спричиняє у людини синдром черепного синостозу, що зазвичай вражає і вінцевий шов. Баланс проліферації-диференціації при нормальному розвитку шва включає в себе градієнт позаклітинного фактора росту фібробластів із району диференціації, в якому експресується *Fgfr1*, до мезенхіми шва, у якій низькі концентрації фактора росту фібробластів є асоційованими з експресією *Fgfr2* у остеогенних стовбурових клітинах. Експериментальне збільшення рівнів фактора росту фібробластів у шві призводить до зниження рівня експресії *Fgfr2*, підвищення експресії *Fgfr1* та остеогенного гена диференціації Остеопонтину і відміни проліферації. TWIST експресується у підшовній мезенхімі та частково експресується разом з *Fgfr2* і допомагає у збереженні проліферації через регуляцію транскрипції *Fgfr2* [47].

Клітини стегнової кістки зародка людини 12-го тижня розвитку були порівняні з мезенхімними стовбуровими клітинами кісткового мозку людини стосовно їхньої здатності проліферувати і диференціюватися в остеобласти у різних умовах культивування [69]. Коли вони культивувалися при стандартних умовах середнього  $\alpha$ MEM, PDGF і FGF-2, спостерігалася збільшена клітинна проліферація в обох типах клітин. Дослідження



їхньої здатності до диференціювання у звичайних умовах культивування показали, що клітини стегнової кістки зародка людини мали вищі рівні експресії RUNX2, OSX та інших остеогенних маркерів, порівняно з мезенхімними стовбуровими клітинами кісткового мозку людини, в той час як SOX9 експресувався на низькому рівні у обох типах клітин [69].

Сигналізація за участю білка Wnt контролює проліферацію та диференціацію клітин [64]. Використовуючи клітини C2C12, проаналізували внутрішньоклітинну сигналізацію і транскрипцію генів під час проліферації та диференціації міобластів [52]. Було підтверджено, що деякі компоненти сигналізації Wnt, включно з *Wnt9a*, *Sfrp2* і *porcupine*, були експресовані у диференційованих клітинах C2C12. FH535, інгібітор утворення комплексу  $\beta$ -катенін/Tcf, знижував базальний рівень  $\beta$ -катеніну в цитоплазмі та знижував рівень проліферації міобластів. K 252a, інгібітор протеїнкінази, підвищував рівні як цитозольного, так і мембранозв'язаного  $\beta$ -катеніну і пришвидшував злиття міобластів. Ці результати передбачають, що різні ліганди Wnt контролюють локалізацію субклітинного  $\beta$ -катеніну, який регулює проліферацію міобластів і утворення м'язових волокон. Wnt сигналізація через  $\beta$ -катенін, імовірно, є молекулярним перемикачем, який визначає перехід із проліферації клітин у міогенну диференціацію [64].

Інтегрин-опосередкована клітинна адгезія до позаклітинних матриць забезпечує сигнали, необхідні для проходження клітинного циклу та диференціації. Було показано, що субстрат-залежні зміни у конформації адсорбованого фібронектину регулювали зв'язування інтегрину та контролювали переключення між проліферацією та диференціацією [39]. Переключення між проліферацією та диференціацією контролювалося рівнями  $\alpha 5\beta 1$ , інтегрину зв'язаного з фібронектином, і диференціація інгібувалася анти- $\alpha 5\beta 1$ -інтегрином, завдяки чому автори припускають відмінність інтегрин-опосередкованих сигнальних шляхів. Контроль клітинної проліферації та диференціації через конформаційні зміни білків позаклітинного матриксу відображає гнучкий механізм для виявлення специфічних клітинних відповідей для біологічних і біотехнологічних застосувань [39].

## II. Вплив мембранного потенціалу на проліферацію та диференціацію

Потоки іонів є потужними сигналами, завдяки яким регулюється клітинна проліферація, диференціація та міграція у регенераційному й ембріональному морфогенезі [81]. В основі складних процесів розвитку тканин і їхньої регенерації лежать клітинні події, такі як проліферація, міграція та диференціація, які, у свою чергу, регулюються біофізичною сигналізацією [80]. Наприклад, у дослідженні регуляції клітинного циклу у фібробластах активність  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  обмінника спричинила зростання внутрішньоклітинного рН, який регулював тривалість переходу  $G_2/M$  у клітинному циклі, та як наслідок відбувалася клітинна проліферація [66]. У моделі загоєння ран у кизилу ендогенні електричні поля регулювали і клітинну міграцію [103], і частоту клітинного поділу [76]. Одним із вагомих застосувань біофізичної сигналізації є контроль поведінки стовбурових клітин. Дослідження показали, що стовбурові клітини мають унікальні електрофізіологічні профілі в недиференційованому стані [7, 10, 29, 35, 88]. Більш цікавим є те, що іонні потоки і канали, як було виявлено, відіграють важливу роль під час диференціації стовбурових клітин міобластів, кардіоміоцитів і нейронів [7, 15, 44, 79, 88], хоча здатність цих електричних сигналів діяти як функціональний механізм біофізичного контролю у біології стовбурових клітин є малозрозумілим. Більше того, не є відомим, чи процес диференціації стовбурових клітин контролюється електричними полями, локалізованими рН та іонними градієнтами, чи змінами трансмембранного потенціалу, які виникли внаслідок активності іонних каналів і помп.

Було досліджено зміну мембранного потенціалу в мезенхімних стовбурових клітинах мозку, які зазнають адипогенної чи остеогенної диференціації, і виявлено характерну гіперполяризацію диференційованих клітин порівняно з недиференційованими [80]. Проліферуючі та відносно недозрілі клітини (такі, як у ембріона) мають сильно депольаризовані мембранні потенціали, в той час як повністю диференційовані клітини у стані спокою показують сильно гіперполяризовані мембранні потенціали [81]. Так як стовбурові клітини прямують із їхнього недиференційованого стану до визначеного фенотипу, їхні мембранні потенціали змінюються з величин, які є характерними для клітин, що розвиваються до рівнів, які спостерігаються у повністю диференційованих соматичних клітин. Зміна прогресивної поляризації через фармакологічну зміну трансмембранного потенціалу показала, що депольаризація мезенхімних стовбурових клітин людини запобігає диференціації. Отже, гіперполяризація відіграє важливу роль у диференціації та дозріванні як збудливих, так і незбудливих клітин [80].

Біофізична сигналізація, інтегральний регулятор довготривалої клітинної поведінки як у збудливих, так і у незбудливих типів клітин, надає величезні можливості для зміни важливих клітинних функцій. Було розглянуто [10, 35, 88] декілька прикладів, що підтверджують функціональну роль трансмембранного потенціалу (ТМП) у регуляції проліферації та диференціації. Цікавим є те, що різні типи контролю ТМП були знайдені у багатьох ракових клітин і попередників клітинних систем, які є відомі за їхніми здатностями до проліферації та диференціації, відповідно. Разом узяті, ці дані демонструють, що біоелектричні властивості можуть слугувати як маркери для характеристики клітин і можуть контролювати мітотичну активність, прогресію клітинного циклу та диференціацію [81].

Вже давно спостерігали, що рівні ТМП сильно корелюють із подіями, пов'язаними з клітинною проліферацією: мітоз, синтез ДНК і загальна прогресія клітинного циклу [76]. Потенціали спокою різних типів клітин лежать у широких межах (загалом від -10 мВ до -90 мВ), і стан клітин упродовж таких значень ТМП загалом відповідає їхньому проліферативному потенціалу [8]. Соматичні клітини, які мають високий рівень поляризації (гіперполяризований ТМП) схильні до перебування у стані спокою і зазвичай не зазнають мітозу. На противагу цьому, клітини, які розвиваються, та ракові клітини мають низький рівень поляризації (деполяризований ТМП) і є мітотично активними [8, 19]. На додачу, клітини, які перенесли до культури *in vitro* зі середовища *in vivo*, схильні зазнавати спонтанної проліферації, яка супроводжується депольаризацією ТМП [20]. Схожим чином проліферація, індукована злоякісним перетворенням соматичних клітин, також супроводжується депольаризацією [20].

Було припущено [19], що ця кореляція вказує на функціональний зв'язок між ТМП і рівнем мітотичної активності: трансмембранний потенціал у непроліферуючих клітин може виступати інгібаторним сигналом мітозу (або ж подій, що передують мітозу), і який, у свою чергу, може бути змінений до рівня, необхідного для проліферації [19]. Можливим поясненням цього явища може бути те, що високополяризований рівень ТМП блокує соматичні клітини у стані спокою, які перебувають у фазі  $G_1$  клітинного циклу від входження в фазу S синтезу ДНК, і тим самим інгібуючи мітоз [19]. Відомо, що більшість непроліферуючих клітин мають відносно гіперполяризований (більш негативний) ТМП, в той час як проліферуючі та ракові клітини мають відносно депольаризований (менш негативний) ТМП. Висловлено припущення, що, можливо, існує пороговий рівень ТМП, який слугує межею чи пусковим механізмом синтезу ДНК [8].

Клітинна проліферація – це багатоетапний процес, який регулюється системою контрольних точок на різних фазах клітинного циклу. Про таку складність повідомлялося

в більш ранніх роботах [8, 19, 20], присвячених ролі ТМП у проліферації. Ці роботи дали змогу краще зрозуміти головні іонні канали та потоки, які задіяні в ТМП, на рівні зі стадієспецифічною регуляцією клітинного циклу. Багато з цих досліджень виділяли  $K^+$  потоки як протагоністів проліферації та прогресії клітинного циклу. Кореляція між інгібуванням  $K^+$  каналів та інгібуванням проліферації була показана на великій кількості типів клітин, включно з лімфоцитами, мононуклеарними клітинами периферичної крові, лімфоною, меланоною, коричневими жировими клітинами, шваннівськими клітинами, астроцитами, олігодендроцитами, нейробластомою, клітинами раку легень, грудей і жовчного міхура [54, 96]. У більшості організмів зміни  $K^+$  потоків зумовлюють проліферацію внаслідок деполяризації, хоча є випадки, коли деполяризація інгібує проліферацію [19]. Регуляція проліферації та прогресії клітинного циклу тісно пов'язана з диференціацією, оскільки клітини мають регулювати свій вихід із клітинного циклу з ініціацією своєї диференційної програми [81]. Отже, оскільки ТМП регулюють проліферацію у багатьох типах клітин, ТМП-регульовані сигнали можуть також виступати в ролі відправних точок для диференціації. Донедавна більшість робіт у цій сфері була сфокусована на порівнянні електрофізіологічних профілів диференційованих і недиференційованих клітин. Характерні зміни в експресії  $Na^+$  і  $K^+$  каналів та іонних потоків були також виявлені як такі, що супроводжують нейронну диференціацію інших стовбурово-подібних типів клітин, таких як нейронні стовбурово-подібні клітини з пуповинної крові людини [79], іморталізовані нейронні стовбурові клітини людини [15] і мезенхімні стовбурові клітини людини [12]. Електрофізіологічні зміни відіграють функціональну роль у диференційних процесах. Кілька нещодавніх досліджень [12, 44, 53, 79] показали, що ендогенна модуляція ТМП справді відіграє важливу роль під час диференціації клітин і їхнього дозрівання. Наприклад, гіперполяризація ТМП не лише передуює диференціації міобластів людини, але є також необхідною для диференціації, оскільки злиття міоцитів і активність транскрипційних факторів є заблокована, якщо гіперполяризація теж заблокована [44, 53]. Це подія, яку можна виявити найраніше у диференційних процесах, і вважається, що вона є відправною точкою диференціації міобластів [44]. Нещодавно було показано схожий зв'язок між ТМП і схильністю до диференціації у мезенхімних стовбурових клітинах людини, одержаних із кісткового мозку. Подібно до того, що було виявлено для диференціації міобластів людини і гранулярних клітин мозочка, а також згідно з гіпотезою Binggeli and Weinstein [8], про рівні ТМП у клітинах, що розвиваються, і у клітинах в стані спокою, мезенхімні стовбурові клітини людини зазнають гіперполяризації як під час остеогенної, так і під час адипогенної диференціації [80]. Більш важливим є те, що гіперполяризація, як було виявлено, необхідна для диференціації. Коли нормальна прогресія ТМП була перервана деполяризацією, спричиненою високою концентрацією  $K^+$  чи уабаїну, маркери остеогенної і адипогенної диференціації значно знизилися. Тим самим припускається супресія чи відміна диференціації під впливом умов деполяризації ТМП [80]. На противагу цьому, під час остеогенної диференціації вплив агентами гіперполяризації, такими як пінацидил чи діазоксид, індукував відновлення експресії генів розвитку кістки [80]. Ці експерименти з деполяризацією та гіперполяризацією показують, що мезенхімні стовбурові клітини людини є чутливими до двосторонніх змін у ТМП і забезпечують безсумнівну очевидність важливої ролі ТМП у диференціації мезенхімних стовбурових клітин людини. Таким чином, ці дані передбачають, що гіперполяризація є функціональною детермінантою диференціації мезенхімних стовбурових клітин людини [80, 81].

Переключення між проліферацією і диференціацією є важливим рішенням, яке має прийняти клітина, і цей процес регулюється за участі низки генів. Це переключення

призводить до виходу клітини з клітинного циклу і початку складної програми експресії генів, яка утворює відповідний білок у відповідний час. У клітинах існують складні системи контролю переключення між проліферацією та диференціацією як на генному, так і на мембранному рівнях. Контроль на генному рівні здійснюється завдяки експресії ряду генів, білків і транскрипційних факторів, а на мембранному – через зміну мембранного потенціалу.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Allen R. E., Boxhorn L. K. Regulation of skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by transforming growth factor-beta, insulin-like growth factor I, and fibroblast growth factor // *J. Cell. Physiol.* 1989. Vol. 138. N 2. P. 311–315.
2. Allen R. E., Sheehan S. M., Taylor R. G. Hepatocyte growth factor activates quiescent skeletal muscle satellite cells in vitro // *J. Cell. Physiol.* 1995. Vol. 165. N 2. P. 307–312.
3. Amthor H., Christ B., Weil M. The importance of timing differentiation during limb muscle development // *Current Biology.* 1998. Vol. 8. N 11. P. 642–652.
4. Amthor H., Christ B., Patel K. A molecular mechanism enabling continuous embryonic muscle growth – a balance between proliferation and differentiation // *Development (Cambridge, England).* 1999. Vol. 1265. P. 1041–1053.
5. Andres V., Walsh K. Myogenin expression, cell cycle withdrawal, and phenotypic differentiation are temporally separable events that precede cell fusion upon myogenesis // *J. Cell. Biol.* 1996. Vol. 132. P. 657–666.
6. Atherton G. T., Travers H., Deed R. Regulation of cell differentiation in C2C12 myoblasts by the Id3 helix-loop-helix protein // *Cell Growth Differ.* 1996. Vol. 7. P. 1059–1066.
7. Biagiotti T. Cell renewing in neuroblastoma: Electrophysiological and immunocytochemical characterization of stem cells and derivatives // *Stem Cells.* 2006. Vol. 24. P. 443–453.
8. Binggeli R., Weinstein R. C. Membrane potentials and sodium channels: Hypotheses for growth regulation and cancer formation based on changes in sodium channels and gap junctions // *J. Theoretical Biol.* 1986. Vol. 123. P. 377–401.
9. Blau H. M., Chiu C. P., Webster C. Cytoplasmic activation of human nuclear genes in stable heterocaryons // *Cell.* 1983. Vol. 32. N 4. P. 1171–1180.
10. Cai J. Membrane properties of rat embryonic multipotent neural stem cells // *J. Neurochem.* 2004. Vol. 88. P. 212–226.
11. Canalis E., Economides A.N., Gazzero E. Bone Morphogenetic Proteins, Their Antagonists, and the Skeleton // *Endocr Rev.* 2003. Vol. 24. N 2. P. 218–235.
12. Chafai M., Louiset E., Basille M. PACAP and VIP promote initiation of electrophysiological activity in differentiating embryonic stem cells // *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2006. Vol. 1070. P. 185–189.
13. Chen B., Han B. H., Sun X. H. Inhibition of muscle-specific gene expression by Id3: requirement of the C-terminal region of the protein for stable expression and function // *Nucleic Acids Res.* 1997. Vol. 25. P. 423–430.
14. Cho R. J., Huang M., Campbell M. J. Transcriptional regulation and function during the human cell cycle // *Nat Genet.* 2001. Vol. 27. P. 48–54.
15. Cho T. Human neural stem cells: Electrophysiological properties of voltage-gated ion channels // *NeuroReport.* 2002. Vol. 13. P. 1447–1452.
16. Choi Y. D., Grabowski P. J., Sharp P. A. Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins: role in RNA splicing // *Sci.* 1986. Vol. 231. P. 1534–1539.

17. Coats S., Flanagan W. M., Nourse J. Requirement of p27Kip1 for restriction point control of the fibroblast cell cycle // *Sci.* 1996. Vol. 272. P. 877–880.
18. Coila B. Cell differentiation and proliferation biology // *Biol.* 2009. Vol. 32. P. 241–250.
19. Cone C. D. Unified theory on the basic mechanism of normal mitotic control and oncogenesis // *J. Theoretical Biol.* 1971. Vol. 30. P. 151–181.
20. Cone C. D., Cone C. M. Induction of mitosis in mature neurons in central nervous system by sustained depolarization // *Sci.* 1976. Vol. 192. P. 155–158.
21. De Nooij J. C., Letendre M. A., Hariharan I. K. A cyclin-dependent kinase inhibitor, Dacapo, is necessary for timely exit from the cell cycle during *Drosophila* embryogenesis // *Cell.* 1996. Vol. 87. P. 1237–1247.
22. Florini J. R., Ewton D. Z., Coolican S. A. Growth hormone and the insulin-like growth factor system in myogenesis // *Endocr Rev.* 1996. Vol. 17. P. 481–517.
23. Floss T., Arnold H. H., Braun T. A role for FGF-6 in skeletal muscle regeneration // *Genes Dev.* 1997. Vol. 11. N 16. P. 2040–2051.
24. Friedrichs M., Flohe S., Schneider S. BMP signaling balances proliferation and differentiation of muscle satellite cell descendants // *BMC Cell Biol.* 2011. Vol. 12. N 26. P. 241–256.
25. Füchtbauer E. M., Westphal H. MyoD and myogenin are coexpressed in regenerating skeletal muscle of the mouse // *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists.* 1992. Vol. 193. N 1. P. 34–39.
26. Fuller M. T. Genetic control of cell proliferation and differentiation in *Drosophila* spermatogenesis // *Semin Cell Dev Biol.* 1998. Vol. 9. N 4. P. 433–444.
27. Galbiati F., Volonte D., Chu J. B. Transgenic overexpression of caveolin-3 in skeletal muscle fibers induces a Duchenne-like muscular dystrophy phenotype // *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000. Vol. 97. P. 9689–9694.
28. Garcia A. J., Vega M. D., Boettiger D. Modulation of cell proliferation and differentiation through substrate-dependent changes in fibronectin conformation // *Mol. Biol. Cell.* 1999. Vol. 10. N 3. P. 785–798.
29. Gersdorff M., Korsgaard P. Identification of a novel voltage-gated Na<sup>+</sup> channel rNav1.5a in the rat hippocampal progenitor stem cell line HiB5 // *Pflugers Archiv European J. Physiol.* 2001. Vol. 443. P. 18–30.
30. Grounds M. D., Garrett K. L., Lai M. C. Identification of skeletal muscle precursor cells in vivo by use of MyoD1 and myogenin probes // *Cell and Tissue Research.* 1992. Vol. 267. N 1. P. 99–104.
31. Guo K., Wang J., Andres V. MyoD-induced expression of p21 inhibits cyclin-dependent kinase activity upon myocyte terminal differentiation // *Mol. Cell. Biol.* 1995. Vol. 15. P. 3823–3829.
32. Haberer G., Kieber J. J. Cytokinins: new insights into a classic phytohormone // *Plant Physiol.* 2002. Vol. 128. P. 354–362.
33. Halevy O., Novitsch B. G., Spicer D. B. Correlation of terminal cell cycle arrest of skeletal muscle with induction of p21 by MyoD // *Sci.* 1995. Vol. 267. P. 1018–1021.
34. Harrar Y., Bellic Y., Bellini C. Hormonal control of cell proliferation requires PASTICCINO genes // *Plant Physiol.* 2003. Vol. 132. N 3. P. 1217–1227.
35. Heubach J. F. Electrophysiological properties of human mesenchymal stem cells // *J. Physiol.* 2004. Vol. 554. P. 659–672.
36. Ho L., Ronan J., Wu J. An embryonic stem cell chromatin remodeling complex, esBAF, is essential for embryonic stem cell self-renewal and pluripotency // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2009. V. 106. N 13. P. 5181–5186.
37. Holtzer H., Pacifi M., Tapscott S. Lineages in cell differentiation and cell transformation, in expression of differentiated functions in cancer cells // *Raven Press, NY.* 1982. Vol. 5. P. 169–180.



38. *Hwang I., Sheen J.* Two-component circuitry in Arabidopsis cytokinin signal transduction // *Nature*. 2001. Vol. 413. P. 383–389.
39. *Jen Y., Weintraub H., Benezra R.* Overexpression of Id protein inhibits the muscle differentiation program: in vivo association of Id with E2A proteins // *Genes Dev*. 1992. Vol. 6. P. 1466–1479.
40. *Kai X., Dong D., Shanshan Z.* Identification of proliferation/differentiation switch in the cellular network of multicellular organisms // *Plos Computational Biology*. 2006. Vol. 4. P. 124–148.
41. *Kastner S., Elias M. C., Rivera A. J.* Gene Expression Patterns of the Fibroblast Growth Factors and Their Receptors During Myogenesis of Rat Satellite Cells // *J. Histochemistry and Cytochemistry*. 2000. Vol. 48. N 8. P. 1079–1096.
42. *Katagiri T., Yamaguchi A., Komaki M.* Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage // *J. Cell Biol*. 1994. Vol. 127. N 6. P. 1755–1766.
43. *Katagiri T., Akiyama S., Namiki M.* Bone morphogenetic protein-2 inhibits terminal differentiation of myogenic cells by suppressing the transcriptional activity of MyoD and myogenin // *Exp. Cell Res*. 1997. Vol. 230. N 2. P. 342–351.
44. *Konig S.* Membrane hyperpolarization triggers myogenin and myocyte enhancer factor-2 expression during human myoblast differentiation // *J. Biol. Chem*. 2004. Vol. 279. P. 28187–28196.
45. *Krattinger N., Applegate L., Biver E.* Regulation of proliferation and differentiation of human fetal bone cells // *European Cells and Materials*. 2011. Vol. 21. P. 46–58.
46. *Krawisz B. R., Scott R. E.* Coupling of preadipocyte growth arrest and differentiation. I. Induction by heparinized medium containing human plasma // *J. Cell Biol*. 1982. Vol. 94. P. 394–399.
47. *Kuch C., Winnekendonk D., Butz S.* M-cadherin-mediated cell adhesion and complex formation with the catenins in myogenic mouse cells // *Exp. Cell Res*. 1997. Vol. 232. P. 331–338.
48. *Lane M. E., Sauer K., Wallace K.* Dacapo, a cyclin-dependent kinase inhibitor, stops cell proliferation during Drosophila development // *Cell*. 1996. Vol. 87. P. 1225–1235.
49. *Law M.* Do epigenetic switches determine cell fate? // *UMDNJ Research*. 2008. Vol. 4. P. 23–29.
50. *Lee M. H., Reynisdottir I., Massague J.* Cloning of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution // *Genes Dev*. 1995. Vol. 9. P. 639–649.
51. *Lee M. H., Javed A., Kim H. J.* Transient upregulation of CBFA1 in response to bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor  $\beta$ 1 in C2C12 myogenic cells coincides with suppression of the myogenic phenotype but is not sufficient for osteoblast differentiation // *J. Cell Biochem*. 1999. Vol. 73. P. 114–125.
52. *Liu Y., Sun L., Jost J. P.* In differentiating mouse myoblasts DNA methyltransferase is posttranscriptionally and posttranslationally regulated // *Nucleic Acids Res*. 1996. Vol. 24. P. 2718–2722.
53. *Liu J. H., Bijlenga P., Fisher-Lougheed J.* Role of an inward rectifier K<sup>+</sup> current and of hyperpolarization in human myoblast fusion // *J. Physiol*. 1998. Vol. 510. P. 467–476.
54. *MacFarlane S. N., Sontheimer H.* Changes in ion channel expression accompany cell cycle progression of spinal cord astrocytes // *GLIA*. 2000. Vol. 30. P. 39–48.
55. *Mao N. C., Steingrimsson E., DuHadaway J.* The murine Bin1 gene functions early in myogenesis and defines a new region of synteny between mouse chromosome 18 and human chromosome 2 // *Genomics*. 1999. Vol. 56. P. 51–58.



56. *Massagué J., Seoane J., Wotton D.* Smad transcription factors // *Genes Dev.* 2005. Vol. 19. N 23. P. 2783–2810
57. *Matsuoka S., Edwards M.C., Bai C.* p57KIP2, a structurally distinct member of the p21CIP1 Cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene // *Genes Dev.* 1995. Vol. 9. P. 650–662.
58. *Minoo P., Sullivan W., Solomon L.* Loss of Proliferative Potential during Terminal Differentiation Coincides with the Decreased Abundance of a Subset of Heterogeneous Ribonuclear Proteins // *J. Cell Biol.* 1989. Vol. 109. N 5. P. 1937–1946.
59. *Moran J., Li Y., Hill A.* Gene expression changes during mouse skeletal myoblast differentiation revealed by transcriptional profiling // *Physiological Genomics.* 2002. Vol. 10. N 2. P. 103–111.
60. *Morgan D. O.* Principles of CDK regulation // *Nature.* 1995. Vol. 374. P. 131–134.
61. *Morris-Kay G. M., Iseki S., Johnson D.* Genetic control of cell proliferation-differentiation balance in the developing skull vault // *Novartis Foundation Symposium.* 2001. Vol. 232. P. 102–116.
62. *Nourse J., Firpo E., Flanagan W. N.* Interleukin-2-mediated elimination of the p27Kip1 cyclin-dependent kinase inhibitor prevented by rapamycin // *Nature.* 1994. Vol. 372. P. 570–573.
63. *Parker S. B., Eichele G., Zhang P.* p53-independent expression of p21 Cip1 in muscle and other terminal differentiating cells // *Sci.* 1995. Vol. 267. P. 1024–1027.
64. *Pei Y., Brun S., Markant S.* Wnt signaling increases proliferation and impairs differentiation of stem cells in the developing cerebellum // *Development.* 2012. Vol. 139. P. 1724–1733.
65. *Polyak K., Kato J. Y., Solomon M. J.* p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest // *Genes Dev.* 1994. Vol. 8. P. 9–22.
66. *Putney L. K.* Na-H Exchange-dependent Increase in Intracellular pH Times G2/M Entry and Transition // *J. Biol. Chem.* 2003. Vol. 278. P. 44645–44649.
67. *Ravasi T.* The transcriptional network that controls growth arrest and differentiation in a human myeloid leukemia cell line // *Nature Genetics.* 2009. Vol. 41. P. 553–562.
68. *Riguelme C., Larrain J., Schonherr E.* Antisense inhibition of decorin expression in myoblasts decreases cell responsiveness to transforming growth factor  $\beta$  and accelerates skeletal muscle differentiation // *J. Biol. Chem.* 2001. Vol. 276. P. 3589–3596.
69. *Sandri M., Sandri C., Brun B.* Inhibition of FasL sustains phagocytic cells and delays myogenesis in regenerating muscle fibers // *J. Leukoc. Biol.* Vol. 69. P. 482–489.
70. *Scott R. E., Hoed B. J., Wille J. J.* Coupling of proadipocyte growth arrest and differentiation. II. A cell cycle model for the physiological control of cell proliferation // *J. Cell Biol.* 1982. Vol. 94. P. 400–405.
71. *Scott R. E., Wilke M. S., Wille J. J.* Human squamous carcinoma cells express complex defects in the control of proliferation and differentiation // *Am. J. Pathol.* 1988. Vol. 133. P. 374–380.
72. *Seale P., Sabourin L.A., Girgis-Gabardo A.* Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells // *Cell.* 2000. Vol. 102. N 6. P. 777–786.
73. *Sheehan S. M., Allen R. E.* Skeletal muscle satellite cell proliferation in response to members of the fibroblast growth factor family and hepatocyte growth factor // *J. Cell Physiol.* 1999. Vol. 181. N 3. P. 499–506.
74. *Sherr C. J., Roberts J. M.* Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases // *Genes Dev.* 1995. Vol. 9. P. 1149–1163.
75. *Sidhu R. S.* Two-dimensional electrophoretic analyses of proteins synthesized during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes // *J. Biol. Chem.* 1979. Vol. 254. P. 11111–11118.

76. *Song B.* Electrical cues regulate the orientation and frequency of cell division and the rate of wound healing in vivo // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2002. Vol. 99. P. 13577–13582.
77. *Spelsberg T. C., Knowler J. T., Moses H. L.* Specific methods for the isolation of nuclei from chick oviduct // Methods Enzymol. 1974. Vol. 31. P. 263–279.
78. *Stein L. J., Lian J. B., Stein J. S.* Control of cell cycle regulated histone genes during proliferation and differentiation // Int. J. Obes Relat Metab Disord. 1996. Vol. 3. P. 84–90.
79. *Sun W.* Voltage-sensitive and ligand-gated channels in differentiating neural stem-like cells derived from the nonhematopoietic fraction of human umbilical cord blood // Stem Cells. 2005. Vol. 23. P. 931–945.
80. *Sundelacruz S., Levin M., Kaplan D.* Membrane Potential Controls Adipogenic and Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells // PLoS ONE. 2008. Vol. 3. N 11. P. 325–342.
81. *Sundelacruz S., Levin M., Kaplan D.* Role of Membrane Potential in Regulation of Cell Proliferation and Differentiation // Stem Cell Rev and Rep. 2009. Vol. 5. P. 231–246.
82. *Takagi H., Tajima S., Asano A.* Overexpression of DNA methyltransferase in myoblast cells accelerates myotube formation // Eur. J. Biochem. 1995. Vol. 231. P. 282–291.
83. *Tanaka S., Terada K., Nohno T.* Canonical Wnt-signaling is involved in switching from cell proliferation to myogenic differentiation of mouse myoblast cells // J. Molecular Signaling. 2011. Vol. 6. N 12. P. 114–127.
84. *Tang Z., Scherer P.E., Okamoto T.* Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle // J. Biol. Chem. 1996. Vol. 271. P. 2255–2261.
85. *Tatsumi R., Anderson J. E., Nevoret C. J.* HGF/SF Is Present in Normal Adult Skeletal Muscle and Is Capable of Activating Satellite Cells // Dev. Biol. 1998. Vol. 194. N 1. P. 114–128.
86. *Tatsumi R., Hattori A., Ikeuchi Y.* Release of Hepatocyte Growth Factor from Mechanically Stretched Skeletal Muscle Satellite Cells and Role of pH and Nitric Oxide // Molecular Biology of the Cell. 2002. Vol. 13. № 8. P. 2909–2918.
87. *Urist M. R.* Bone: formation by autoinduction // Science (New York, NY). 1965. Vol. 150. N 698. P. 893–899.
88. *Van Kempen M. J.* Expression of the electrophysiological system during murine embryonic stem cell cardiac differentiation // Cell. Physiol. Biochem. 2003. Vol. 13. P. 263–270.
89. *Walsh K., Perlman H.* Cell cycle exit upon myogenic differentiation // Curr Opin Genet Dev. 1997. Vol. 7. P. 597–602.
90. *Wang J., Walsh K.* Resistance to apoptosis conferred by Cdk inhibitors during myocyte differentiation // Sci. 1996. Vol. 273. P. 359–361.
91. *Wang H., Noulet F., Edom-Vovard F.* Bmp signaling at the tips of skeletal muscles regulates the number of fetal muscle progenitors and satellite cells during development // Dev. Cell. 2010. Vol. 18. N 4. P. 643–654.
92. *Wier M. L., Scott R. E.* A proliferin: A human plasma protein that induces the irreversible loss of proliferative potential associated with terminal differentiation // Am. J. Pathol. 1986. Vol. 125. P. 646–654.
93. *Wier M. L., Scott R. E.* Polypeptide changes associated with loss of proliferative potential during the terminal event in differentiation // J. Cell. Biochem. 1987. Vol. 33. P. 137–150.
94. *Wier M. L., Scott R. E.* Regulation of the terminal event in cellular differentiation. Biological mechanisms of the loss of proliferative potential // J. Cell Biol. 1986. Vol. 1. P. 1955–1964.
95. *Wille J. J., Pittelkow M. R., Shipley G. D.* Integrated control of growth and differentiation of normal human prokeratinocytes cultured in serum-free medium: clonal analyses, growth

- kinetics, and cell cycle studies // *J. Celt. Physiol.* 1984. Vol. 121. P. 31–44.
96. *Wonderlin W. F., Strobl J. S.* Potassium channels, proliferation and G1 progression // *J. Membrane Biology.* 1996. Vol. 154. P. 91–107.
97. *Yablonka-Reuveni Z., Rivera A. J.* Temporal expression of regulatory and structural muscle proteins during myogenesis of satellite cells on isolated adult rat fibers // *Dev. Biol.* 1994. Vol. 164. N 2. P. 588–603.
98. *Yablonka-Reuveni Z., Seger R., Rivera A. J.* Fibroblast Growth Factor Promotes Recruitment of Skeletal Muscle Satellite Cells in Young and Old Rats // *J. Histochemistry and Cytochemistry.* 1999. Vol. 47. N 1. P. 23–42.
99. *Yan Y., Frisen J., Lee M. H.* Ablation of the CDK inhibitor p57Kip2 results in increased apoptosis and delayed differentiation during mouse development // *Genes Dev.* 1997. Vol. 11. P. 963–973.
100. *Zammit P. S., Golding J. P., Nagata Y.* Muscle satellite cells adopt divergent fates: a mechanism for self-renewal // *J. Cell Biol.* 2004. Vol. 166. N 3. P. 347–357.
101. *Zavitz K., Zipursky L.* Controlling cell proliferation in differentiating tissues: genetic analysis of negative regulators of G1-S-phase progression // *Current Opinion in Cell Biology.* 1997. Vol. 9. P. 773–781.
102. *Zeschnigk M., Kozian D., Kuch C.* Involvement of M-cadherin in terminal differentiation of skeletal muscle cells // *J. Cell Sci.* 1995. Vol. 108. P. 2973–2981.
103. *Zhao M.* Electrical signals control wound healing through phosphatidylinositol-3-OH kinase- $\gamma$  and PTEN // *Nature.* 2006. Vol. 442. P. 457–460.

*Стаття: надійшла до редакції 05.02.13*

*доопрацьована 01.04.13*

*прийнята до друку 26.06.13*

## **ROLE OF TRANSMEMBRANE POTENTIAL AND CYCLIN-DEPENDENT KINASES IN CONTROL OF CELL PROLIFERATION AND DIFFERENTIATION**

**I. Stadnyk**

*Ivan Franko National University of Lviv  
4, Hrushevskiyi St., Lviv 79005, Ukraine  
e-mail: irysjastadnyk@gmail.com*

The review deals with the main mechanisms of switching between proliferation and differentiation of different cell types of living organisms. The emphasis is on genetic mechanisms controlling proliferation and differentiation as well as the role of cell's membrane potential changes in cell's ability to switch from proliferation to differentiation.

*Keywords:* proliferation, differentiation, genetic controlling systems, transmembrane potential.

---

**РОЛЬ ТРАНСМЕМБРАННОГО ПОТЕНЦИАЛА И ЦИКЛИН-ЗАВИСИМЫХ  
КИНАЗ В КОНТРОЛЕ ПРОЛИФЕРАЦИИ И ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ КЛЕТОК**

**И. Стадник**

*Львовский национальный университет имени Ивана Франко  
ул. Грушевского, 4, 79006, Украина  
e-mail: irysjastadnyk@gmail.com*

В обзоре рассмотрены основные механизмы переключения между процессами пролиферации и дифференциации в клетках различных видов живых организмов. Сосредоточено внимание на генетических системах контроля процессов пролиферации и дифференциации, а также на роли изменения мембранного потенциала клетки в возможности ее перехода из состояния пролиферации в состояние дифференциации.

*Ключевые слова:* пролиферация, дифференциация, генетические системы контроля, трансмембранный потенциал.

## ЛКУВАЛЬНО-ПРОФІЛАКТИЧНІ ПРЕПАРАТИ БАКТЕРІОФАГІВ

**Є. Воробей, О. Воронкова, О. Сірокваша, А. Вінніков**

*Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара  
пр. Гагаріна, 72, Дніпропетровськ 49010, Україна  
e-mail: elizaveta.vorobey@mail.ru*

Огляд присвячено питанням сучасного стану виробництва та використання лікувально-профілактичних препаратів бактеріофагів як антибактеріальних засобів. Необхідність розгляду даних питань виникає через значне поширення стійкості клінічних ізолятів бактерій до антибіотиків, що призводить до зниження ефективності антибіотичної терапії в цілому. Оглянуто питання про історичні аспекти виробництва і використання препаратів бактеріофагів, проаналізовано відомості про механізм взаємодії, ефективність застосування фагових препаратів та існуючі проблеми у лікуванні фагами уражень, викликаних плівкоутворюючими штамми бактерій. Представлені дані розкривають можливість використання лікувальних препаратів бактеріофагів як перспективних препаратів для практичної охорони здоров'я.

*Ключові слова:* антибіотикорезистентність, бактеріофаг, виробництво, плівкоутворення, фаготерапія.

Стійкість до антимікробних препаратів продовжує бути однією з основних причин зростання захворюваності і смертності. Найголовнішим чинником, що сприяє проблемі розповсюдження стійких до антибіотиків збудників інфекцій, є широке безконтрольне застосування антибіотиків [61].

Нераціональне застосування антибактеріальних препаратів, особливо антибіотиків широкого спектра дії, які дедалі частіше застосовуються в реанімаційних відділеннях, пологових будинках, дитячих поліклініках і на власний розсуд досить часто вживаються населенням з лікувальною та профілактичною метою без призначення лікаря, без визначення чутливості й дотримання доз та схем лікування, призвели до широкого розповсюдження антибіотикорезистентних штамів. Згадані обставини сприяють штучній селекції умовно-патогенних мікроорганізмів із множинною антибіотикорезистентністю. Крім того, антибіотики пригнічують ріст нормальної мікрофлори, що сприяє посиленому розмноженню бактерій, які набули стійкості до антибіотиків [19]. За оцінкою Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ), на сьогодні близько 60% мікробів нечутливі до основних антибактеріальних препаратів, а через 10–20 років практично всі існуючі мікроорганізми можуть стати резистентними до антибіотиків [10].

У зв'язку із поширенням лікарської резистентності патогенних мікроорганізмів до антибіотиків і з різким зниженням темпів розробки та комерціалізації нових антибактеріальних препаратів за останні 20 років інтерес до фаготерапії різко зріс як у вітчизняній, так і в західній медицині [42, 50].

Нині багато лікарів намагаються змінити концепцію лікування інфекційних захворювань. Учені, що працюють у галузі медичної мікробіології, звертають увагу на майже забуту фаготерапію – напрям лікування інфекційних захворювань препаратами бактеріофагів. Останні можуть впливати на антибіотикостійкі штами бактерій. Основні позитивні властивості бактеріофагів – висока чутливість бактерій до них, відсутність

протипоказань до фагопрофілактики та фаготерапії для макроорганізмів. Крім того, використання фагів одночасно з антибіотиками збільшує ефективність лікування [19].

У цьому разі, хоча бактеріофагова терапія може бути використана проти більшості бактеріальних інфекцій, можливо, саме антибіотикостійкі бактерії стануть першими клінічними «мішенями» бактеріофагів [5].

Крім прямої дії, використання препаратів бактеріофагів стимулює активізацію факторів специфічного і неспецифічного імунітету [2, 61], тому фаготерапія особливо ефективна при лікуванні хронічних запальних захворювань на тлі імунодепресивних станів [21]. Антибактеріальний ефект бактеріофагів зумовлений специфічним лізисом патогенних бактерій і не порушує при цьому стан нормальної мікрофлори організму [8].

Біомедичні технології у наші дні сильно відрізняються від того, що було доступно на початку розвитку фагової терапії, і сучасне розуміння біологічних можливостей фагів і основних механізмів взаємодій «фаг – бактерія» помітно змінилося від початку використання бактеріофагів для лікування. Переваги нових технологій можуть зробити значний внесок у створення безпечних терапевтичних фагових препаратів, які ефективно діють проти їхніх специфічних бактеріальних хазяїв, і в розробку науково-обґрунтованих стратегій для включення фагової терапії в існуючий арсенал засобів запобігання і лікування бактеріальних інфекцій [5].

Метою роботи було проаналізувати інформацію про історію та сучасний стан виробництва і застосування препаратів бактеріофагів, перспективи їх використання для лікування бактеріальних інфекцій, викликаних плівкоутворюючими штамми.

#### **Використання бактеріофагів: історичні аспекти**

Ідея застосування бактеріальних вірусів у лікуванні різних інфекційних захворювань людини і тварин виникла практично одночасно з відкриттям фагів. Таким чином, фаготерапія відома вже близько ста років. Її становлення супроводжувалося активними дискусіями про доцільність використання фагів як антимікробних лікувальних агентів [25].

Історія відкриття бактеріофагів починається з 1896 р., коли британський хімік Ернест Ханкін, вивчаючи антибактеріальну дію вод індійських річок Гангу і Джумни, вперше описав агент, який легко проходить крізь непроникні для бактерій мембранні фільтри і викликає лізис мікробів [1]. У 1915 р. Фредерік Туорт припустив, що антибактеріальна активність може бути пов'язана з вірусом (фагом), але він не проводив спеціального пошуку вірусів і остаточно не довів їх існування. Наявність вірусів, що уражують бактерії, було доведено у дослідженнях Фелікса д'Ереля у 1917 р. [43].

Використання бактеріофагів було запропоновано одним із першовідкривачів феномена бактеріофагії Ф. д'Ерелем, який уперше застосував фаговий препарат для лікування важкої дизентерії у дитини у 1919 р., лише через два роки після публікації його першої статті, що повідомляла про відкриття вірусів бактерій [57]. Роботи д'Ереля послугували стимулом до широкого застосування різних фагів у лікувальних цілях. У США було організовано кілька великих компаній з виробництва фагових препаратів [25]. У 1921 р. Річард Брайонг і Джозеф Мейсін, використовуючи як основу працю д'Ереля, вперше описали успішний спосіб лікування стафілококових інфекцій шкіри за допомогою стафілококового фага. До середини минулого століття на Заході фаги активно вивчалися і широко використовувалися як лікарський засіб проти низки захворювань, включаючи дизентерію, тиф, паратифоїдні лихоманки, холеру і гнійно-септичні інфекції [1].

У 1930-х роках фармацевтичний концерн Eli Lilly розробив і випускав як мінімум сім фагових препаратів для клінічного використання проти стафілококів, стрептококів, кишкової палички та інших бактеріальних патогенів людини. Препарати склалися зі



стерильних фільтратів рідких культур мікробів, лізованих фагами (наприклад, Colo-lysate, Ento-lysate, Neiso-lysate і Staphylo-lysate), або тих же препаратів у водорозчинній желе-подібній основі (наприклад, Colo-jel, Ento-jel і Staphylo-jel). Серед інших добре відомих компаній, залучених перед початком Другої світової війни у виробництво комерційних лікувальних фагів, E.R. Squibb&Sons, Swan-Myers (відділ Abbot Laboratories) (Straub and Applebaum, 1933) [5].

Основоположником фаготерапії у Радянському Союзі прийнято вважати грузинського мікробіолога Георгія Еліаву – учня Фелікса д'Ереля. За його ініціативою у 30-ті роки був створений Інститут дослідження бактеріофагів у Тбілісі, який у 1951 р. увійшов до складу групи Інститутів вакцин і сироваток СРСР [1].

Бактеріофаги найчастіше вводили орально для лікування дизентерії, черевного тифу, холери, піогенних інфекцій та інфекцій сечових шляхів, сепсису, остеомієліту, дерматиту, емпієми і пневмонії, викликаних різними патогенними й умовно-патогенними мікроорганізмами [4, 16, 41]. Крім орального введення, фаги наносили на місце ураження, застосовували в аерозолях і клізмах [10].

Період масового захоплення терапевтичним застосуванням фагів у західній медицині в кінці 30-х – на початку 40-х рр. змінився практично повним забуттям такого підходу. Цьому сприяли, з одного боку, дуже нестабільні результати, які були зумовлені багато в чому недостатнім розвитком біології фагів, технологією виробництва, зберігання і застосування їх лікувальних препаратів, а з іншого боку, – тріумфом антибіотикотерапії бактеріальних інфекцій, котра обіцяла більш просте і надійне вирішення більшості клінічних завдань у цій сфері [57].

Тим не менш, розробка і застосування лікувальних фагових препаратів ніколи не припинялися у Радянському Союзі, а надалі у Польщі та Чехії. Накопичений у цих країнах великий досвід свідчить про високу ефективність і безпеку препаратів бактеріофагів [23].

Відкриття явища лізогенії слід вважати найважливішим етапом у розвитку ідей фаготерапії. У цей період був сформульований один із основоположних принципів конструювання лікувальних зразків бактеріальних вірусів, згідно з яким препарати мають включати тільки вірулентні фаги. Подальші успіхи фаготерапії значною мірою зумовлені даною обставиною [25].

Бактеріофаги залишалися незатребуваними медициною аж до останнього часу, коли наслідки застосування антибіотиків повністю не змінили властивості патогенної мікрофлори [17].

З 1980–1990 рр. ХХ ст. інтерес до бактеріофагів почав відроджуватися в результаті широкого розповсюдження антибіотикорезистентних внутрішньолікарняних штамів [10]. Множинна резистентність бактерій сприяла поновленню інтересу до фагової терапії [59].

Бактеріофаги мають високий терапевтичний потенціал і вже багато років використовуються як антибактеріальні агенти для лікування бактеріальних уражень. Проте широкому застосуванню бактеріофагів перешкоджає низка проблем, зокрема, проблема імунної відповіді організму на фагові частки, проблема вузької специфічності окремих ізолятів бактеріофагів, слабка реакція різних видів бактеріофагів до найважливіших патогенів тощо [12].

Тому, незважаючи на безсумнівну перспективність застосування бактеріофагів як протибактеріальних препаратів, їх впровадження в лікувальну практику йде дуже повільно. Існує безліч обмежень, продиктованих вимогами фармакологічної індустрії, які не можуть врахувати усі складнощі взаємодії живих систем. Відповідно, очевидним експерименталь-

ним виходом із такого становища стали можливості сучасної молекулярної біології, генної та білкової інженерії у вивченні використання як протибактеріальних препаратів не цільних вірусних частинок, а їхніх компонентів, активних проти бактерій [24].

### Механізм лікувальної дії препаратів бактеріофагів

Механізм лікувальної дії бактеріофагів полягає у їхній здатності експоненційно реплікуватись і лізувати клітини патогенних штамів бактерій [24]. Ефективність використання фагових препаратів з лікувальною метою неоднакова і тому потребує уніфікації оцінки. Левін і Бул сформулювали основний постулат оцінки ефективності фагової терапії – зниження щільності й темпів розповсюдження популяції інфекційних бактерій до рівня, з яким вже можуть впоратися конститутивні та специфічні імунні захисні сили організму [48].

Специфічність лізису бактерій фаговими лізинами є ключовою характеристикою препарату. В результаті специфічної взаємодії фагів з бактеріями спочатку відбувається їхня адсорбція на бактеріальній клітині, потім цикл внутрішньоклітинного розмноження фагів з подальшим лізисом бактеріальної клітини. Зрілі фагові частки виходять із бактеріальної клітини і потім інфікують інші. Фаги здатні швидко проникати у кров і лімфу та виводитися через нирки зі сечею. Вже через 2 год після прийому 30 мл бактеріофага фагові частки виявляються в сечі, а максимальна їх концентрація досягається через 6–8 год [10].

За сучасними нормами для цілей фагової терапії використовуються тільки вірулентні бактеріофаги, тобто такі, розмноження яких відбувається виключно в літичному циклі [23].

Для проникнення в клітину бактерії і виходу з неї більшість бактеріофагів використовують «пептидоглікан-лізуючі ферменти» (ПЛФ). Наприклад, такий механізм притаманний деяким фагам із родини *Caudovirales* [24]. Практично у всіх із кількох сотень вивчених до теперішнього часу випадків у процесі лізису господаря хвостатими фагами беруть участь два ключових білки: ендолізін, що атакує пептидоглікановий шар, і холін, що дає ендолізіну змогу проникати з цитоплазми в периплазматичний простір у точно розрахований час [5].

Ендолізینی (лізини або лізоцими) бактеріофагів здатні здійснювати розрив зв'язків у пептидоглікановому шарі клітинної стінки мікроорганізмів, приводячи до лізису (деградації) останніх [38, 43]. За типом зв'язків, що гідролізуються у пептидоглікані, ендолізینی поділяють на 5 класів: 1) мурамідази; 2) літичні трансглікозилази; 3) N-ацетил-β-D-глюкозамінази; 4) N-ацетилмураміл-L-аланінамідази і 5) пептидази [33, 53]. Ендолізینی характеризуються певним спектром антибактеріальної дії, не залежать від чутливості бактерій до антибіотиків. Спектр антибактеріальної дії ендолізіну визначається типом ферменту, складом компонентів клітинної стінки, а також конфігурацією субстрату. Незважаючи на те, що ендолізینی пристосовані природою для лізису клітини «зсередини», існує багато прикладів ефективної роботи таких ферментів «ззовні» у разі грампозитивних бактерій [38]. У разі грамнегативних мікроорганізмів складна будова клітинної стінки бактерій, наявність зовнішньої мембрани, можливо, перешкоджає доступу ендолізинів «ззовні» до зв'язків, що розриваються, тому практично немає прикладів ефективного лізису клітин «ззовні». Для багатьох ферментів таких фагів важливим компонентом для ефективного лізису є білки-холіни [60].

Одна з важливих властивостей літичних ферментів – їхня здатність руйнувати клітинні стінки тільки тих видів або підвидів бактерій, проти яких спрямовані фаги, що кодують ці ПЛФ. Наприклад, ПЛФ фагів стафілококів руйнують пептидоглікан стафілококів, а ферменти пневмококових фагів – клітинну стінку пневмококів [39, 51, 52]. Таким чином,

на відміну від антибіотиків, більшість із яких мають широкий спектр дії та знищують практично всі бактерії, присутні в організмі пацієнта, ПЛФ можуть пошкоджувати клітини тільки конкретних мікроорганізмів, практично без ефекту щодо нормальної симбіотичної мікрофлори [24].

Інтенсивне дослідження літичних ферментів бактеріофагів привернуло увагу клініцистів до окремого використання їх як лікарських засобів, що отримали назву «ензибіотики» – ферментативні антибіотики фагового походження. Додавання таких ферментів викликає швидкий лізис мікроорганізмів [19]. Однак ензибіотики мають ряд обмежень у використанні, тому що вони діють лише на грампозитивні мікроорганізми. Це зумовлено особливістю будови клітинної стінки. У грамнегативних бактерій зовнішня мембрана знижує проникнення ферментів бактеріофагів, через те їхня ефективність близька до нуля [39, 53]. Основним завданням на майбутнє є удосконалення застосування фагових ферментів. Генна інженерія і спрямований мутагенез можуть сприяти розробленню нових ПФЛ, найбільш активних у кожному випадку. Враховується, що кількість фагів на Землі становить близько  $10^{31}$  і на сьогодні відома незначна частка з них. Через те ймовірність відкриття нових ПФЛ, у тому числі ефективних проти грамнегативних бактерій, дуже велика [24].

Але «ензибіотики» не виготовляються для широкого застосування. Основна перешкода для впровадження «ензибіотиків» для лікування інфекційних захворювань полягає в тому, що, порівняно з хімічними антибіотиками, вони набагато дорожчі у виробництві та більш вимогливі до умов зберігання.

При обговоренні перспектив терапевтичного використання ПЛФ бактеріофагів потенційне занепокоєння викликає вироблення нейтралізуючих антитіл проти них. На відміну від антибіотиків, які в переважній більшості представлені неімуногенними малими молекулами, ферменти можуть стимулювати імунну відповідь при епізодичному та систематичному прийомі [24, 46]. Було показано [39, 53], що *in vitro* та *in vivo* антитіла уповільнюють, але не повністю блокують лізис бактеріальних клітин. Частково цей ефект пояснюється тим, що афінність ПЛФ до своїх субстратів може бути вищою, ніж антитіла до ферменту. Подібно до інших білків, що вводяться внутрішньовенно тваринам і людині, фагові білки мають короткий період напіврозпаду (близько 15 хв) [52]. Однак у випадку грампозитивних бактерій ПЛФ здійснюють свою дію дуже швидко і за відведений проміжок часу дають змогу отримати терапевтичний ефект [51, 53]. Але навіть у цьому випадку для лікування інфекції потрібні множинні ін'єкції або постійна інфузія ферменту в організм протягом деякого часу [39].

Також необхідно зазначити, що не всі антитіла, які взаємодіють із фаговою часткою, мають пряму нейтралізуючу дію. Для цього антитіла повинні взаємодіяти з адгезинами і (у низки фагів) із деякими іншими білками хвоста фага. Вироблення специфічних високо-афінних імуноглобулінів класу IgG потребує тривалого часу, тому при відносно коротких курсах фаготерапії ця проблема не має істотного значення [23].

Бактерії можуть ставати стійкими до фагової інфекції шляхом набуття мутації або втрати генів, відповідальних за рецептори фага. Ця стійкість може виражатись у зниженій ефективності перебігу інфекції відповідних фагів, повільній адсорбції або у зниженні врожаю фага, що може бути зумовлене активністю системи рестрикції – модифікації [44, 58], а також низки систем специфічної стійкості бактерій до фагів певних груп [36, 37, 44]. Крім того, у прокаріотів поширені CRISPR-локуси (clusters of regularly interspaced palindromic repeats) [56], що містять короткі фрагменти послідовностей, які захоплюються за рахунок

досі не відомого механізму з геномів бактеріофагів, плазмід та інших чужорідних ДНК. Асоційовані з CRISPR гени кодують білки, що формують ферментативні комплекси, атакуючі молекули ДНК або РНК, які містять послідовності, ідентичні так званим спейсерам CRISPR [40, 62]. Такі системи дають змогу бактеріям багатьох видів швидко формувати стійкість до конкретних штамів фагів, зумовлену зниженням ефективності інфекції. Однак ця стійкість може бути подолана за рахунок точкових мутацій послідовностей, що атакуються [34]. Водночас набуття стійкості до фага за рахунок втрати одного з поверхневих білків може зменшувати життєздатність бактерії. Якщо ж втрачений рецептор слугує фактором вірулентності бактерії, то його втрата веде до різкого зменшення інфекційності мікроорганізму [48].

Більш перспективний варіант фаготерапії – використання препаратів на базі фагового білка – лізину. Він руйнує пептидоглікан клітинної стінки, діючи на бактерії незалежно від їх виду. Відрізняються ці білки тільки частиною молекули, яка відповідає за розпізнавання, що дає змогу штучно створювати лізини для певних бактерій. І такі препарати, здатні лізувати більше 15 видів патогенних бактерій, вже створені. Істотним недоліком цих препаратів є висока чутливість до бактеріальних і еукаріотичних протеаз, що негативно позначається на тривалості терапевтичного ефекту [29].

Нещодавно Ротем та ін. [55] виявили, що геноми бактеріофагів кодують послідовності, які мають подібність з антимікробними пептидами. Найчастіше амінокислотна послідовність із передбаченими властивостями антимікробного пептиду – не самостійний продукт гена, а невелика частина, ймовірно, окремий домен більш великого поліпептиду. Вважається, що синтез додаткових молекул фагових білків і продуктів їхнього протеолізу, що мають антимікробні властивості, які не входять до складу вірусної частки, але вивільняються під час лізису бактеріальних клітин, може сприяти поширенню фагової інфекції у бактеріальній колонії. Ця гіпотеза потребує додаткового експериментального підтвердження, але з еволюційної точки зору цілком логічна [24].

#### **Сучасний стан виробництва та застосування препаратів бактеріофагів**

Останні дані свідчать про відновлення інтересу до фаготерапії, внаслідок чого докладаються деякі зусилля, спрямовані на відродження практики використання препаратів бактеріофагів [21]. Протягом останніх десятиліть дослідження з вивчення ефективності й розробки нових препаратів бактеріофагів тривали у Франції, Чехії та Польщі, а в кінці ХХ ст. – і у Великобританії, США, а також Ізраїлі [20].

На початку 2000 року Глен Моріс, співробітник Університету Меріленд (США) спільно з НДІ бактеріофагів, мікробіології та вірусології у Тбілісі почали дослідження фагових препаратів для отримання ліцензії на їх застосування у США. У липні 2007 року бактеріофаги були ухвалені для використання в США [19].

На сьогодні масове виробництво препаратів бактеріофагів, зареєстрованих національними органами охорони здоров'я, зберігається в Росії та у Грузії (де з 1930-х рр. діє Інститут бактеріофага, мікробіології та вірусології (нині ім. Г. Еліави), створений за особистої участі Ф. д'Ереля). У Польщі препарати фагів виробляються і застосовуються у спеціалізованому центрі в Інституті імунології та експериментальної терапії у Вроцлаві [23]. Основними виробниками бактеріофагів у Російській Федерації є НВО «Імунопрепарат» (Уфа), підприємство з виробництва бактерійних препаратів (Нижній Новгород), МП «Біофон» (Саратов), НВО «Біомед» (Перм) [10]. Номенклатура розроблених і освоєних НВО «Мікроген» (Москва) препаратів налічує понад десяток найменувань [20].

Закордонні компанії Biophage Inc. (Canada), Exponential Biotherapies Inc. (USA), Intralytix Inc. (USA), Phage Biotech Ltd (Israel), Phage Tx. Inc. (USA) досліджують можливості

використання фагів як антибактеріальних препаратів, проте промислове виробництво ще не налагоджене. На території України випуск бактеріофагів не здійснюється, але імпортовані з Росії як моно-, так і комплексні фаги, широко реалізуються в аптечній мережі більшості великих міст країни [19].

Сучасні лікувально-профілактичні бактеріофаги здебільшого є комплексами поліклональних високовірулентних бактеріальних вірусів, спеціально підібраних проти груп збудників бактеріальних інфекцій, що зустрічаються найбільш часто (див. таблицю) [1].

Лікувально-профілактичні бактеріофаги [21]

Найменування препарату	Спектр антибактеріальної активності	Сфера застосування
1	2	3
Бактеріофаг дизентерійний полівалентний	<i>Shigella sonne;</i> <i>S. flexneri</i> 1, 2, 3, 4, 6 <i>septomuniv</i>	Лікування хворих на дизентерію та профілактика даного захворювання. Санація реконвалесцентів
Бактеріофаг сальмонельозний	<i>Salmonella serogrup</i> гр. А, В, С, D, E	Лікування і профілактика сальмонельозів. А, В, С, D, E.
Бактеріофаг черевнотифозний	<i>Salmonella typhi</i>	Лікування і профілактика сальмонельозів
Бактеріофаг стафілококовий	<i>Staphylococcus aureus</i> і деякі види коагулазонегативних стафілококів	Лікування та профілактика гнійних інфекцій шкіри, слизових, викликаних стафілококами, а також при дисбактеріозах. Застосовується для лікування циститів, холециститів, гострих тонзилітів, ентероколітів та ін.
Бактеріофаг стрептококовий	<i>Streptococcus,</i> <i>Enterococcus</i>	Лікування та профілактика гнійно-запальних і ентеральних захворювань, а також дисбактеріозів. Обробка післяопераційних і свіжоінфікованих ран (у т.ч. з профілактичною метою)
Бактеріофаг протейний	<i>Proteus vulgaris,</i> <i>P. mirabilis</i>	Лікування та профілактика гнійних інфекцій, спричинених протейними бактеріями, а також при дисбактеріозах. Застосовується для лікування абсцесів, гнійних ускладнень ран, циститів та ін.
Бактеріофаг колі	Ентеропатогенні штами <i>Escherichia coli</i>	Лікування і профілактика інфекцій шкіри і внутрішніх органів: гнійних ускладнень ран, опіків, абсцесів, плевритів. Застосовується для лікування циститів, ентероколітів, токсикоінфекцій, а також для профілактики коліінфекцій
Бактеріофаг синьогнійний	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Лікування захворювань різних органів і гнійних інфекцій шкіри. Застосовується для лікування абсцесів, хірургічних інфекцій, гнійних ускладнень ран, циститів та ін.
Бактеріофаг клебсіел пневмонії очищений	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Лікування хірургічних інфекцій, захворювань уrogenітальної сфери та шлунково-кишкового тракту, гнійно-запальних захворювань вуха, горла та носа, а також при сепсисі новонароджених і дітей грудного віку. Застосовується також для селективної деконтамінації кишечника



Закінчення таблиці

1	2	3
Бактеріофаг клебсієл полівалентний очищений	<i>Klebsiella rhinoscleromatis</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>K. ozaenae</i>	Лікування озени, риносклероми та гнійно-запальних захворювань. Застосовується для лікування отитів, запалень пазух носа і для інших гнійно-запальних захворювань вуха, горла та носа
Бактеріофаг колі-протейний	Ентеропатогенні штами <i>E. coli</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>P. mirabilis</i>	Лікування та профілактика ентероколітів і лікування кольпітів колі-протейної етіології
Піобактеріофаг полівалентний	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Enterococcus</i> , Ентеропатогенні штами <i>E. coli</i>	Лікування і профілактика різних форм гнійно-запальних та ентеральних захворювань
Піобактеріофаг комплексний (Секстафаг)	<i>P. aeruginosa</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Enterococcus</i> , Ентеропатогенні штами <i>E. coli</i> , <i>K. oxytoca</i>	Застосовується для лікування хірургічних інфекцій, опіків, гнійних уражень шкіри, циститів і пієлонефритів, гастроентероколітів, холециститів, дисбактеріозу кишечника, а також ентеритів і дисбактеріозу кишечника новонароджених і дітей грудного віку
Інтести-бактеріофаг	<i>S. sonnae</i> ; <i>S. flexneri</i> 1, 2, 3, 4, 6, <i>Salmonella A, B, C, D, E</i> , Ентеропатогенні штами <i>E. coli</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Enterococcus</i>	Лікування гострих і хронічних захворювань: дизентерії, сальмонельозу, диспепсії, коліту, ентероколіту

Препарати бактеріофагів не поступаються, а в деяких випадках навіть перевершують антибіотики за активністю щодо антибіотикорезистентних збудників. При цьому бактеріофаги не викликають побічних токсичних та алергічних реакцій і не мають протипоказань, їх також застосовують для лікування низки захворювань вагітних жінок у поєднанні з іншими лікарськими препаратами [14].

**Перспективи та можливості застосування фагових препаратів для лікування уражень, викликаних плівкоутворюючими штамми**

Сучасними дослідженнями було показано, що більшість бактерій існують у природних екосистемах не у вигляді вільноплаваючих (планктонних) клітин, а у вигляді специфічно організованих і прикріплених до субстратів співтовариств – біоплівки, утворення яких є складнорегульованим біологічним процесом [15]. На сьогоднішній день роль бактеріальних біоплівок у інфекційній патології, ймовірно, до кінця ще не оцінена, однак висловлюється припущення, що до 80% усіх інфекційних хвороб пов'язані з утворенням біоплівок [27].

Відкриття бактеріальних біоплівок, що утворюються в ході практично будь-якого інфекційного процесу, виявило не відомі раніше причини недостатньої ефективності використання антибіотиків.

Дослідження останніх років свідчать, що дія антибіотиків на бактерії у співтоваристві залежить не тільки від властивостей мікроба й антибіотика, але також від будови і складу



біоплівки. У біоплівках бактерії виживають у присутності антибіотиків, доданих у кількості в 500–1000 разів більшій, ніж їхня мінімальна пригнічуюча концентрація. Встановлено, що в основі підвищеного виживання лежать властивості клітин мікроорганізмів і позаклітинного матриксу [28].

Поширення антибіотикостійкості бактерій, а також відкриття ролі біоплівок, стійких до класичних антибіотиків, у розвитку хронічних інфекцій відродили інтерес до терапії бактеріофагами [12].

У реальних умовах більшість бактеріальних популяцій колонізують лише обмежені екологічні ніші в організмі, при цьому значна частина бактерій може перебувати у фізіологічних станах, несприятливих для розмноження фага, наприклад, у складі біоплівок [54].

Стан клітин у біоплівках відрізняється від такого у суспензійній культурі [31], при цьому сприйнятливість їх до інфекції фагами знижується [32]. Частково це обумовлено утрудненням дифузії фагів у матриксі, який оточує бактеріальні клітини в плівках. Тим не менш бактеріофаги здатні інфікувати клітини у складі біоплівок [32, 35]. Ефективність фагів обумовлена проникненням у глибокі шари біоплівок за допомогою кодованих самим вірусом деполімераз [35].

Взаємодія фага з біоплівкою може бути диференційована по категоріях. Наприклад, фаги, поряд з іншими вірусами, можуть потрапляти у біоплівку і лишатись у неспецифічній позаклітинній полімерній речовині (матриксі), не потрапляючи до клітин бактерій. Унаслідок розвитку фагової інфекції вірогідна деградація цих полімерів і перешкоджання подальшому формуванню біоплівки через масову загибель, а отже, неможливість агломерації планктонних клітин [30].

Фагами кодуються гідролітичні ферменти, що здатні руйнувати біоплівки. Їх поділено на три категорії [45, 63]: 1) ферменти, що піддають гідролізу позаклітинні полімерні речовини біоплівки; 2) ферменти, що руйнують капсулу бактеріальної клітини; 3) ферменти, що руйнують клітинну стінку бактерій.

Важливо, що фагова інфекція викликає порушення структури біоплівки, роблячи клітини, які залишилися там, доступними для імунної системи. Бактеріофаги, вочевидь, здатні інфікувати і клітини-персистери, які багато в чому обумовлюють невдачі антибактеріальної хіміотерапії такого роду інфекцій [49]. Просторова неоднорідність структури біоплівок, а також багатьох мікросередовищ у організмі людини і тварин може призводити до того, що хвилеподібне поширення фагової інфекції у популяції бактерій мимовільно затихає. Обмежують розповсюдження хвилі інфекції також мертві клітини бактерій та клітини у стані спокою, здатні зв'язувати на рештках мембран фагові частки [23].

#### **Перспективи створення та виробництва препаратів бактеріофагів**

Визначено цілий ряд пріоритетних напрямів розробки і виробництва лікувально-профілактичних бактеріофагів, які корелюються загальносвітовими тенденціями розробки протибактерійних препаратів. Створюються та впроваджуються нові препарати: розроблені бактеріофаги проти серацій і ентеробактерій, ведуться роботи зі створення фагового препарату проти *Acinetobacter spp.* і *Helicobacter pylori* [21].

Ведуться розробки принципово нових препаратів на основі бактеріофагів і полімерів. Активні полімери самі по собі застосовуються в терапії різних захворювань, а в поєднанні з препаратами бактеріофагів представляється можливим значно розширити сферу застосування подібних комбінованих препаратів і підвищити ефективність терапевтичного впливу. Планується випуск препаратів у вигляді мазей, гелів, лініментів і активних плівок з бактеріофагами [21].

Співробітники Інституту бактеріофагів (США) у 2010 році висловили думку, що років через десять виробництво бактеріофагів стане однією з провідних галузей у фармацевтичній промисловості [47].

Відкриття бактеріофагів є однією з найважливіших віх в історії біомедичних досліджень, що забезпечило численні фундаментальні відкриття і досягнення у науці про життя. В епоху до відкриття антибіотиків, на початку XX століття, можливості бактеріофагів як потужного засобу в боротьбі в інфекційними захворюваннями бактеріальної етіології захопили увагу наукових співтовариств [5]. Однак після відкриття пеніциліну у 40-х роках XX ст. домінуючою стала ідея пошуку дедалі нових антибіотиків, а вивчення проблем фаготерапії відступило на задній план [11].

Між тим широке неконтрольоване вживання хіміотерапевтичних антимікробних препаратів створило умови для формування та поширення штамів із множинною резистентністю до антибіотиків. Застосування протимікробних біопрепаратів, а саме бактеріофагів, може бути однією з альтернатив антибіотикам у терапії багатьох захворювань бактеріального походження, зокрема проти антибіотикорезистентних збудників. Окрім цього, їх застосовують при лікуванні захворювань вагітних і немовлят [3, 14].

Важливими є такі позитивні якості бактеріофагів, як відсутність токсичної дії на організм, розвиток алергійних реакцій, дисбактеріозів [6]. Відсутність протипоказань і ускладнень при застосуванні препаратів бактеріофагів, можливість їх використання у поєднанні з іншими лікарськими препаратами, в т. ч. з антибіотиками і пробіотиками, роблять їх застосування досить перспективним [7].

Окремим напрямом фаготерапії є використання літичних ферментів фагів, які руйнують різні структури бактеріальної клітини і мають специфічність дії щодо хазяїв. Ці препарати можна використовувати як новий засіб боротьби з бактеріальними патогенами [24].

Стосовно виробництва лікувальних препаратів фагів можна відзначити, що їх на сьогоднішній день виробляють лише в кількох країнах світу [21]. У філіях Федерального державного унітарного підприємства Науково-виробничого об'єднання «Мікроген» МОЗ РФ в Уфі, Пермі та Нижньому Новгороді лікувально-профілактичні препарати бактеріофагів виробляються з кінця 80-х років [1]. Роботи російських вчених дали змогу розширити асортимент виробленої продукції та перейти від рідких бактеріофагів до їх таблетованих форм, а в даний час – до концентратів, лініментів і гелів [13, 18, 30]. На Заході вже організовано велику кількість фаготерапевтичних компаній, патентуються ідеї, іде пошуку за терапевтичними фагами і їх депонуванням, а для підготовки майбутнього споживача розпочалася реклама в мас-медіа [11].

Значення препаратів бактеріофагів зростає і завдяки тому, що лікування хронічних інфекцій у даний час вже не може ґрунтуватися на планктонній концепції мікробіології. Уявлення про біоплівки змінює підходи до діагностики та лікування інфекційних уражень у найрізноманітніших ділянках медицини [9]. У цьому сенсі зростає актуальність досліджень природної ролі бактеріофагів у модуляції розвитку біоплівок і, особливо, потенційної можливості використання бактеріофагів для контролю утворення біоплівок у різних умовах [5].

Перспективи виробництва бактеріофагів пов'язані з тим, що вони постійно збагачуються новими фаговими клонами, і це дає їм змогу відповідати сучасній етіології захворювань. У зв'язку з небезпекою поширення внутрішньолікарняних інфекцій, резистентних до більшості або до всіх відомих антибіотиків, ведуться роботи з виділення із бактеріофагів компонентів, які глибоко діють на бактеріальні клітини, а також з отримання ділянок ДНК бактеріофагів,

відповідальних за синтез бактерицидних агентів; створюються комплексні препарати бактеріофагів для застосування у лікувальних і діагностичних цілях [26].

Для того, щоб застосування препаратів бактеріофагів стало масовим, слід провести цілу низку досліджень. Перше – фаги треба дослідити, включаючи генетичні та феногенетичні аспекти (як генотип проявляється в реальних умовах). Обов'язково треба контролювати й відстежувати появу резистентних мутантів і їхні властивості. Друге – слід вивчити розподіл фагів у людському організмі та, можливо, подумати про створення довгоживучих терапевтичних фагів. Третє – створити широку мережу банків фагів у різних країнах із можливістю обміну [22].

Також необхідним є моніторинг сучасного стану чутливості штамів різних груп умовно-патогенних і патогенних бактерій до препаратів бактеріофагів та розширення спектра їхньої дії. Потрібне детальне вивчення механізмів взаємодії бактеріофагів з бактеріями у складі біоплівки та за її межами й розробка нових напрямів і методів терапевтичного застосування лікувальних препаратів бактеріофагів.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Акимкин В. Г., Дарбеева О. С., Колков В. Ф.* Бактериофаги: исторические и современные аспекты их применения: опыт и перспективы // Клиническая практика. 2010. № 4. С. 48–54.
2. *Алсынбаев М. М., Медведев Ю. А., Туйгунов М. М.* Биопрепараты и ведущие направления их лечебно-профилактического применения: монография. Уфа: РИО филиала «Иммунопрепарат» ФГУП «НПО «Микроген» МЗ РФ, 2008. 100 с.
3. *Аникина Т. А., Рязанова С. Х., Сергеева Е. Н.* и др. Свежевыделенные штаммы возбудителей – важнейший компонент производства адаптированных лечебно-профилактических бактериофагов. Предприятие по производству бактериальных препаратов «Им-Био». Нижний Новгород: Вакцинология, 2006. 3 с.
4. *Асланов Б. И., Яфаев Р. Х., Зуева Л. П.* Пути рационального использования синегнойных бактериофагов в лечебной и противоэпидемической практике // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2003. № 5. С. 72–77.
5. Бактериофаги: биология и практическое применение / под ред. Э. Каттер, А. Сулаквелидзе. М.: Научный мир, 2012. 640 с.
6. *Бондарев Р. В., Бондарев В. И., Селиванов С. С., Орехов А. А.* Применение адаптированных бактериофагов в комплексном лечении больных острым гнойным холангитом // Укр. журнал хірургії. 2011. № 5 (14). С. 150–154.
7. *Бондаренко В. М.* Клинический эффект и пути рационального использования лечебных бактериофагов в медицинской практике // Журнал инфектологии. 2011. Т. 3. № 3. С. 15–19.
8. *Бурова Л. М., Корнійчук О. П., Данилейченко В. В.* та ін. Порівняльна характеристика чутливості коліциногенних і неколіциногенних ешерихій до антимікробних хіміотерапевтичних препаратів і бактеріофагів // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. 2012. № 3. С. 26–33.
9. *Вознесенский Н. А.* Биопленки – терапевтическая мишень при хронических инфекциях // Пульмонология и аллергология. 2008. № 3. С. 56–64.
10. *Габриэлян Н. И., Горская Е. М., Цирульникова О. М.* Возможности использования бактериофагов в хирургии и трансплантологии // Вестн. трансплантологии и искусственных органов. 2012. Т. XIV. № 1. С. 106–113.

11. Деркач С. А., Коцар О. В., Воронкіна І. А. та ін. Порівняльна характеристика чутливості мікроорганізмів, вилучених від хворих дітей, до препаратів-бактеріофагів [Електронний ресурс] // *Annals of Mechnikov Institute*. 2009. № 1. С. 43–47. Режим доступу: <http://www.imiamn.org/journal.htm>.
12. Дятлов І. А., Светоч Э. А. Новаци в боротьбі з антибіотикоустойчивими штаммами бактеріальних інфекцій // *Современные медицинские технологии*. 2011. № 6. С. 32–36.
13. Захарова Ю. А., Николаева А. М., Падруль М. М. Использование препаратов бактериофагов у беременных при инфекциях мочевыводящих путей // *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2010. № 2. С. 14–18.
14. Захарова Ю. А. Использование бактериофагов у беременных с пиелонефритом: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 03.00.07. Пермь, 2004. 19 с.
15. Ильина Т. С., Романова Ю. М., Гинцбург А. Л. Биопленки как способ существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина: феномен, генетический контроль и системы регуляции их развития // *Генетика*. 2004. Т. 40. № 11. С. 1445–1456.
16. Казьянин А. В., Орлова Е. В., Ефимова М. Г. и др. Бактериофаги: опыт производства и применения // *Фармация*. 2010. № 3. С. 36–37.
17. Карбелеш Е. Е., Ткаченко С. А., Панкратов С. М., Демедюк О. И. Применение бактериофагов как концепция лечебного и профилактического направления в медицине // *Актуальные проблемы транспортной медицины*. 2008. № 1(11). С. 135–139.
18. Ковязина Н. А., Функнер Е. В., Шитова О. И. и др. Характеристика свойств таблетированной лекарственной формы поливалентных бактериофагов // *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2010. № 2. С. 18–21.
19. Коцар О. В. Аналіз проблеми антибіотико- та фаготерапії захворювань, зумовлених патогенною та умовно-патогенною мікрофлорою // *Буковинський мед. вісн.* 2009. Т. 13. № 3. С. 123–127.
20. Красильников И. В., Лобастова А. К., Лыско К. А. Краткий обзор современного состояния и перспективных направлений развития производства и применения лечебно-профилактических препаратов бактериофагов // *Вестн. биотехнологии им. Ю.А. Овчинникова*. 2010. № 2. С. 28–33.
21. Красильников И. В., Лыско К. А., Отрашевская Е. В., Лобастова А. К. Препараты бактериофагов: краткий обзор современного состояния и перспектив развития // *Сибирский мед. журнал*. 2011. Т. 26. № 2. С. 33–37.
22. Крылов В. Н. Будущее лечебных фагов // *Химия и жизнь*. 2011. № 9. С. 24–29.
23. Летаров А. В., Голомидова А. К., Тарасян К. К. Экологические основы рациональной фаговой терапии // *Acta Naturae*. 2010. Т. 2. № 1. С. 66–79.
24. Мирошников К. А., Чертков О. В., Назаров П. А., Месянжинов В. В. Пептидогликанлизирующие ферменты бактериофагов – перспективные противобактериальные агенты // *Успехи биол. химии*. 2006. Т. 46. С. 65–98.
25. Попов В. Г., Каркищенко В. Н., Пчелинцев С. Ю. и др. Роль бактериофагов *B. antracis* в противодействии биотерроризму. *Биомедицина*. 2006. № 2. С. 24–32.
26. Романова С. Бактериофаги ... или перспективные вирусы // *Ремедиум*. 2009. № 11. С. 54–55.
27. Сидоренко С. В. Роль бактериальных биопленок в патологии человека // *Инфекции в хирургии*. 2004. Т. 2. № 3. С. 16–20.
28. Смирнова Т. А., Диденко Л. В., Азизбекян Р. Р., Романова Ю. М. Структурно-функциональная характеристика бактериальных биопленок // *Микробиология*. 2010. Т. 79. № 4. С. 435–446.

29. Суворов А. В. Гонки с микробами: наши шансы // Природа. 2011. № 5. С. 13–24.
30. Abedon S. T. Bacteriophages and Biofilms: Ecology, Phage Therapy, Plaques. New York: Nova Science Publishers, Hauppauge, 2011. 131 p.
31. Anderson G. G., O'Toole G. A. Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms // Curr. Top. Microbiol. Immunol. 2008. Vol. 322. P. 85–105.
32. Azeredo J., Sutherland I. W. The use of phages for the removal of infectious biofilms // Curr. Pharm. Biotechnol. 2008. Vol. 9. P. 261–266.
33. Borysowski J., Weber-Dabrowska B., Gyrski A. Bacteriophage endolysins as a novel class of antibacterial agents // Exp. Biol. Med. (Maywood). 2006. Vol. 231. P. 366–377.
34. Brouns S. J., Jore M. M., Lundgren M. et al. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes // Sci. Vol. 321. 2008. P. 960–964.
35. Cerca N., Olivera R., Azeredo J. Susceptibility of Staphylococcus epidermidis planktonic cells and biofilms to the lytic action of Staphylococcus bacteriophage K // Lett. Appl. Microbiol. 2007. Vol. 45. P. 313–317.
36. Durmaz E., Klaenhammer T. R. Abortive phage resistance mechanism AbiZ speeds the lysis clock to cause premature lysis of phage infected *Lactococcus lactis* // J. Bacteriol. 2007. Vol. 189. № 4. P. 1417–1425.
37. Fineran P. C., Blower T. R., Foulds I. J. et al. The phage abortive infection system, ToxIN, functions as a protein-RNA toxin-antitoxin pair // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 2009. Vol. 106. P. 894–899.
38. Fischetti V. A. Bacteriophage lysins as effective antibacterials // Current opinion in Microbiology. 2008. Vol. 11. N 5. P. 393–400.
39. Fischetti V. A. Bacteriophage lytic enzymes: novel anti-infectives // Trends Microbiol. 2005. Vol. 13. N 10. P. 491–496.
40. Hale C. R., Zhao P., Olson S. et al. RNA-guided RNA cleavage by a CRISPR RNA-Cas protein complex // Cell. 2009. Vol. 139. N 5. P. 945–956.
41. Harper D. R., Enright M. C. Bacteriophages for the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections // Appl. Microbiol. 2011. Vol. 111. P. 1–7.
42. Hawkey P. M., Jones A. M. The changing epidemiology of resistance // J. Antimicrob. Chemother. 2009. Vol. 64. P. 3–10.
43. Hermoso J. A., Garcia J. L., Garcia P. Taking aim on bacterial pathogens: from phage therapy to ezybiotics // J. Curr. Opin. Microbiol. 2007. Vol. 10. P. 461–472.
44. Hoskisson P. A., Smith M. C. M. Hypervariation and phase variation in the bacteriophage «resistome» // Curr. Opin. Microbiol. 2007. Vol. 10. P. 396–400.
45. Hyman P., Abedon S. T. Bacteriophage host range and bacterial resistance // J. Adv. Appl. Microbiol. 2010. Vol. 70. P. 217–248.
46. Jado I., Lopez R., Garcia E. et al. Phage lytic enzymes as therapy of antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* infection in a murine sepsis model // J. Antimicrob. Chemother. 2003. Vol. 52. P. 967–973.
47. Kutateladze M., Adamia R. Bacteriophages as potential new therapeutics to replace or antibiotics // Trends Biotechnol. 2010. Vol. 28. P. 591–595.
48. Levin B. R., Bull J. J. Population and evolutionary dynamics of phage therapy // Nat. Rev. Microbiol. 2004. Vol. 2. P. 166–173.
49. Lewis K. Multidrug tolerance of biofilms and persister cells // Curr. Top. Microbiol. Immunol. 2008. Vol. 322. P. 107–131.
50. Livermore D. M. Has the era of untreatable infections arrived? // J. Antimicrob. Chemother. 2009. Vol. 64. P. 29–36.



51. Loeffler J. M., Djurkovic S., Fischetti V. A. Synergistic killing of *Streptococcus pneumoniae* with the bacteriophage lytic enzyme Cpl-1 and penicillin or gentamicin depends on the level of penicillin resistance // *Infect. Immun.* 2003. Vol. 71. N 11. P. 6199–6204.
52. Loeffler J. M., Fischetti V. A. Synergistic lethal effect of a combination of phage lytic enzymes with different activities on penicillin-sensitive and -resistant *Streptococcus pneumoniae* strains // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003. Vol. 47. N 1. P. 375–377.
53. Loessner M. J. Bacteriophage endolysins-current state of research and applications // *Curr. Opin. Microbiol.* 2005. Vol. 8. N 4. P. 480–487.
54. Macfarlane S., Dillon J. F. Microbial biofilms in the human gastrointestinal tract // *J. Applied Microbiology.* 2007. N 102. P. 1187–1196.
55. Rotem S., Radzishovsky I., Inouye R. T. et al. Identification of antimicrobial peptide regions derived from genomic sequences of phage lysins. *Peptides.* 2006. Vol. 27. P. 18–26.
56. Sorek R., Kunin V., Hugenholtz P. CRISPR – a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea // *Nat. Rev. Microbiol.* 2008. Vol. 6. N 3. P. 181–186.
57. Sulakvelidze A., Kutter E. Bacteriophage therapy in humans. In *Bacteriophages – Biology and Applications* / Ed. by E. Kutter and A. Sulakvelidze. Boca Raton, FL: CRC Press, 2005. P. 381–436.
58. Tock M. R., Dryden D. T. F. The biology of restriction and antirestriction // *Curr. Opin. Microbiol.* 2005. Vol. 8. P. 466–472.
59. Vinodkumar C. S., Kalsurmath S., Neelagund Y. F. Utility of lytic bacteriophage in the treatment of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* septicemia in mice // *Indian. J. Pathol. Microbiol.* 2008. Vol. 51. P. 360–366.
60. Wang I. N., Smith D. L., Young R. Holins: the protein clocks of bacteriophage infections // *Annu. Rev. Microbiol.* 2000. Vol. 54. P. 799–825.
61. Weber-Dabrowska S., Zimecki M., Kruzel M. et al. Alternative therapies in antibiotic-resistant infection // *Advances in Medical Sciences.* 2006. Vol. 51. P. 242–244.
62. Wiedenheft B., Zhou K., Jinek M. et al. Structural basis for DNase activity of a conserved protein implicated in CRISPR-mediated genome defense // *Structure.* 2009. Vol. 17. N 6. P. 904–912.
63. Zhang X. S., Garcia-Contreras R., Wood T. K. *Escherichia coli* transcription factor YncC (McbR) regulates colonic acid and biofilm formation by repressing expression of periplasmic protein YbiM (McbA) // *ISME J.* 2008. Vol. 2. P. 615–631.

Стаття: надійшла до редакції 16.04.13

доопрацьована 08.07.13

прийнята до друку 02.09.13



**TREATMENT AND PROPHYLACTIC PREPARATES  
OF BACTERIOPHAGES****E. Vorobey, O. Voronkova, E. Sirokvasha, A. Vinnikov**

*Oles Gonchar Dnipropetrovsk National University  
72, Gagarin Ave., Dnipropetrovsk 49010, Ukraine  
e-mail: elizaveta.vorobey@mail.ru*

The review is devoted to the issues of the current state of production and use of bacteriophages as antimicrobial drugs for prevention and treatment bacterial infection. The need to find the solution of the question arises through the dissemination of the sustainability of clinical isolates of bacteria to antibiotics, which defines a reduction in the effectiveness of antibiotic therapy in general. Disclosed historical aspects of the production and use of bacteriophages, analyzed information about the mechanism of interaction, efficiency of bacteriophage preparations and existing problems of phages in treatment of the defeats caused by biofilm-forming strains of bacteria. The data reveal the possibility of the use of medicinal drugs of bacteriophages as one of the promising directions for practical public health.

*Keywords:* resistance to antibiotics, bacteriophages, production, biofilm formation, phage therapy.

**ЛЕЧЕБНО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ БАКТЕРИОФАГОВ****Е. Воробей, О. Воронкова, Е. Сірокваша, А. Вінніков**

*Днепропетровский национальный университет имени Олесь Гончара  
пр. Гагарина, 72, Днепропетровск 49010, Украина  
e-mail: elizaveta.vorobey@mail.ru*

Обзор посвящен вопросам современного состояния производства и использования лечебно-профилактических препаратов бактериофагов в качестве антибактериальных препаратов. Необходимость рассмотрения данных вопросов возникает из-за значительного распространения устойчивости клинических изолятов бактерий к антибиотикам, что приводит к снижению эффективности антибиотичной терапии в целом. Раскрыты исторические аспекты производства и использования препаратов бактериофагов, проанализированы сведения о механизме взаимодействия, эффективности применения фаговых препаратов и существующие проблемы в лечении фагами поражений, вызванных пленкообразующими штаммами бактерий. Представленные данные раскрывают возможность использования лечебных препаратов бактериофагов как одно из перспективных направлений для практического здравоохранения.

*Ключевые слова:* антибиотикорезистентность, бактериофаг, производство, биопленкообразование, фаготерапия.

УДК 582.675.1:57.085.2

**РОЗВИТОК ЕКСПЛАНТІВ ЛОМИНОСУ (*CLEMATIS* L.)  
НА ЕТАПІ ВВЕДЕННЯ ЗА УМОВ *IN VITRO***

**Н. Корзіна, І. Митрофанова**

*Нікітський ботанічний сад  
Національний науковий центр НААН України  
м. Ялта, смт Нікіта 98648, АР Крим, Україна  
e-mail: in-vitro@ukr.net*

У НБС-ННЦ продовжено дослідження можливості отримання асептичної культури первинних експлантів 13 сортів ломиносу (*Clematis* L.) різних садових груп. Підібрано режим стерилізації, що складається з послідовної обробки 70% розчином етанолу (1 хв), препаратом 0,3% «Дез Таб» (7–9 хв) і 1% Thimerosal (10 хв), та дає змогу знизити рівень контамінації первинних експлантів до 10–20%. Показано особливості розвитку та пагоноутворення експлантів залежно від типу, концентрації стерилізуючих речовин і термінів добору. Встановлено, що активно розвиваються в умовах *in vitro* експланти ломиносу, які було введено у фазу вегетації рослин (березень-квітень).

*Ключові слова:* ломиніс, мікропагін, стерилізація, експлант, *in vitro*.

Рід ломиніс (*Clematis* L.) належить до родини Жовтецевих (Ranunculaceae Juss) і налічує близько 300 видів. Ці рослини мають різне еколого-географічне походження, розповсюджені на території Євразії, Африки, Австралії, Нової Зеландії, Японії. Ломиноси широко відомі високою декоративністю, різноманітням форм квіток, тривалим цвітінням [1]. У Нікітському ботанічному саду перші рослини ломиносу було інтродуковано в 1813 році, а до 2009 року колекція налічувала 80 зразків сортів і форм, із яких 42 – сорти України, 32 – закордонної селекції та 16 природних видів і форм [4]. Багато рослин важко розмножуються традиційними методами. Сухі та спекотні умови Південного узбережжя Криму, високий інфекційний фон негативно впливають на ріст і розвиток ломиносів. Згідно з результатами обстежень колекційних ділянок НБС-ННЦ, 79,6% рослин мали зовнішні симптоми ураження вірусними, грибними і бактеріальними захворюваннями, зокрема, борошнистою россою [2, 9]. Поряд із цим, більшість рослин у колекції культивуються десятиріччями, що також значно обмежує їхнє розмноження.

Метод отримання рослин через культуру *in vitro* є альтернативним традиційному, оскільки дає змогу звільнити від екзогенної та ендогенної інфекції тканини рослин, одержати елітний безвірусний рослинний матеріал. У багатьох країнах саме таким шляхом розмножують різні квітково-декоративні культури, у тому числі й ломиніс [5, 10].

У НБС-ННЦ роботу з розмноження сортів ломиносу методами *in vitro* було розпочато у 90-х роках ХХ ст. Уперше для ломиносу на прикладі сортів вітчизняної та закордонної селекції було доведено можливість їхньої регенерації шляхом прямого і непрямого соматичного ембріогенезу [8, 10]. На цей час достатньо широко представлено біотехнологічні дослідження видів [11, 13, 15, 16] і найбільш поширених сортів ломиносу (наприклад, Multi Blue, President) [12, 14, 17–19, 22]. У Волгоградському ботанічному саду успішно розроблено метод клонального мікророзмноження низки сортів ломиносу [6]. В наших дослідженнях ми використовуємо рослини ломиносу різних садових груп, які об'єднує їхня

низька здатність до розмноження вегетативним шляхом з метою подальшого створення біотехнологічних систем соматичного ембріогенезу й органогенезу *in vitro*. Незважаючи на те, що самі етапи клонального мікророзмноження для більшості культур є однаковими (введення, розмноження, вкорінення й адаптація), в роботі з кожною культурою виникають свої складнощі, наприклад, експланти різних сортів однієї культури значно відрізняються за морфогенетичним потенціалом.

Метою цього етапу роботи було отримання асептичної культури і встановлення оптимальних строків введення експлантів ломиносу за умов *in vitro*, виявлення морфогенетичного потенціалу експлантів різних сортів ломиносу на етапі введення.

#### Матеріали та методи

Роботу виконано на базі лабораторії біохімії, біотехнології та вірусології рослин НБС-ННЦ у 2011–2012 роках. Для досліджень були відібрані сорти, які в умовах Південного узбережжя Криму важко розмножуються вегетативним шляхом: Ville de Lyon, Madam le Coultre, Юність, Альоша, Mrs Cholmondeley, Dr. Ruppel, Nelly Moser, Multi Blue, Лютер Бербанк, Asao, Sunset. Як модельні сорти, котрі успішно розмножуються традиційними методами, було залучено 2 сорти: Альонушка і Ювілейний-70. У досліджах були використані рослини життєвих форм: виткий напівчагарник (Альонушка) і основна частина сортів – чагарникові ліани.

Вихідними експлантами були пагони з вегетативними бруньками, які відбирали протягом усього року, за винятком місяців активного цвітіння рослин. Для стерилізації первинних експлантів використовували 70–96% етанол, 0,15%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,45% (концентрація за активним хлором) розчини препарату «Дез Таб» (43,0%-трихлорізоціанурова кислота; 20,0%-натрієва сіль дихлорізоціанурованої кислоти) (ТОВ Медпромінвест, Україна), 3–5% розчин комерційного препарату Domestos (гіпохлорит натрію) та 1–2% розчин Thimerosal (Merk, USA). Експозицію обробки стерилізуючим агентом встановлювали дослідним шляхом залежно від типу первинних експлантів і термінів їхнього відбору. У кожному досліді використано по 50–100 експлантів (по 5–10 шт. кожного сорту).

При проведенні досліджень використовували загальноприйняті методи [3, 5] і розроблені у НБС-ННЦ [7]. Роботу з введення експлантів в умови *in vitro* та субкультивування виконували в ламінарному боксі Fatran Lf (Чехія). Експланти ломиносу культивували на модифікованих нами поживних середовищах Clem і Cm [20]. За основу обох середовищ було взято поживне середовище Murasige і Скуга [21], що містить 2–3% сахарози, 1,0–1,1% агару, рН середовища доводили до 5,6–5,7.

Експланти і мікропагони ломиносу у пробірках, колбах або банках розміщували в культуральному приміщенні зі встановленою температурою  $24 \pm 1^\circ\text{C}$  і 16-годинним фотоперіодом. Субкультивування здійснювали через 20–40 діб.

#### Результати і їхнє обговорення

Вихідні експланти, залежно від ступеня їхнього забруднення, протирали марлевою серветкою, змоченою у 70%-ному етанолі. У наших досліджах передчасне замочування, витримування під проточною водою або обробка мильним розчином пагонів ломиносу не були успішними, тому що вже у першу добу після введення спостерігали масову появу бактеріальної інфекції у 57,7–70,6% експлантів. Без попереднього замочування й обробки мильним розчином інфікування проявлялося протягом 28 діб, і його частота не перевищувала 30–40% (в середньому по сортах).

Ступенева стерилізація експлантів відбувалась у кілька етапів (обробка етиловим спиртом і промивання дистильованою водою були невід'ємною частиною кожного режиму) і представлена у табл. 1.

Для отримання асептичної культури первинних експлантів було випробувано 14 режимів стерилізації (рис. 1) із розчинами хлорвмісних препаратів як головного стерилізуючого агента, адже саме хлор як діючу речовину найчастіше використовують для зменшення рівня контамінації експлантів різних садових культур [10]. Результати стерилізації, представлені у діаграмі, були узагальнені для експлантів усіх сортів.

Таблиця 1

Схема етапів стерилізації експлантів ломиносу

Етап стерилізації	Антисептик	Концентрація	Експозиція
1	Етиловий спирт	70–96%	0,5–1 хв
2	Дез Таб	0,15%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,45%	7–24 хв
	або		
	Domestos	3–5%	7–15 хв
3	Чотириразове промивання дистильованою водою		10–15 хв
4	Thimerosal	1–2%	10–15 хв
5	Триразове промивання дистильованою водою		

Обробка первинних експлантів ломиносу 5% розчином Domestos виявилася не досить вдалою, незважаючи на низький рівень контамінації (менш ніж 10%) усі експланти протягом 14–28 днів поступово темнішали і не розвивалися, зокрема експланти поодиноких бруньок (вар. № 2). Спільне використання 3% Domestos (14 хв) і 1% Thimerosal (10 хв) дало змогу знизити рівень ушкодження вегетативних бруньок, але кількість інфікованих експлантів зросла до 32,7%, і розвиток бруньок у мікропагони не відбувся (рис. 1, вар. № 10).

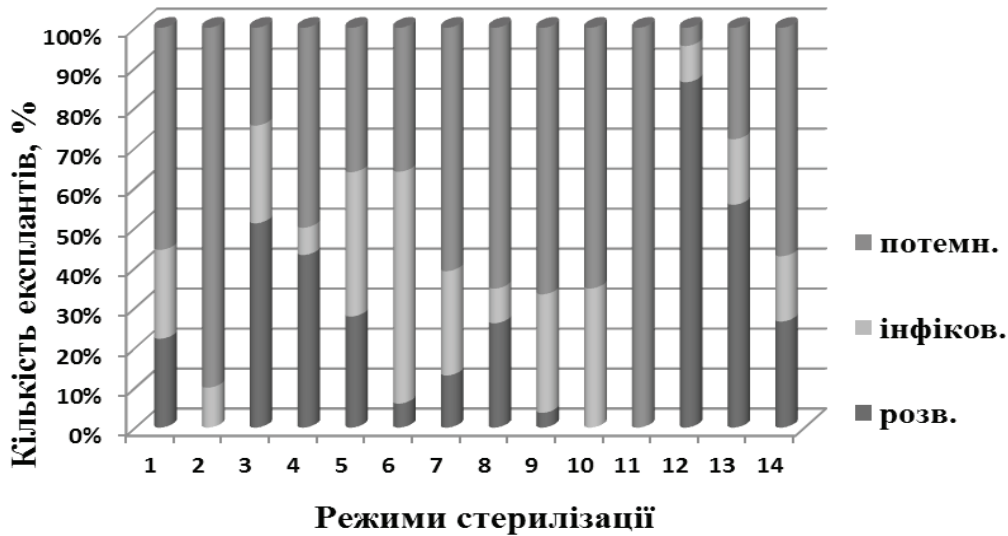


Рис. 1. Результати стерилізації експлантів ломиносу. Режими стерилізації: 1) 0,3% Дез Таб (10 хв); 2) 3 % Domestos (10 хв); 3) 0,45% Дез Таб (8 хв); 4) 1% Thimerosal (2 хв) → 0,4% Дез Таб (7 хв); 5) 0,4% Дез Таб (7 хв); 6) мильний розчин (10 хв) → 0,3% Дез Таб (8 хв); 7) 1% Thimerosal (10 хв) → 0,3% Дез Таб (14 хв); 8) 1% Thimerosal (10 хв) → 0,3% Дез Таб (24 хв); 9) 1% Thimerosal (10 хв) → 0,2% Дез Таб (20 хв); 10) 3% Domestos (14 хв) → 1% Thimerosal (10 хв); 11) 1% Thimerosal (10 хв) → 0,15% Дез Таб (18 хв); 12) 0,3% Дез Таб (7 хв) → 1% Thimerosal (10 хв); 13) 0,3% Дез Таб (8,5 хв) → 1% Thimerosal (10 хв); 14) 0,3% Дез Таб (10 хв) → 1% Thimerosal (15 хв).

Можливо, це спричинено недостатньою ефективністю препарату у використаній концентрації та експозиції. Крім того, у 80,0% випадків спостерігали затемнення поживного середовища через виділення експлантами фенолів. Саме тому із подальших дослідів Domestos було вилучено.

Загалом, вплив кожного з антисептиків на експланти був різним. Розчини «Дез Таб» чинили більш м'який ефект на рослинні тканини порівняно з розчинами Domestos, тому в подальших дослідях комбінували два препарати: «Дез Таб» і Thimerosal у різних експозиціях. Особливо чутливими до будь-якого стерилізуючого агента виявилися експланти сортів Mrs Cholmondeley, Ville de Lyon, Sunset, які практично повністю темнішали. Крім того, у експлантів сортів Dr. Ruppel, Лютер Бербанк через 30 діб оводнювалися бруньки, пагони сорту Nelly Moser і Multi Blue світлішали та ставали хлоротичними.

З метою зниження кількості ушкоджених експлантів було виконано досліди на зменшення концентрації антисептиків і збільшення експозиції, однак очікуваних результатів не отримано. Зокрема, при використанні 0,2% розчину «Дез Таб» з експозицією 20 хв і Thimerosal – 10 хв через добу після введення у експланти спостерігали значне затемнення поживного середовища через виділення експлантами фенолів (рис. 2). Частота контамінації ломиносу була 27,8% (вар. № 9), вільні від інфекції експланти протягом наступних 30–60 діб культивування не розвивалися. Після спільної стерилізації 0,3% розчинами «Дез Таб» і 1% розчином Thimerosal (8–10 хв) у експлантів сортів Madam le Coultre, Sunset, Multi Blue, Лютер Бербанк через 5–15 діб починала розростатися базальна частина сегментів пагону. Виділення фенолів у поживне середовище не відбувалося, за винятком поодиноких експлантів окремих сортів (рис. 3).

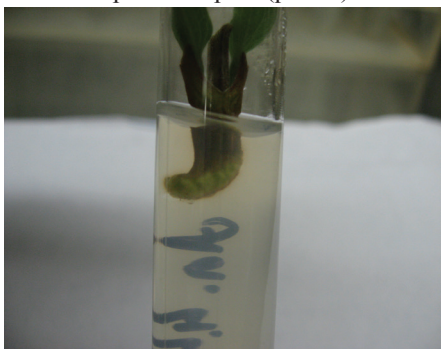


Рис. 2. Розростання базальної частини мікропагона ломиносу через 9 діб.

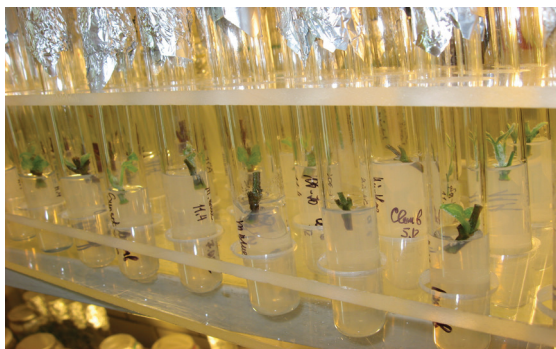


Рис. 3. Експланти ломиносу, введені за умов *in vitro* (через 1 добу).

У результаті проведених досліджень було підібрано режим стерилізації для усіх сортів, який полягає у послідовній обробці сегментів пагонів розчином етанолу, розчином «Дез Таб» у концентрації 0,3% з подальшим зануренням експлантів у 1% Thimerosal (вар. 12). Необхідно відзначити, що експозиції препаратів слід збільшувати на 1–5 хв залежно від рівня забруднення рослин-донорів, погодних умов і строків відбору рослинних об'єктів.

Експланти вводили у стерильні умови в період з 2011 по 2012 роки у січні та щомісяця у квітні-грудні. Було встановлено, що експланти усіх досліджуваних сортів успішно розвивалися при введенні в стерильні умови у фазу активної вегетації рослин (у 2012 році – у квітні) (рис. 4). Протягом 1–3 діб у всіх сортів починали розгортатися листки бруньок. Через 5–9 діб культивування листя було повністю розвинене і починала розростатися базальна частина, на якій формувалися глобулярні структури світло-зеленого кольору.



Із бруньок, що містилися на сегментах пагонів, введених за умов *in vitro* в період бутонізації та в першу хвилю цвітіння рослин, листя розвивалося протягом кількох тижнів. Експланти сортів Лютер Бербанк, Альоша, Ville de Lyon, відібрані влітку (червень), у перші 14 діб культивування розвивалися значно швидше, порівняно з тими, що вводили навесні (травень). Однак у наступних пасажах відзначали уповільнення процесів морфогенезу: нове листя і апекс не розвивалися, видовження пагонів не відбувалося. Разом із цим, у експлантів зазначених сортів, введених у квітні, в цей період пагони мали від 2 до 5 міжвузль (рис. 5).



Рис. 4. Первинні експланти ломиносу сорту Ювілейний-70, що введені за умов *in vitro* у квітні.



Рис. 5. Активний розвиток мікропагонів сорту Альонушка з експлантів, що введені в культуру *in vitro* у фазу вегетації рослин.

Сегменти з бруньками, які було поміщено на поживне середовище у серпні-вересні, незначно збільшувалися у розмірах і довгий час не змінювали кольору. Протягом 2–4 наступних субкультивувань візуальних морфологічних змін не відбувалося, однак поступово від 33 до 90% експлантів сортів Dr. Ruppel, Madam le Coultre, Nelly Moser, Multi Blue, Лютер Бербанк, Asao, Sunset повністю темнішали і не розвивалися. Крім того, набрякання бруньок, збільшення їх у розмірах відбувалося значно пізніше порівняно з експлантами, введеними в інші місяці. Наприклад, у вересні перші ознаки розвитку спостерігали через 5–19 діб після введення: Dr. Ruppel – 5 діб, Mrs Cholmondeley – 14–16 діб, Ville de Lyon – 16–18 діб, Лютер Бербанк – 18–19 діб. Поряд із цим кількість розвинутих бруньок варіювала від 1 до 4 шт. на експлант (рис. 6). Узагалі, цей період є малорезультативним для введення ломиносу в культуру *in vitro*.

Необхідно відзначити вплив сортових особливостей на регенерацію *in vitro* мікропагонів ломиносу. При вивченні взаємозв'язку між строками введення і життєздатністю експлантів було встановлено, що сорти Sunset, Dr. Ruppel, Лютер Бербанк, Asao, Ювілейний-70 мали низьку здатність до регенерації за умов *in vitro* порівняно з експлантами інших сортів. Це проявлялось у більш тривалому за часом процесі регенерації: бруньки набрякли і розкривалися у строк, коли у експлантів інших сортів уже розгорнулося листя, і мікропагони подовжилися на 1–2 міжвузля. Серед вивчених сортів протягом усього періоду досліджень високим морфогенетичним потенціалом відрізнявся сорт Альонушка,



у якого, залежно від строків добору, кількість життєздатних експлантів варіювала від 66,7 до 100%. Сорт Ювілейний-70, який разом із Альонушкою був вибраний як модельний, не показав таких результатів. Експланти розвивалися протягом 50–90 діб, але через два субкультування міжвузля не подовжувались, апекси і базальна частина сегментів повністю темнішали.

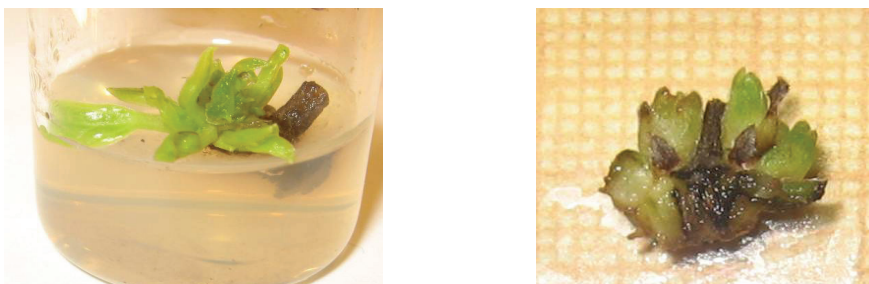


Рис. 6. Відмінності у кількості розвинутих бруньок: а) сорт Юність – 1 розвинена брунька; б) сорт Nelly Moser – 4 розвинених бруньки.

Таким чином, нами розроблено режим стерилізації експлантів різних сортів ломиносу, що складається з послідовної обробки 70% розчином етанолу (1 хв), 0,3% препаратом «Дез Таб» (7–9 хв) і 1% Thimerosal (10 хв), який дав змогу знизити рівень контамінації до 10–20%. При необхідності введення здерев'янілих експлантів експозицію хлорвмісного розчину слід збільшити на 4–6 хв залежно від ступеня забруднення рослинного матеріалу. Встановлено вплив строків добору експлантів на регенерацію мікропагонів за умов *in vitro*: активно розвиваються експланти, які введено у фазу вегетації рослин-донорів (березень–квітень).

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Бескаравайная М. А.* Клематисы. М.: Росагропромиздат, 1991. 189 с.
2. *Бескаравайная М. А., Митрофанова О. В.* Грибные болезни клематисов // Цветоводство. 1972. № 7. С. 21.
3. *Бутенко Р. Г.* Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. М: Наука, 1964. 272 с.
4. *Зубкова Н. В.* Коллекция клематиса Никитского ботанического сада: Тезисы Международ. науч. конф., посвящ. 200-летию Ч. Дарвина и 200-летию Никитского бот. сада (3–6 ноября 2009 г.). Ялта, 2009. С. 27.
5. *Калинин Ф. Л., Сарнацкая В. В., Полищук В. Е.* Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. К: Наук. думка, 1980. 488 с.
6. *Коротков О. О., Короткова О. И.* Сохранение коллекции клематисов (*Clematis* L.) в культуре *in vitro* // Сб. статей по материалам III Всерос. науч.-практ. конф. / ГУ Волгоградский региональный ботанический сад. Волгоград, 2012. С. 145–152.
7. *Митрофанова О. В., Михайлов А. П., Чехов А. В.* Биотехнологические аспекты освобождения от вирусов и клонального микроразмножения некоторых экономически важных многолетних культур // Сб. науч. трудов Никитского бот. сада. Ялта, 1997. Т. 119. С. 7–34.
8. *Митрофанова И. В., Соколов О. И., Ежов В. Н.* Непрямой соматический эмбриогенез клематиса (*Clematis* sp.) // Сб. науч. трудов Никитского бот. сада. Ялта, 2007. Т. 127. С. 9–20.

9. Митрофанова І. В., Митрофанова О. В., Ежов В. Н. и др. Выявление фитопатогенов в садово-парковых агроценозах и биотехнологические пути оздоровления вегетативно размножаемых декоративных и плодовых культур // Материалы междунар. конф., посвящ. 80-летию Центрального бот. сада НАН Беларуси. Минск, 2012. II часть. С. 423–427.
10. Митрофанова І. В. Соматический эмбриогенез и органогенез как основа биотехнологии получения и сохранения многолетних садовых культур. К.: Аграрна наука, 2011. 344 с.
11. Dabski M., Parzymies M. Wplyw cytokinin na namnazanie powojnika calolistnego (*Clematis integrifolia* L.) *in vitro* // Zesz. Probl. Post. Nauk Rol. 2006. Vol. 510. P. 119–125.
12. Erwin J. E., Schwarze D., Donahue R. Factors affecting propagation of *Clematis* by stem cutting // HortTechnology. 1997. Vol. 7. N 4. P. 408–410.
13. Gabryszewska E., Kawa-Miszczak L., Wegrzynowicz-Lesiak E., Saniewski M. Zesz. Effect of temperature and various levels of C and N in the medium on the growth and development of *Clematis pitcheri in vitro* // Zesz. Probl. Post. Nauk Rol. 2008. Vol. 524. P. 73–81.
14. Guan-Kai Y., Li-Zhi J., Li-Jing X., Kuan-Jian A preliminary study on the introduction and cultivation of *Clematis* // Acta Botanica Yunnanica. 2002. Vol. 24. N 3. P. 392–396.
15. Hlebionek G. Rozmnazanie powojnika gorskiego (*Clematis montana* «Rubens») za pomocą sadzonek pedowych: materialy z ogólnopolskiej konferencji “Postep w rozmnazaniu roślin ozdobnych”. Kraków, 16–17 wrzesnia 1994, AR im Huggona Kollataja. S. 77–81.
16. Kawa-Miszczak L., Wegrzynowicz-Lesiak E., Gabryszewska E., Saniewski M. Effect of different sucrose and nitrogen levels in the medium on chlorophyll and anthocyanin content in *Clematis pitcheri* shoots cultured *in vitro* at different temperatures // J. Fruit and Ornamental Plant Research. 2009. Vol. 17. N 1. P. 113–121.
17. Kreen S., Svensson M., Rumpunen K. Rooting of clematis microshoots add stem cutting in different substrates // Sci. Hort. 2002. Vol. 96. P. 351–357.
18. Lees R. P., Evans E. H., Nicholas J. R. Photosynthesis in *Clematis* «President», during growth *in vitro* and subsequent *in vivo* acclimatization // J. Ext. Bot. 1991. Vol. 42. P. 605–610.
19. Lees R. P., Evans E. H., Brown R. G. A study of the chlorophyll fluorescence from mature and micropropagated *Clematis* by time-resolved spectroscopy // J. Photochem. Photobiol. B: Biology. 1991. Vol. 8. P. 307–313.
20. Mitrofanova I. V., Mitrofanova O. V. Special features of somatic embryogenesis and plant regeneration of *Clematis in vitro* // Propagation of Ornamental Plants. Sofia: SEEK and SHARE: Balkanpress. 2000. P. 70–75.
21. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays tobacco tissue culture // Physiol. Plant. 1962. Vol. 15. N 3. P. 473–497.
22. Qi Xiang Zhang, Heng Kang Hu, Ai xia Wang, Yan Ming Fang. Somatic embryogenesis and plant regeneration of *Clematis* «Multi-Blue» // Propagation of Ornamental Plants. 2011. Vol. 11. N 1. P. 21–27.

Стаття: надійшла до редакції 13.03.13

доопрацьована 27.08.13

прийнята до друку 13.09.13

**DEVELOPMENT OF *CLEMATIS* (*CLEMATIS* L.) EXPLANTS DURING THE STAGE OF INTRODUCTION IN CONDITIONS *IN VITRO*****N. Korzina, I. Mitrofanova**

*Nikitsky Botanical Gardens  
National Scientific Centre, NAAS of Ukraine  
98648, Ukraine, Crimea, Yalta, Nikita  
e-mail: in vitro@ukr.net*

In Nikitsky Botanical Gardens – National Scientific Centre the investigation with aseptic culture obtaining of primary explants in 13 cultivars of different clematis (*Clematis* L.) garden groups have been continued. The sterilization conditions by 70% solution alcohol (1 min), 0,3% Dez Tab (7–9 min) and 1% Thimerosal (10 min) have been found, which decrease the contamination level of explants till 10 to 20%. The peculiarities of shoot development, depending on the time of selection, the type and concentration of the sterilizing agents have been shown. It was established, that clematis explants have active growth *in vitro* during their introduction on the stage of plant vegetation (March-April).

*Keywords:* clematis, microshoot, sterilization, explant, *in vitro*.

**РАЗВИТИЕ ЭКСПЛАНТОВ КЛЕМАТИСА (*CLEMATIS* L.) НА ЭТАПЕ ВВЕДЕНИЯ В УСЛОВИЯ *IN VITRO*****Н. Корзина, И. Митрофанова**

*Никитский ботанический сад  
Национальный научный центр НААН Украины  
г. Ялта, пгт Никита 98648, АР Крым, Украина  
e-mail: in vitro@ukr.net*

В НБС-ННЦ продолжены исследования по получению асептической культуры первичных эксплантов 13 сортов клематиса (*Clematis* L.) разных садовых групп. Подобран режим стерилизации, который состоит из последовательной обработки 70% раствором этанола (1 мин), препаратом 0,3% «Дез Таб» (7–9 мин) и 1% Thimerosal (10 мин), которые позволили снизить уровень контаминации первичных эксплантов до 10–20%. Показаны особенности развития и побегообразования эксплантов в зависимости от типа, концентрации стерилизующих веществ и сроков отбора. Установлено, что активно развиваются в условиях *in vitro* экспланты клематиса, которые были введены в фазу вегетации растений (март-апрель).

*Ключевые слова:* клематис, микропобег, стерилизация, эксплант, *in vitro*.

УДК: 58.009, 58.032.1, 58.037

**ДИСПЕРСІЙНИЙ АНАЛІЗ ВПЛИВУ ПОСТІЙНОГО МАГНІТНОГО ПОЛЯ  
НА ПРОРОСТАННЯ НАСІННЯ ТА РІСТ КОРЕНЯ І СТЕБЛА ДУРМАНУ  
ЗВИЧАЙНОГО НА РАННІХ ЕТАПАХ ОНТОГЕНЕЗУ**

**Ю. Бено<sup>1\*</sup>, М. Дика<sup>1</sup>, К. Скварко<sup>2</sup>**

*<sup>1</sup>Львівський національний університет імені Івана Франка  
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна  
e-mail: urko.bn@gmail.com*

*<sup>2</sup>Ботанічний сад Львівського національного університету імені Івана Франка  
вул. М. Черемшини, 44, Львів 79014, Україна  
e-mail: k.skvarko@gmail.com*

Використовуючи двофакторний дисперсійний аналіз, провели оцінку впливу постійного магнітного поля тривалістю дії 30 хв, 3 год, 15 год та 24 год і різної інтенсивності поля (5, 30 та 60 Е) на проростання насіння, довжину кореня та стебла дурману звичайного на ранніх етапах онтогенезу. Встановлено, що зміни динаміки проростання насіння, довжини кореня та стебла зумовлені більшою мірою інтенсивністю дії постійного магнітного поля, чутливість до якого спадає в часі.

*Ключові слова:* дурман звичайний, постійне магнітне поле, дисперсійний аналіз.

Дослідження впливу магнітного поля на рослинні об'єкти залишається актуальною проблемою. Наприклад, зниження напруженості геомагнітного поля в сотні й тисячі разів має певні фізіологічні наслідки для рослин. При цьому деякі рослини (огірки та редис) відповідають прискоренням, інші – гальмуванням проростання (кукурудза, ячмінь) з наступним поверненням до норми, треті – відсутністю реакції або появою пухлиноподібних утворень [9].

Велика інтенсивність чи тривалість дії магнітного поля не завжди має позитивний вплив на рослинний організм. Інтенсивність постійного магнітного поля (ПМП) в 1600 Е впливає на ріст проростків пшениці менш помітно, ніж поле в 60 Е. Заслугує уваги той факт, що і короткочасна (до 30 хв) дія ПМП інтенсивністю 20 Е, яка збігається з напрямом магнітного поля землі, стимулює ріст кореня [15].

На сучасному етапі розвитку сільського господарства дедалі більше уваги спрямовано на використання екологічно чистих методів обробки насіння сільськогосподарських культур із метою селекції нових сортів, збільшення врожайності та покращення зберігання врожаю [12]. Відомо, що одним із критичних етапів у житті рослинного організму, від якого залежить виживання генотипу, є фаза проростання насіння. Доведено, що кінцевий урожай краще корелює з ранньою появою сходів порівняно з іншими параметрами. Чим довший період від посіву до появи сходів, тим більша ймовірність мікробного та грибового їх ураження і загибелі [6]. Тому дуже широко досліджуються способи застосування фізичних факторів, мікроелементів, вітамінів, світла та інших фізіологічно активних речовин з метою підвищення швидкості проростання насіння [14].

У дослідженнях, отриманих нами в біофізичній лабораторії ботанічного саду [4], впливу ПМП на проростання насіння, довжину кореня та стебла дурману звичайного

встановлено, що ефект від впливу поля залежить від інтенсивності та тривалості його дії. Низька інтенсивність поля та його короткотривалий вплив стимулював проростання насіння дурману звичайного, але при дослідженні впливу ПМП на довжину кореня та стебла не спостерігали стимулюючого ефекту.

Для визначення причини, від якої більше залежать зміни проростання насіння, довжини кореня та стебла – від тривалості дії магнітного поля чи від інтенсивності впливу, ми вважали за доцільне кількісно оцінити вплив цих чинників. Та при такому дослідженні доводиться мати справу з впливом багатьох чинників (як зазначених вище, так і не врахованих в експерименті). Одним із адекватних методів оцінки впливу досліджуваних чинників і їх взаємодії є багатофакторний дисперсійний аналіз, що дає змогу оцінити мінливість досліджуваних показників.

Метою даної роботи була кількісна оцінка впливу ПМП різної тривалості дії (30 хв, 3 год, 15 год і 24 год – перший фактор) та інтенсивності (5, 30 і 60 Е – другий фактор) на проростання насіння, довжину кореня та стебла дурману звичайного на початкових етапах онтогенезу.

#### Матеріали та методи

Вихідним матеріалом дослідження були експериментальні дані, отримані нами в лабораторії ботанічного саду ЛНУ імені Івана Франка [4], а саме – середні значення проростання насіння, довжини кореня та стебла дурману звичайного за дії ПМП різної інтенсивності (5, 30 і 60 Е) та різної тривалості дії (30 хв, 3 год, 15 год, 24 год) на початкових етапах онтогенезу (1–12 дні).

Визначення проростання насіння, довжини кореня та стебла дурману звичайного ми проводили за такою методикою. Сухе насіння піддавали впливу ПМП протягом 30 хв, 3 год, 15 год, 24 год, інтенсивність ПМП 5, 30 або 60 Е. Індукцію ПМП визначали за допомогою датчика Холла. Насіння поміщали в чашки Петрі на фільтрувальний папір і зволожували дистильованою водою. Чашки витримували до 30 днів у термостаті за температури 30°C до завершення досліду (ГОСТ 20290-74). Підрахунок пророслого насіння протягом перших 12 днів проводили щодня. Проростання насіння розраховували у відсотках після статистичного аналізу результатів, одержаних із 4-х вибірок по 30–50 насінин у кожній з них. Щоб оцінити характер регуляції ростових процесів у рослин після передпосівної обробки насіння ПМП, паростки, в яких довжина коріння становила 2,0–2,5 см, переносили на середовище Гельрігеля і протягом одного місяця вирощували у вегетаційній кімнаті при температурі 22–24°C у водних культурах за умов природного освітлення. Морфометричним показником росту рослин була довжина коріння та стебел паростків [11]. Усі зміни за дії ПМП оцінювали відносно часового тренду проростання насіння та росту контрольних (інтактних) рослин.

Експериментальний матеріал опрацьовували за допомогою методу двофакторного дисперсійного аналізу. Для кожного з досліджуваних показників визначали відносні частки впливу інтенсивності (5, 30 та 60 Е) та тривалості (30 хв, 3 год, 15 год, 24 год) дії поля на фоні впливу не врахованих у експерименті чинників, а також оцінювали статистичну значимість цих впливів.

Організація досліджень була такою:

1) двофакторний дисперсійний аналіз для оцінки впливу інтенсивності ПМП (перший досліджуваний чинник) і тривалості його дії (другий досліджуваний чинник) на проростання насіння дурману звичайного; виконано 4 серії двофакторного дисперсійного аналізу за експериментальними даними, отриманими на 1, 2, 3 та 4-й дні дослідження.

2) двофакторний дисперсійний аналіз для оцінки впливу інтенсивності та тривалості дії ПМП на довжину кореня та стебла дурману звичайного; виконано по 3 серії двофакторного дисперсійного аналізу для кожного з показників за експериментальними даними, отриманими на 6, 9 та 12-й дні дослідження.

Порівняння зміни морфометричних показників росту дурману звичайного в досліджувані періоди за дії ПМП проводили зі змінами в контрольній групі.

Дисперсійний аналіз проводили з використанням засобів Microsoft Excel, підпрограму з Аналізу даних (двофакторний дисперсійний аналіз з повтореннями), завдяки яким також оцінювали вірогідність отриманих результатів дослідження.

### Результати і їхнє обговорення

Для порівняння впливу досліджуваних факторів на динаміку ростових процесів було проведено серію двофакторних дисперсійних аналізів з обчисленням їх часток впливу. На рис. 1 показано відносні частки впливу інтенсивності (5, 30 та 60 Е) та тривалості (30 хв, 3 год, 15 год, 24 год) дії ПМП на проростання насіння дурману звичайного з 1-го по 4-й день досліду.

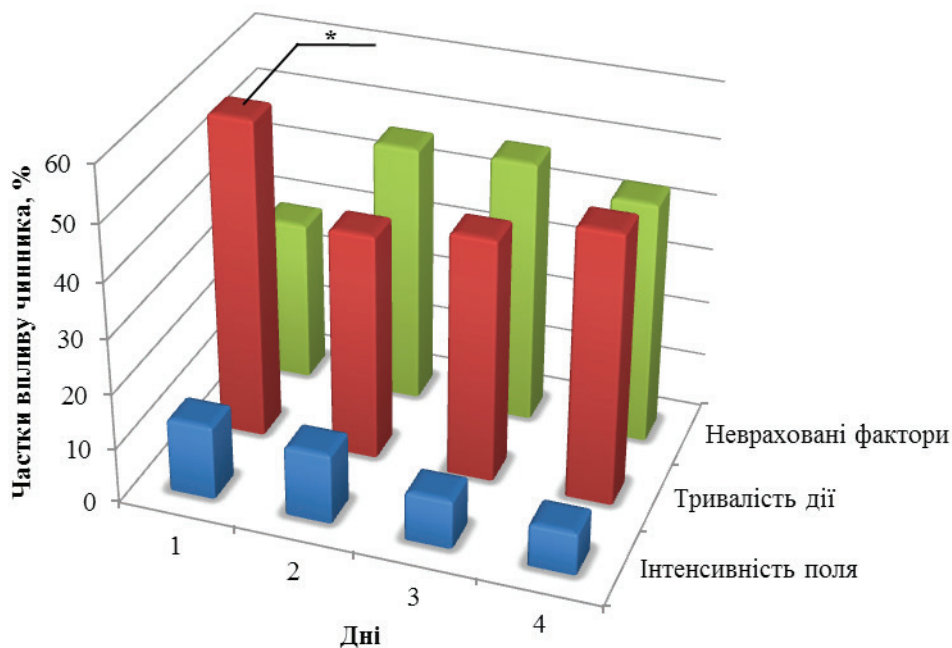


Рис. 1. Частки впливу інтенсивності та тривалості дії постійного магнітного поля на проростання насіння дурману звичайного. Вірогідні зміни порівняно з контролем: \* –  $P < 0,05$  – достовірно,  $P > 0,05$  – недостовірно.

У перший день дослідження частка впливу інтенсивності ПМП становила 13,3% і зменшувалася до 7,7% на четвертий день (рис. 1). Частка впливу тривалості дії постійного магнітного поля в перший день досліджень сягала 57,6% ( $P < 0,05$ ) і в подальшому зменшувалася до 48,7% ( $P > 0,05$ ), що дає змогу припустити про чутливість дурману звичайного до досліджуваного фактора на початковому етапі дослідження.

Результати експериментального дослідження також свідчать [4], що залежність проростання насіння від інтенсивності та тривалості дії постійного магнітного поля в кожен



із днів експерименту є неоднаковою, причиною цього може бути зміна чутливості дурману звичайного до досліджуваних факторів у ході його розвитку.

У порівнянні з результатами дисперсійного аналізу впливу ПМП на проростання насіння, при обчисленні частки впливу інтенсивності постійного магнітного поля на довжину кореня та стебла дурману звичайного (6, 9 та 12-й дні дослідження) вона була значною і коливалась у межах 40–70,4% (рис. 2, 3). На 6-й день досліду для довжини кореня частка впливу інтенсивності ПМП становила 70,4% ( $P < 0,01$ ) та для стебла 59,2% ( $P < 0,05$ ) і була найсильнішим фактором впливу, а на 12-й день зменшилася до 41,8% і 40%, відповідно. Отримані дані дають змогу припустити, що інтенсивність впливу ПМП становила основу стимулюючого ефекту на ріст кореня та стебла дурману звичайного.

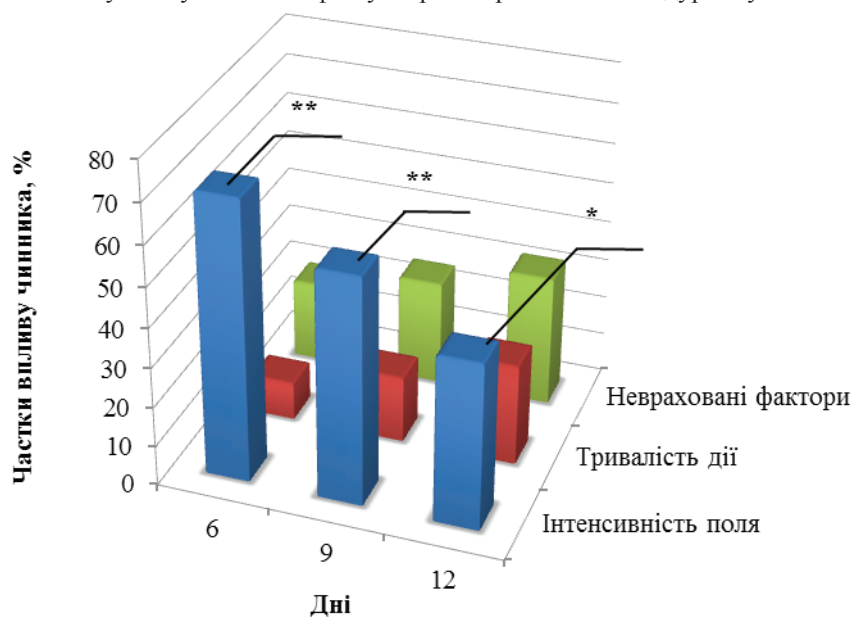


Рис. 2. Частки впливу інтенсивності та тривалості дії постійного магнітного поля на довжину кореня дурману звичайного. Вірогідні зміни порівняно з контролем: \* –  $P < 0,05$  – достовірно, \*\* –  $P < 0,01$ ,  $P > 0,05$  – недостовірно.

Частка впливу тривалості дії ПМП, яка при дослідженні проростання насіння зумовила майже 50% змін досліджуваного показника, при біометрії кореня була незначною і коливалась у межах 9,4–25,3% (рис. 2). На 6-й день вона становила 9,4% ( $P > 0,05$ ) і зростала до 16,6% ( $P > 0,05$ ) та 25,3% ( $P > 0,05$ ) на 9-й і 12-й день дослідження, відповідно. Варто відзначити, що порівняно з експериментальними даними при збільшенні тривалості дії постійного магнітного поля спостерігалось незначне гальмування у рості кореневої системи дурману звичайного в усіх варіантах досліду [4].

При дослідженні цього ж фактора на довжину стебла було отримано результати, наведені на рис. 3.

Частка впливу тривалості дії ПМП була незначною, на 6-й день дослідження вона становила 12,5%, а на 9-й і 12-й день – 10,5 та 11,3% ( $P > 0,05$ ), відповідно. Результати експериментального дослідження також підтверджують незначні зміни довжини стебла дурману звичайного за короткотривалої дії ПМП (30 хв і 3 год) та гальмування в рості стебла й аномальній формі та жовтизні листя при довготривалій дії (15, 24 год).

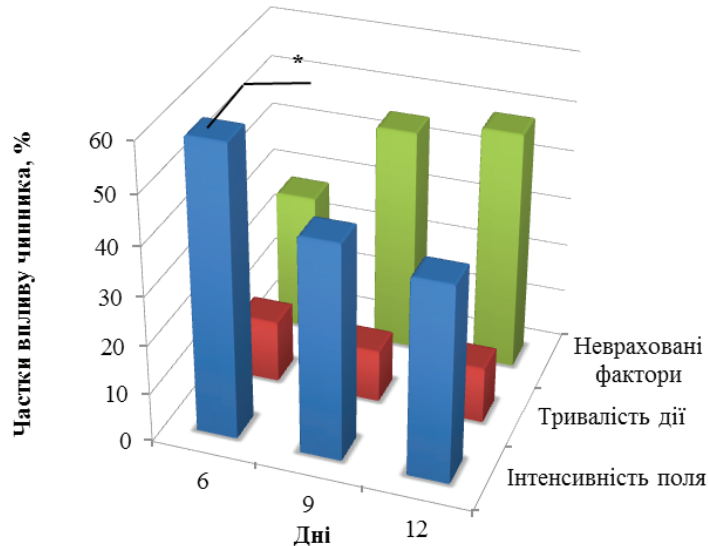


Рис. 3. Частки впливу інтенсивності та тривалості дії постійного магнітного поля на довжину стебла дурману звичайного. Вірогідні зміни порівняно з контролем: \* –  $P < 0,05$  – достовірно,  $P > 0,05$  – недостовірно.

Визначена відносна частка не врахованих в експерименті факторів досить значна. При дослідженні динаміки проростання насіння, довжини кореня та стебла дурману звичайного спостерігається тенденція до збільшення частки впливу неврахованих факторів. Це може бути пов'язано з тим, що на відкриті системи впливають фактори, які не завжди вдається виключити чи описати і, можливо, причиною також є зменшення сприйнятливості дурману звичайного до дії ПМП.

Отримані результати свідчать, що вплив постійного магнітного поля різної інтенсивності та тривалості дії є неоднаковим на досліджувані показники росту дурману звичайного і змінюється протягом його розвитку. Максимальна чутливість до ПМП спостерігається в 1-й день дослідження проростання насіння та 6-й, 9-й дні росту кореня і стебла. На початковому етапі проростання насіння досліджуваний об'єкт найбільш чутливий до тривалості впливу ПМП, а основний стимулюючий ефект на початкових етапах онтогенезу дурману звичайного (довжина кореня та стебла) залежить значною мірою від інтенсивності впливу поля.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Аксенов С. И., Булычев А. А., Грунина Т. Ю., Туровецкий В. Б. О механизмах воздействия низкочастотного магнитного поля на начальные стадии прорастания семян пшеницы // Биофизика. 1996. Т. 41. Вып. 4. С. 179–198.
2. Антоняк О. Т. Загальна фізика: основи електрики і магнетизму: навч. посібник. Львів: Вид. центр ЛНУ ім. Івана Франка, 2009. 240 с.
3. Баран Б. А. Влияние магнитного поля на кинетику химических реакций // Укр. хим. журнал. 1998. Т. 64. № 4. С. 26–29.
4. Бено Ю., Дика М., Скварко К. Порівняльний аналіз дії постійного магнітного поля на схожість насіння лікарських рослин // Молодь і поступ біології: VII Міжнар. наук. конф. студентів та аспірантів. Львів, 2011. С. 6–7.

5. Бучаченко А. Л., Сагдеев Р. З., Салихов К. М. Магнитные и спиновые эффекты в химических реакциях. Новосибирск: Наука, 1978, 396 с.
6. Данович К. Е., Соболев А. М., Жданова К. П. и др. Физиология семян. М.: Наука, 1982. 318 с.
7. Дорфман Я. Г. О специфике воздействия магнитных полей на диамагнитные макромолекулы в растворе // Биофизика. 1962. № 7. 733 с.
8. Дорфман Я. Г. О физическом механизме воздействия статических магнитных полей на живые системы. М.: Изд-во ВИНТИ, 1966. 234 с.
9. Копанев В. И., Шакула А. И. Влияние гипомагнитного поля на биологические объекты. М.: Наука, 1986. 158 с.
10. Кучерук І. М., Горбачук І. Т., Луцик П. П. Загальний курс фізики: навчальний посібник для студентів вищих технічних і педагогічних закладів освіти / за ред. І. М. Кучерука. К.: Техніка, 2001. Т. 2: Електрика і магнетизм. 452 с.
11. Лакін Г. Ф. Биометрия: учеб. пособие для биол. спец. вузов. 4-е изд., перераб. и доп. М.: Высшая школа, 1990. 352 с.
12. Новицкий Ю. И. Действие постоянного магнитного поля на растения // Вестн. АН СССР. 1968. № 9. С. 92.
13. Новицкий Ю. И., Стрекова В. Ю., Тараканова Г. А., Прудникова В. П. О некоторых особенностях действия постоянного магнитного поля на прорастание семян / В кн.: Говорят молодые ученые. М.: Московский рабочий, 1966. С. 47.
14. Овсянкин В. В., Феофилов П. П. Кооперативная сенсбилизация фотофизических и фотохимических процессов / В кн.: Молекулярная фотоника. Л.: Наука, 1970. С. 86–106.
15. Савостин П. В. (Ssawostin P.W.) Magnetwachstumsreaktionen bei Pflanzen // Planta (Berlin), 1930. 12, N 2. 327 с.
16. Сиротина Л. В., Сиротин А. А., Травкин М. П. Некоторые особенности биологического действия слабых магнитных полей / В кн.: Реакция биологических систем на слабые магнитные поля. М., 1971. С. 95.
17. Совински П., Быкова Л. В., Шепановска М., Бельцаж Б. К вопросу о механизме действия постоянного магнитного поля на проростки кукурузы, выявляемого по повышению устойчивости к холоду // Препр. Объед. Ин-т Ядерных Исслед., Дубна. 1990. № Р 19-90-157. С. 1–7.
18. Стрекова В. Ю., Тараканова Г. А., Прудникова В. П., Новицкий Ю. И. Некоторые физиологические и цитологические изменения у прорастающих семян в постоянном магнитном поле. I. Влияние неоднородного магнитного поля низкой напряженности // Физиол. растений. 1965. Т. 12. Вып. 5. С. 920.
19. Тараканова Г. А., Стрекова В. Ю., Прудникова В. П., Новицкий Ю. И. Некоторые физиологические и цитологические изменения у прорастающих семян в ПМП. II. Влияние однородного МГ поля низкой напряженности // Физиол. растений. 1965. Т. 12. Вып. 6. С. 1029.
20. Тишанькин В. Ф. Газообмен у мышей в постоянном магнитном поле // Тр. Пермского мед. ин-та. 1950. Вып. 24–25. С. 105.
21. Haberditzl W. Enzyme activity in high magnetic fields // Nature. 1967. 213. N 5071. P. 72.

Стаття: надійшла до редакції 19.03.13

доопрацьована 29.10.13

прийнята до друку 30.10.13

**ANALYSIS OF VARIANCE THE INFLUENCE OF CONSTANT MAGNETIC FIELD ON SEED GERMINATION, GROWTH OF ROOTS AND STEMS OF *DATURA STRAMONIUM* L. IN THE EARLY STAGES ONTOGENESIS**

**Yu. Beno<sup>1</sup>, M. Dyka<sup>1</sup>, K. Skvarko<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Ivan Franko National University of Lviv  
4, Hrushevskiyi St., Lviv 79005, Ukraine  
e-mail: urko.bn@gmail.com*

<sup>2</sup>*Botanical Garden, Ivan Franko National University of Lviv  
44, M. Cheremshyna St., Lviv 79014, Ukraine  
e-mail: k.skvarko@gmail.com*

Using two-factor analysis of variance evaluated the influence of a constant magnetic field duration of 30 min, 3 h, 15 h and 24 h and varying intensity field (5, 30 and 60 F) on seed germination, growth of roots and stems of *Datura stramonium* L. in the early stages of ontogeny. Found that changes in the dynamics of seed germination, growth of roots and stems due to a greater extent, the intensity of the constant magnetic field sensitivity which decreases over time.

*Keywords: Datura stramonium* L., constant magnetic field, analysis of variance.

**ДИСПЕРСИОННЫЙ АНАЛИЗ ВОЗДЕЙСТВИЯ ПОСТОЯННОГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ НА ПРОРАСТАНИЕ СЕМЯН, РОСТ КОРНЕЙ И СТЕБЛЯ *DATURA STRAMONIUM* L. НА РАННИХ ЭТАПАХ ОНТОГЕНЕЗА**

**Ю. Бено<sup>1</sup>, М. Дика<sup>1</sup>, К. Скварко<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Львовский национальный университет имени Ивана Франко  
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина  
e-mail: urko.bn @ gmail.com*

<sup>2</sup>*Ботанический сад Львовского национального университета  
имени Ивана Франко  
ул. М. Черемшины, 44, Львов 79014, Украина  
e-mail: k.skvarko @ gmail.com*

Используя двухфакторный дисперсионный анализ, провели оценку влияния постоянного магнитного поля длительностью действия 30 мин, 3 ч, 15 ч и 24 ч и различной интенсивностью поля (5, 30 и 60 Е) на прорастание семян, длину корня и стебля дурмана обыкновенного на ранних этапах онтогенеза. Установлено, что изменение динамики прорастания семян, длины корня и стебля обусловлены в большей степени интенсивностью действия постоянного магнитного поля, чувствительность к которому убывает во времени.

*Ключевые слова:* дурман обыкновенный, постоянное магнитное поле, дисперсионный анализ.

## ПРОЦЕСИ ЛІПОПЕРОКСИДАЦІЇ ЗАРОДКІВ В'ЮНА ЗА ВПЛИВУ МІКРОХВИЛЬНОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ

**М. Яремчук, М. Дика, Д. Санагурський**

*Львівський національний університет імені Івана Франка  
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна  
e-mail: m.yaremchuk@i.ua*

Досліджено вплив електромагнітного випромінювання радіочастотного діапазону (900 МГц) на інтенсивність процесів ліпопероксидації, зокрема, утворення ТБК-позитивних продуктів пероксидного окиснення ліпідів зародків в'юна (*Misgurnus fossilis* L.). Встановлено, що використане випромінювання зумовлює достовірні зміни вмісту малонового діальдегіду залежно від часу опромінення та стадій розвитку зародків. За дії мікрохвильового випромінювання низької інтенсивності, на частотах мобільного зв'язку тривалістю 1, 5, 10 і 20 хв, спостерігається значна інтенсифікація процесів пероксидного окиснення ліпідів на ранніх етапах розвитку зародків.

*Ключові слова:* мікрохвильове випромінювання, зародки в'юна, пероксидне окиснення ліпідів, ТБК-позитивні продукти.

Актуальним на сьогодні є вивчення впливу електромагнітного випромінювання радіочастотного (ЕМВ РЧ) діапазону на живі організми [4, 9, 22, 25, 32, 35]. Дослідження молекулярних механізмів дії мікрохвильового випромінювання (900 МГц) на клітину та розвиток організму в цілому є важливим завданням для розуміння аспектів дії електромагнітного випромінювання (ЕМВ) на живі системи.

Мікрохвильове випромінювання низької інтенсивності на частотах мобільного зв'язку спричиняє генетичні дефекти [16], викликає хромосомну нестабільність, що призводить до підвищення ризику захворювання на рак [32].

При вивченні впливу ЕМВ на живі системи виділяють [13] два ефекти: тепловий та інформаційний (нетепловий). Вплив мікрохвильового випромінювання на біологічні системи переважно здійснюється за рахунок збільшення температури (тепловий ефект) [25], а також – нетеплових ефектів [21, 23]. На сьогодні відомо, що навіть малі, так звані нетеплові інтенсивності мікрохвильового випромінювання можуть викликати метаболічні зміни у живих клітинах [14]. До досліджуваних показників впливу низькоінтенсивного ЕМВ належать: збільшення продукції активних форм кисню (АФК) [31], експресія білків теплового шоку [20], ушкодження ДНК [33], індукція апоптозу після опромінення [19]. Відомо, що електромагнітні поля (ЕМП) змінюють потенціал плазматичної мембрани [28]. Це може впливати на вільнорадикальні процеси у клітині та на систему антиоксидантного захисту організму.

Відомо, що плазматична мембрана може бути мішенню дії ЕМВ РЧ діапазону, а інші зміни біологічних показників виступають вторинними щодо впливу на плазматичну мембрану [18, 21, 26, 34]. У 1992 р. дослідники встановили, що ЕМП збільшує кількість вільних радикалів у клітинах [22]. Показано, що у відповідь на мікрохвильове випромінювання розвивається окисний стрес [17, 27], збільшується кількість АФК та знижується активність антиоксидантних ферментів [29, 30].

Встановлено, що ЕМП впливає на ембріональний розвиток тварин, а саме спостерігаються аномалії розвитку, порушення функцій центральної нервової системи, зсув темпів постнатального розвитку [5].

Механізм впливу ЕМВ РЧ діапазону не до кінця вивчений, хоча відомі дослідження про зміни пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) і утворення вільних радикалів [36] та про індукцію окиснювального стресу за дії ЕМВ. Саме тому вивчення процесів ліпопероксидації зародків в'юна за умов впливу мікрохвильового випромінювання низької інтенсивності (900 МГц) на сучасному етапі розвитку біології є актуальним.

#### Матеріали та методи

Дослідження проводили на зародках прісноводної риби в'юна *Misgurnus fossilis* L., через 60, 150, 210, 270 і 330 хв після запліднення яйцеклітин. Використовували зародки під час стадій, які відповідають першому дробленню зиготи (2 бластомери), четвертому (16 бластомерів), шостому (64 бластомери), восьмому (256 бластомерів) і десятому (1024 бластомери). Овуляцію стимулювали внутрішньом'язовим введенням самкам хоріонічного гонадотропіну (500 од). Ікру, отриману через 36 год після стимуляції овуляції, запліднювали у чашках Петрі суспензією сперміїв [8]. Сім'яники одержували з декапітованих самців шляхом розтину черевної порожнини. Через 5–10 хв після запліднення зиготи відмивали й інкубували у фізіологічному розчині Гольфрета при температурі 20–22°C [1].

Отримані зиготи піддавали опроміненню на частотах мобільного зв'язку. Як джерело мікрохвильового випромінювання використовували мобільний телефон, що перебував у режимі розмови. Частота випромінювання становила 900 МГц. Для оцінки рівня випромінювання використовувався питомий коефіцієнт поглинання (Specific Absorption Rate – SAR), який є показником шкідливого впливу ЕМВ мобільних телефонів. Згідно з паспортом телефону, значення SAR становить 1,1 Вт/кг.

Отримані зиготи опромінювали одноразово відразу після запліднення протягом 1, 5, 10 та 20 хв з відбором зародків на досліджуваних стадіях. Мобільний телефон у режимі розмови містився над чашками Петрі на відстані 3 см. Стадії розвитку зародків контролювали візуально бінокулярним мікроскопом МБС-9.

Зародки в'юна на різних стадіях розвитку гомогенізували за допомогою гомогенізатора Поттера–Ельвенгейма у розчині Гольфрета. По 1 мл гомогенату кожної проби заморожували у морозильній камері при –20°C, які в подальшому використовували для дослідження. Кількість білка у кожній пробі визначали за методом Лоурі [24].

Інтенсивність процесів ПОЛ аналізували за зміною кількості малонового діальдегіду (МДА), визначали за методом Тимирбулатова [12]. Принцип методу базується на активації ПОЛ іонами двовалентного заліза до рівня, який реєструється спектрофотометрично. При високій температурі у кислому середовищі МДА реагує з тіобарбітуровою кислотою, утворюючи забарвлений триметиновий комплекс з  $\lambda_{\max}=532$  нм [12]. Достовірність змін між середніми арифметичними значеннями встановлювали за t-критерієм Стьюдента [3].

#### Результати і їхнє обговорення

Вільнорадикальні процеси, зокрема ПОЛ, є одним із універсальних механізмів пошкодження біологічних мембран як у нормі, так і за умов будь-якої патології [6, 15]. Ці процеси виступають фактором, що змінює структурну модифікацію і функції ліпідів, їхні властивості та транспорт речовин [2].

Інтенсивність процесів ПОЛ зародків в'юна є невисокою. Відомо, що через 1,5 год після запліднення яйцеклітин в'юна зростають вільнорадикальні процеси. Імовірно, це пов'язано з інтенсивним поділом бластомерів і мембраногенезом [1, 7]. За нормальних умов інтенсивність процесів вільнорадикального окиснення зародків *Misgurnus fossilis* L. досягає мінімального значення на стадії 8 поділу бластомерів. На стадії 10 поділу (1024 бластомери) інтенсивність процесів ПОЛ зростає [1, 7, 11].



Відомо, що електромагнітне випромінювання на частотах мобільного зв'язку сприяє утворенню вільних радикалів у тканинах печінки, нирок, мозку, рогівки ока [17, 29, 35, 36]. Унаслідок цього спостерігалось збільшення рівня МДА за умов впливу ЕМВ РЧ діапазону у тканинах шурів [17, 29, 35, 36].

Показано, що вміст ТБК-позитивних продуктів зародків в'юна одразу після запліднення (*in vivo*) за умов впливу ЕМВ РЧ діапазону протягом 1 та 20 хв, зростає зі збільшенням тривалості експозиції на стадіях розвитку 2, 16, 64 і 256 бластомерів (рис. 1, 2). Проте на стадії 10 поділу бластомерів зародків в'юна вплив мікрохвильового випромінювання низької інтенсивності на частотах мобільного зв'язку протягом 1 і 20 хв спричиняє достовірне зниження вмісту МДА.

Збільшення експозиції ЕМВ РЧ зародків до 20 хв веде до інтенсифікації процесів ліпопероксидації на стадіях 2, 16, 64 та 256 бластомерів, порівняно з контролем. Однак на стадії 10 поділу (1024 бластомери) спостерігалось достовірне зниження вмісту МДА, що становив  $0,630 \pm 0,02$  мкмоль/мг білка, тоді як у контролі –  $0,880 \pm 0,02$  мкмоль/мг білка. Подібну динаміку змін інтенсивності процесів ПОЛ відмічено за умов впливу мікрохвильового випромінювання тривалістю 1 хв на усіх досліджуваних стадіях (рис. 1, 2).

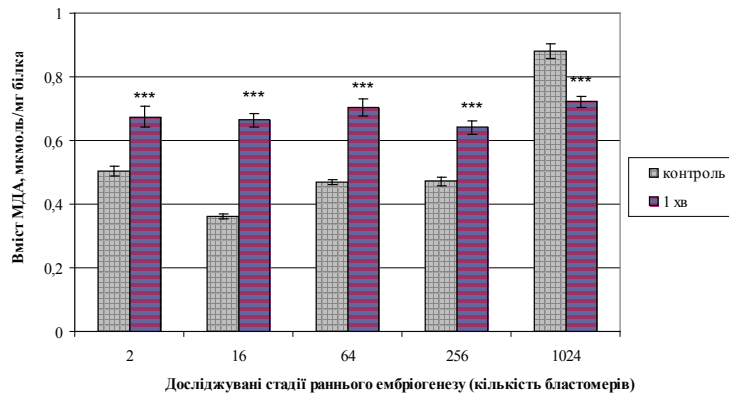


Рис. 1. Інтенсивність процесів ПОЛ (за вмістом МДА) у зародків в'юна за умов впливу мікрохвильового випромінювання тривалістю 1 хв упродовж раннього ембріогенезу. Тут і далі вірогідні зміни порівняно з контролем: \* –  $p > 0,95$ ; \*\* –  $p > 0,99$ ; \*\*\* –  $p > 0,999$ .

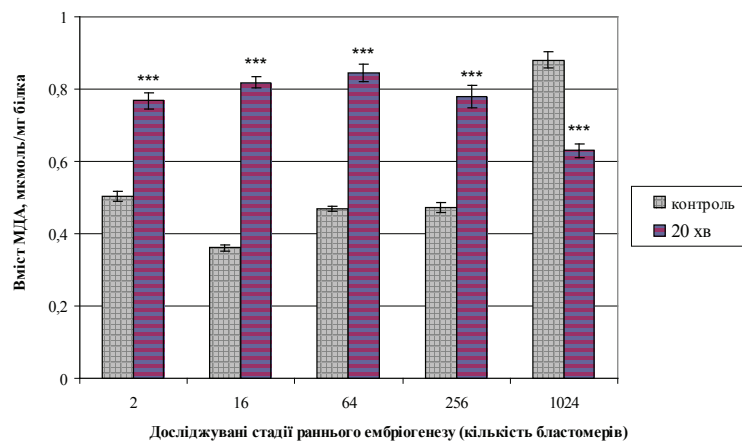


Рис. 2. Інтенсивність процесів ПОЛ (за вмістом МДА) у зародків в'юна за умов впливу мікрохвильового випромінювання тривалістю 20 хв упродовж раннього ембріогенезу.

Інтенсивність процесів ліпопероксидації у зародків в'юна на усіх досліджуваних стадіях розвитку, за дії мікрохвильового випромінювання тривалістю 10 хв, достовірно зростає порівняно з контролем (рис. 3). Максимального рівня кількість МДА досягає на стадіях восьмого та десятого поділів бластомерів, за дії ЕМВ РЧ діапазону тривалістю 10 хв і становить, відповідно,  $1,52 \pm 0,04$  та  $1,51 \pm 0,03$  мкмоль/мг білка.

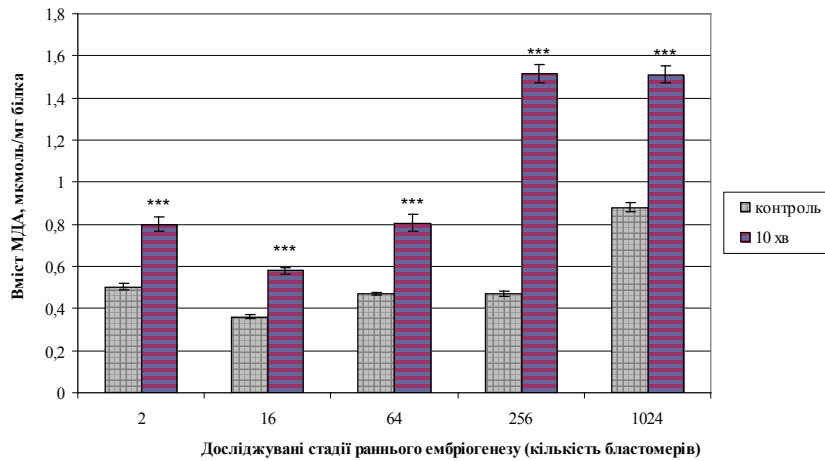


Рис. 3. Інтенсивність процесів ПОЛ (за вмістом МДА) у зародків в'юна за умов впливу мікрохвильового випромінювання тривалістю 10 хв упродовж раннього ембріогенезу.

За дії мікрохвильового випромінювання тривалістю 5 хв на стадії 2 бластомерів вміст МДА достовірно знизився порівняно з контролем і становив  $0,426 \pm 0,01$  мкмоль/мг білка (рис. 4). Вплив ЕМВ РЧ діапазону веде до недостовірної активації процесів ліпопероксидації у зародків в'юна на стадії розвитку 16 бластомерів порівняно з відповідним показником у контролі. На стадіях 64, 256 та 1024 бластомерів зародків в'юна 5 хв дії ЕМВ призводить до достовірного зростання кількості ТБК-позитивних продуктів. Максимальний рівень ПОЛ (2-кратне збільшення вмісту МДА, порівняно з контролем) відзначено на стадії 64 бластомерів.

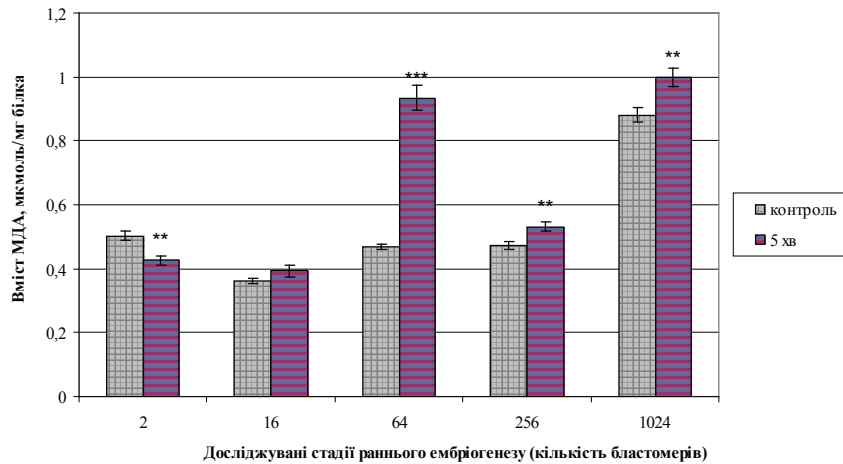


Рис. 4. Інтенсивність процесів ПОЛ (за вмістом МДА) у зародків в'юна за умов впливу мікрохвильового випромінювання тривалістю 5 хв упродовж раннього ембріогенезу.

Ці дані не суперечать результатам, отриманим у дослідженні на тканинах шурів і морських свинок, за умов впливу ЕМВ РЧ, на процеси ліпопероксидації (достовірні зміни вмісту МДА після впливу ЕМВ на частотах мобільного зв'язку) [17, 27, 35].

Аналіз отриманих результатів дає змогу зробити висновок про те, що на ранніх стадіях розвитку зародків в'юна активуються процеси ПОЛ за дії ЕМВ РЧ діапазону тривалістю 1, 10 і 20 хв. Відомо, що через 1,5 год починається інтенсивний поділ бластомерів зародків, тому зростання вільнорадикального ПОЛ може бути пов'язане з ефективним мембраногенезом [7]. Це свідчить про підвищення функціональної активності клітин зародка з кожним наступним етапом розвитку. До шести годин розвитку (10-й поділ, 1024 бластомери) повністю формується гастрולה, і в бластодермі встановлюється іонний гомеостаз, близький до гомеостазу диференційованих клітин. Нами показано, що на стадії 10-го поділу бластомерів відбувається зростання вмісту ТБК-позитивних продуктів, за дії мікрохвильового випромінювання тривалістю 5 і 10 хв, що свідчить про значну інтенсифікацію процесів ліпопероксидації. Однак експозиція ЕМВ упродовж 1 і 20 хв веде до достовірного зниження кількості МДА, порівняно з контролем. На стадії 10 поділу бластомерів (6-та година розвитку) зародків в'юна падає мітотичний індекс і зростає морфогенетична активність ядер. На цій стадії розвитку відбувається десинхронізація поділу зародкових клітин, що може призвести до автономізації метаболічних процесів у диференційованих клітинах [10]. Це і може впливати на інтенсивність процесів ПОЛ.

Отже, нами встановлено, що вплив мікрохвильового випромінювання низької інтенсивності на частотах мобільного зв'язку (900 МГц) різної тривалості призводить до порушення процесів ліпопероксидації, про що свідчить зміна вмісту ТБК-позитивних продуктів на ранніх етапах розвитку зародків в'юна.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Гойда Е. А. Биофизические аспекты раннего онтогенеза животных. К.: Наук. думка, 1993. 224 с.
2. Голубій Є. М., Коцюмбас І. Я., Коцюмбас Г. І. Окисна модифікація білків як критерій глибини оксидативного стресу // Наук.-техн. бюл. 2006. Вип. 7. № 8. С. 308–323.
3. Гумецький Р. Я., Паляниця Б. М., Чабан М. Е. Математичні методи в біології: теоретичні відомості, програмований практикум, комп'ютерні тести. Львів: Вид. центр ЛНУ ім. І. Франка, 2004. 111 с.
4. Зотов С. В. Поведінкові реакції тварин при дії ЕМП, які створюються засобами стільникового мобільного зв'язку стандарту GSM-900 // Матеріали XIV з'їзду гігієністів України. Дніпр.: АРТ-Пресс, 2004. Т. I. С. 260–264.
5. Кувшинов Г. І. Метод зменшення екологічного забруднення радіоефіру при побудові інформаційно-вимірjuвальних систем // Наук. праці ДонНТУ. Сер. обчисл. техніка та автоматизація. 2004. С. 46–54.
6. Кукоба Т. В., Шиш А. М., Мойбенко О. О. Вплив  $\omega$ -3 поліненасичених жирних кислот на перекисне окиснення ліпідів // Фізіол. журнал. 2005. Т. 51. № 1. С. 26–31.
7. Мукалов И. О., Гойда Е. А., Кусень С. И. Перекисное окисление липидов на ранних этапах развития вьюна // Укр. биохим. журнал. 1980. Т. 52. № 4. С. 473–477.
8. Нейфах А. А., Тимофеева М. Я. Проблемы регуляции в молекулярной биологии развития. М.: Наука, 1978. 336 с.
9. Побаченко С. В., Пономарев А. В. Влияние активации мобильных телефонов стандарта GSM на биоритмическую структуру электрогенеза головного мозга человека // Биомедицинская радиоэлектроника. 2009. № 3. С. 50–55.

10. *Санагурський Д. І.* Об'єкти біофізики: монографія. Львів: Вид. центр ЛНУ ім. І. Франка, 2008. 522 с.
11. *Тарновська А. В., Дика М. В., Санагурський Д. І.* Перекисне окиснення ліпідів та антиоксидантний статус у зародків в'юна за умов впливу фторхінолонів // Наук. вісн. Львів. акад. вет. медицини ім. С.З. Гжицького. 2004. Т. 6. № 1. С. 260–266.
12. *Тимирбулатов Р. А., Селезнев Е. И.* Метод повышения интенсивности свободнорадикального окисления липидосодержащих компонентов крови и его диагностическое значение // Лаб. дело. 1981. № 4. С. 209–211.
13. *Харламов А. В.* Возможный механизм резонансного воздействия электромагнитных волн на биологические объекты // Биомедицинские технологии и радиоэлектроника. 2007. № 5. С. 10–14.
14. *Якименко І. Л., Сидорик Є. П., Цибулін О. С., Чехун В. Ф.* Потенційні ризики мікрохвильового випромінювання мобільних телефонів для здоров'я молоді // Довкілля та здоров'я. 2011. № 1. С. 48–51.
15. *Agarwal A., Gupta S., Sharma R.* Role of oxidative stress in female reproduction // *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2005. Vol. 3. P. 28.
16. *Aitken R., Bennetts L., Sawyer D. et al.* Impact of radiofrequency electromagnetic radiation on DNA integrity in the male germline // *Int. J. Androl.* 2005. Vol. 28. P. 171–179.
17. *Balci M., Devrim E., Durak I.* Effects of mobile phones on oxidant/antioxidant balance in cornea and lens of rats // *Curr Eye Res.* 2007. Vol. 32. N 1. P. 21–25.
18. *Capri M., Scarcella E., Fumelli C., Bianchi E.* *In vitro* exposure of human lymphocytes to 900 MHz CW and GSM modulated radiofrequency: studies of proliferation, apoptosis and mitochondrial membrane potential // *Radiat Res.* 2004. Vol. 162. N 2. P. 211–218.
19. *Caraglia M., Marra M., Mancinelli F. et al.* Electromagnetic fields at mobile phone frequency induce apoptosis and inactivation of the multi-chaperone complex in human epidermoid cancer cells // *J. Cell. Physiol.* 2005. Vol. 204. N 2. P. 539–548.
20. *De Pomerai D., Daniells C., David H. et al.* Non-thermal heat-shock response to microwaves // *Nature.* 2000. Vol. 405 (6785). P. 417–418.
21. *Friedman J., Kraus S., Hauptman Y. et al.* Mechanism of short-term ERK activation by electromagnetic fields at mobile phone frequencies // *Biochem. J.* 2007. Vol. 405. N 3. P. 559–568.
22. *Grundler W., Kaiser F., Keilmann F., Walleczek J.* Mechanisms of electromagnetic interaction with cellular systems // *Naturwissenschaften.* 1992. Vol. 79. N 12. P. 551–559.
23. *Leszczynski D., Joenvaara S., Reivinen J., Kuokka R.* Non-thermal activation of the hsp27/p38MAPK stress pathway by mobile phone radiation in human endothelial cells: molecular mechanism for cancer- and blood-brain barrier-related effects // *Differentiation.* 2002. Vol. 70. N 2–3. P. 120–129.
24. *Lowry O. H., Rosenbrough N. G., Farr A. L., Randall R. C.* Protein measurement with the Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* 1951. Vol. 193. P. 265–275.
25. *Makker K., Varghese A., Desai N. R., Mouradi R.* Cell phones: modern man's nemesis? // *Reprod Biomed Online.* 2009. Vol. 18. N 1. P. 148–157.
26. *Markkanen A., Penttinen P., Naarala J., Pelkonen J.* Apoptosis induced by ultraviolet radiation is enhanced by amplitude modulated radiofrequency radiation in mutant yeast cells // *Bioelectromagnetics.* 2004. Vol. 25. N 2. P. 127–133.
27. *Meral I., Mert H., Mert N., Deger Y.* Effects of 900-MHz electromagnetic field emitted from cellular phone on brain oxidative stress and some vitamin levels of guinea pigs // *Brain Res.* 2007. Vol. 1169. P. 120–124.

28. *Naziroglu M., Karaoglu A., Aksoy A.* Selenium and high dose vitamin E administration protects cisplatin-induced oxidative damage to renal, liver and lens tissues in rats // *Toxicology*, 195. 2004. P. 221–230.
29. *Oktem F., Ozguner F., Mollaoglu H., Koyu A.* Oxidative damage in the kidney induced by 900-MHz-emitted mobile phone: protection by melatonin // *Arch. Med. Res.* 2005. Vol. 36. N 4. P. 350–355.
30. *Oral B., Guney M., Ozguner F., Karahan N.* Endometrial apoptosis induced by a 900-MHz mobile phone: preventive effects of vitamins E and C // *Adv. Ther.* 2006. Vol. 23. N 6. P. 957–973.
31. *Ozguner F., Altinbas A., Ozaydin M.* et al. Mobile phone-induced myocardial oxidative stress: protection by a novel antioxidant agent caffeic acid phenethyl ester // *Toxicol. Ind. Health.* 2005. Vol. 21. N 9. P. 223–230.
32. *Pacini S., Ruggiero M., Sardi I., Aterini S.* Exposure to global system for mobile communication (GSM) cellular phone radiofrequency alters gene expression, proliferation, and morphology of human skin fibroblasts // *Oncol. Res.* 2002. Vol. 13. P. 19–24.
33. *Phillips J. L., Singh N. P., Lai H.* Electromagnetic fields and DNA damage // *Pathophysiology.* 2009. Vol. 16. N 2–3. P. 79–88.
34. *Rao V. S., Titushkin I. A., Moros E. G.* Nonthermal effects of radiofrequency-field exposure on calcium dynamics in stem cell-derived neuronal cells: elucidation of calcium pathways // *Radiat. Res.* 2008. Vol. 169. N 3. P. 319–329.
35. *Sokolovic D., Djindjic B., Nikolic J.* Melatonin reduces oxidative stress induced by chronic exposure of microwave radiation from mobile phones in rat brain // *J. Radiat. Res. (Tokyo).* 2008. Vol. 49. N 6. P. 579–586.
36. *Watanabe Y., Nakagawa M., Miyakoshi Y.* Enhancement of lipid peroxidation in the liver of mice exposed to magnetic fields // *Ind. Health.* 1997. Vol. 35. P. 285–290.

*Стаття: надійшла до редакції 01.06.13*

*доопрацьована 26.11.13*

*прийнята до друку 02.12.13*

## **LIPID PEROXIDATION PROCESSES IN LOACH EMBRYOS UNDER THE EFFECT OF MICROWAVE RADIATION**

**M. Yaremchuk, M. Dyka, D. Sanagursky**

*Ivan Franko National University of Lviv  
4, Hrushevskyyi St., Lviv 79005, Ukraine  
e-mail: m.yaremchuk@i.ua*

The article contains data on the effect of electromagnetic radiation of mobile phone (900 MHz) on the lipid peroxidation processes and in particular on malondialdehyde levels at early stages of embryogenesis in loach embryos. It was observed that radiofrequency electromagnetic waves cause statistically meaningful effect depending on the exposure time and the stage of loach embryos development. The effect of microwave radiation at 1, 5, 10 to 20 minutes duration causes intense processes of lipid peroxidation at early stages of embryos development.

*Keywords:* microwave radiation, loach embryos, lipid peroxidation, malondialdehyde.

**ВЛИЯНИЕ МИКРОВОЛНОВОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА ПРОЦЕССЫ  
ЛИПОПЕРОКСИДАЦИИ ЗАРОДЫШЕЙ ВЬЮНА**

**М. Яремчук, М. Дыка, Д. Санагурский**

*Львовский национальный университет имени Ивана Франко  
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина  
e-mail: m.yaremchuk@i.ua*

Исследовано влияние электромагнитного излучения радиочастотного диапазона (900 МГц) на интенсивность процессов липопероксидации, в частности, образование ТБК-положительных продуктов перекисного окисления липидов зародышей вьюна (*Misgurnus fossilis* L.). Установлено, что излучение вызывает достоверные изменения процессов свободнорадикального окисления (содержания малонового диальдегида) в зависимости от времени облучения и стадий развития зародышей. Обнаружен статистически значимый эффект микроволнового излучения низкой интенсивности продолжительностью 1, 5, 10 и 20 мин на интенсификацию процессов перекисного окисления липидов у зародышей вьюна.

*Ключевые слова:* микроволновое излучение, зародыши вьюна, перекисное окисление липидов, ТБК-положительные продукты.



УДК 636.4:087.7:612.015.3

**ВІЛЬНОРАДИКАЛЬНІ ПРОЦЕСИ Й АНТИОКСИДАНТНА СИСТЕМА  
ОРГАНІЗМУ СВИНЕЙ ЗА ДІЇ ГУМІНОВОЇ ДОБАВКИ**

**О. Бучко<sup>1\*</sup>, Л. Степченко<sup>2</sup>**

*<sup>1</sup>Інститут біології тварин НААН*

*вул. В. Стуса, 38, Львів 34, Україна*

*<sup>2</sup>Дніпропетровський державний аграрний університет*

*вул. Ворошилова, 25, Дніпропетровськ 49600, Україна*

*e-mail: buchko\_oksana@ukr.net*

У статті розкривається питання щодо підвищення адаптаційної здатності організму високопродуктивних тварин під час поросності та лактації. При додаванні гумінової добавки до раціону свиноматок протягом двох тижнів до і одного тижня після опоросу (23 доби) у крові тварин знижується концентрація ТБК-активних продуктів і карбонільних груп протеїнів, зростає активність супероксиддисмутази, каталази, глутатіонпероксидази, глутатіонредуктази та рівень відновленого глутатіону порівняно з контрольною групою тварин. Отримані дані свідчать про позитивний вплив кормової добавки на систему антиоксидантного захисту і нормалізацію вільнорадикальних процесів у крові свиноматок, а також кращу адаптаційну здатність їх організму. Тому біологічно активну кормову добавку «Гумілід» можна застосовувати як адаптаген і стрес-коректор у найкритичніші періоди розвитку, враховуючи пролонгованість її дії на організм тварин.

*Ключові слова:* антиоксидантна система, «Гумілід», адаптація, віднорадикальні процеси, свині, гумінові речовини.

Дослідження українських і закордонних науковців останніх років у галузі фізіології, біохімії та фармакології свідчать про те, що одним із важливих методів оздоровлення людини і тварин є використання в раціонах харчових і кормових добавок антиоксидантної дії на основі природних складників. Особливо актуальні розробки та використання в медичній і ветеринарній практиці антиоксидантних препаратів, здатних ефективно протидіяти негативним змінам в організмі, що виникають при стресах. Значний інтерес у даному випадку викликають препарати, отримані на основі природних складників – торфу і рослинних відходів, багаті на біологічно активні речовини, які містять сполуки антиоксидантної й антистресової дії [3, 7, 12].

Гумінові речовини – це сукупність біотермодинамічностійких сполук, які утворюються у процесі розкладу та трансформації рослинних і тваринних залишків під дією мікроорганізмів або кисню повітря. До функціональних властивостей гумінових речовин належать нестехіометричність складу, нерегулярність будови, гетерогенність структурних елементів, полідисперсність, висока молекулярна маса (від  $5 \cdot 10^2$  до  $10^6$  Да). Ці речовини містять великий набір функціональних груп, як позитивно (азогрупи, аміни, іміни, пептидні), так і негативно заряджених (спиртові, фенольні, альдегідні, кетонні, карбоксильні, метоксильні й ін.), що визначає широкий спектр хімічної активності гумінових речовин за рахунок їхньої здатності до абсорбційної, іон-іонної та донорно-акцепторної взаємодії. Не будучи індивідуальною сполукою, ці речовини здатні іммобілізувати сполуки як неорганічної, так

і органічної природи, проявляючи властивості хелатних лігандів і вступаючи у процеси комплексоутворення. Будучи біологічно активними сполуками, гумінові речовини, при специфічній у кожному конкретному випадку обробці, можуть бути джерелом нових різноманітних біологічно активних речовин, що використовується науковцями для виготовлення на їхній основі препаратів різноманітного спектра дії [4, 11]. Однією з найунікальніших, на думку науковців, властивостей гумінових речовин є їх відносна індіферентність до процесів, що відбуваються в нормі, й ефективна корегуюча дія при будь-яких відхиленнях в організмі. Вони забезпечують сталість гомеостазу біосистеми на тканинному, клітинному та субклітинному рівнях, сприяючи відновленню фізіологічних функцій при патологічних станах і в екстремальних ситуаціях [3, 8, 12].

Виходячи з усього сказаного, метою наших досліджень було вивчити вплив біологічно активної кормової добавки (БАКД) «Гумілід» на показники оксидативного стресу та системи антиоксидантного захисту (АОЗ) в організмі свиноматок під час поросності й лактації.

#### **Матеріали та методи**

Досліди проводили у приватному ФГ «Спадщина» смт Батятичі Кам'яно-Бузького р-ну Львівської області на свиноматках великої білої породи. За принципом аналогів було сформовано дві групи тварин – контрольна і дослідна, по 3 порослих свиноматки у кожній. Годівлю тварин проводили стандартним раціоном, збалансованим за основними показниками живлення, з вільним доступом до кормів і води. Весь період досліджень становив 49 діб. Свиноматок контрольної (К) групи утримували на стандартному раціоні, а тваринам дослідної групи (Д) за 14 діб до і 9 діб після опоросу до раціону додавали 1% розчин БАКД «Гумілід» (ТУ У 15.7-00493675-004:2009) із розрахунку 0,5 мл/кг маси тіла (період згодовування добавки – 23 доби).

Матеріалом для дослідження слугувала кров свиноматок, яку відбирали з очної вени за 14 діб до та на 10 і 25 доби після опоросу. Стан антиоксидантної системи в загальних гемолізатах еритроцитів крові тварин визначали загальноприйнятими методами за активністю супероксиддисмутази (СОД), каталази (КАТ), глутатіонпероксидази (ГП), глутатіонредуктази (ГР) та за рівнем відновленого глутатіону (ВГ) [2]. Вміст показників оксидативного стресу в плазмі крові свиноматок визначали загальноприйнятими методами за концентрацією ТБК-активних продуктів, карбонільних груп протеїнів (КГП) і гідропероксидів ліпідів (ГПЛ) [2]. Одержані цифрові дані обробляли статистично за допомогою програми Microsoft EXCEL із використанням t-критерію Стьюдента.

#### **Результати і їхнє обговорення**

Відомо, що високопродуктивні тварини і, особливо, свині дуже вразливі до умов утримання, годівлі, негативних факторів зовнішнього і внутрішнього середовища, мають підвищену чутливість до стресів, характеризуються зниженою адаптаційною здатністю, схильністю до порушення обміну речовин. Максимальне депонування енергії в одних органах чи тканинах (м'язи, матка) призводить до зниження субстратного забезпечення серцево-судинної системи, напруження механізмів теплопродукції, зниження ефективності клітинного імунітету, переважання процесів катаболізму над анаболізмом і, в кінцевому результаті, до виникнення стресової ситуації [1, 6].

Дані літератури свідчать про те, що другий період поросності (з 85 до 114 доби) у свиноматок характеризується підвищеним обміном речовин і збільшенням потреби в енергії у декілька разів [5]. Ці зміни пояснюють тим, що значно більше енергії та поживних речовин свиноматка витрачає на формування плоду. Для цього періоду характерні великі

витрати, пов'язані з використанням субстратних і енергетичних речовин, а дефіцит у раціоні необхідної кількості енергії призводить до метаболічних порушень в організмі свиноматки й активізації руйнівної дії вільнорадикальних процесів у клітинах. Як наслідок виникає оксидативний стрес, який у кінцевому результаті може викликати зниження плодючості та збільшення кількості нежиттєздатного приплоду [9].

Під час досліджень було встановлено, що поросність свиноматок супроводжується високою інтенсивністю оксидативних процесів у їхній крові. Так, за 14 діб до опоросу в плазмі крові контрольної та дослідної груп тварин встановлена висока концентрація як ТБК-активних продуктів – метаболітів ПОЛ, так і продуктів вільнорадикального пошкодження протеїнових молекул – КГП. Вміст ТБК-активних продуктів вірогідно знижувався у плазмі крові свиноматок обох груп стосовно вихідного рівня на 25 добу після опоросу в 1,4 разу, а КГП – в 1,5 разу (контрольна група) та 2 рази (дослідна група) відповідно. Однак про повну нормалізацію процесів пероксидації в організмі свиноматок на 25 добу після опоросу не можна говорити, оскільки було встановлено вірогідне підвищення концентрації ГПЛ щодо їх рівня до опоросу в 1,5 разу (контрольна група) та 1,6 разу (дослідна група) (табл. 1).

Щоб запобігти виснаженню свиноматок від опоросу до опоросу, безпліддю, зниженню маси тіла та забезпечити покращення їх запліднення, а також підвищення маси порослят при народженні та їх резистентність, молочність маток, пом'якшення дії стресових чинників на організм поросних і лактуючих свиноматок, у їхній годівлі застосовують БАР [5, 6, 9]. За цих умов зростає біологічне значення гумінових сполук як речовин профілактичної, адаптогенної, імуностимулюючої й антиоксидантної дії [4, 8, 11, 12].

У результаті досліджень було встановлено, що додавання Гуміліду до корму тварин викликало вірогідне зниження вмісту показників оксидативного стресу. У плазмі крові свиноматок дослідної групи на 10 та 25 доби після опоросу концентрація ТБК-активних продуктів знижувалась порівняно з контрольною на 11 і 16%, а КГП – на 60 і 27% відповідно у ці ж досліджувані періоди (табл. 1).

Таблиця 1

Вміст показників оксидативного стресу в плазмі крові свиноматок ( $M \pm m$ ,  $n=3$ )

Показники	Група тварин	Доби		
		14 до опоросу	10 після опоросу	25 після опоросу
ГПЛ, ОЕ/мл	К	0,44±0,02	0,49±0,09	0,64±0,08 <sup>■</sup>
	Д	0,40±0,05	0,41±0,06	0,65±0,05 <sup>■</sup>
КГП, нмоль/мг протеїну	К	41,78±2,14	40,02±3,43	27,31±2,98 <sup>■</sup>
	Д	41,22±1,98	16,11±2,04 <sup>■*</sup>	19,85±0,87 <sup>■*</sup>
ТБК-активні продукти, нМоль/мл	К	4,81±0,19	3,59±0,12 <sup>■</sup>	3,53±0,12 <sup>■</sup>
	Д	4,27±0,05	3,20±0,13 <sup>■*</sup>	2,95±0,13 <sup>■*</sup>

**Примітки.** У табл. 1 і 2 статистично вірогідні різниці порівняно з контрольною групою тварин \*  $P \leq 0,05$ ; статистично вірогідні різниці в межах кожної групи порівняно з початком досліджень <sup>■</sup>  $P \leq 0,05$ .

Отже, наші дослідження підтвердили дані інших авторів про те, що макромолекули гумінових кислот, маючи у своєму складі фенольні групи, здатні безпосередньо діяти як антиоксиданти, а саме бути донорами електронів для вільних радикалів і перетворювати останні на молекулярні речовини, обриваючи ланцюг вільнорадикальних реакцій та знижуючи в організмі тварин кількість продуктів ПОЛ і окисної модифікації протеїнів [3, 4, 7].

Система АОЗ контролює і підтримує стаціонарний рівень вільнорадикальних процесів в організмі та встановлює оксидантно-антиоксидантну рівновагу. Ланка антиоксидантних реакцій у механізмі захисних процесів є провідною і найбільш потужною, оскільки вони запобігають не тільки розвиткові вільнорадикальних реакцій, накопиченню

супероксиданіонів і пероксидів, але і підтримують високу активність окисно-відновних процесів, забезпечують елімінацію кінцевих кисневих метаболітів із залученням їх до енергетичного обміну й активації процесів синтезу [1, 10]. Дані про особливості функціонування системи АОЗ залежно від віку та фізіологічного стану слід враховувати при забезпеченні збереження й захисту здоров'я тварин. Співвідношення показників стану антиоксидантної системи й інтенсивності процесів пероксидації є об'єктивним критерієм оцінки антиоксидантного статусу та рекомендується для своєчасного виявлення оксидативного стресу в організмі тварин [5, 6].

Система АОЗ на рівні цілого організму представлена ензимами СОД і КАТ як початкового ланцюга захисту від супероксиданіонрадикалів і пероксиду водню, а також кінцевою глутатіоновою ланкою – ГП і ГР як захисту і від того ж пероксиду водню, і від органічних гідропероксидів. ГР забезпечує регенерацію глутатіону з окисненої форми у відновлену, при цьому глутатіон, будучи акцептором активних форм кисню (АФК), здатний інгібувати вільнорадикальне окиснення [1, 10].

Наші дослідження підтвердили, що зниження у крові свиноматок на 10 добу після опоросу концентрації ТБК-активних продуктів і КГП відбувається за рахунок вірогідного підвищення активності СОД і КАТ у межах кожної групи. Так, активність першого ензиму зростала в еритроцитах тварин цього періоду на 11 (контрольна група) і 13% (дослідна група), а другого – на 9 (К) і 11% (дослідна група) відносно періоду до опоросу. Однак на 25 добу після опоросу спостерігалось зниження активності СОД до вихідного рівня (контрольна група) і активності КАТ – на 14 (контрольна група) і 16% (дослідна група) щодо періоду перед опоросом (табл. 2). Отримані дані можуть свідчити про перенапруження та часткове виснаження антиоксидантної системи організму свиноматок під час опоросу, результатом чого є оксидативний стрес.

Таблиця 2

Показники системи антиоксидантного захисту в еритроцитах свиноматок (M±m; n=3)

Показники	Група тварин	Доби		
		14 до опоросу	10 після опоросу	25 після опоросу
СОД, ум.од./мг	К	17,82±0,68	20,01±0,52 <sup>■</sup>	17,22±1,51
протеїну	Д	16,83±0,53	19,30±1,23 <sup>■</sup>	19,45±1,18 <sup>■</sup>
КАТ, ммоль/хв·мг	К	2,18±0,03	2,39±0,04 <sup>■</sup>	1,87±0,02 <sup>■</sup>
протеїну	Д	2,41±0,06*	2,66±0,06 <sup>■*</sup>	2,02±0,05 <sup>■*</sup>
ГП, нмоль/хв·мг	К	12,91±1,36	7,84±0,84 <sup>■</sup>	8,60±0,43 <sup>■</sup>
протеїну	Д	14,91±1,36	11,75±1,49*	16,76±0,23*
ГР, мкмоль/хв·мг	К	2,28±0,05	1,46±0,06 <sup>■</sup>	1,03±0,04 <sup>■</sup>
протеїну	Д	3,07±0,12	1,56±0,04 <sup>■</sup>	3,19±0,06 <sup>■*</sup>
ВГ, мкмоль/л	К	0,063±0,001	0,043±0,001 <sup>■</sup>	0,083±0,001 <sup>■</sup>
	Д	0,067±0,005	0,045±0,005 <sup>■</sup>	0,152±0,002 <sup>■*</sup>

Закономірним буде припустити, що, знижуючи в організмі вміст показників вільнорадикальних процесів, БАКД «Гумілід» має підвищувати антиоксидантну активність організму свиноматок. У наших дослідженнях ми не встановили вірогідних змін активності СОД між К і Д групами свиноматок, однак у тварин Д активність ензиму, яка зросла на 10 добу після опоросу щодо вихідного рівня, в подальшому не знижувалась. Гумінова добавка позитивно впливала на активність КАТ, вірогідно підвищуючи її щодо контролю у свиноматок на 10 (на 10%) та 25 (на 8%) доби після опоросу (табл. 2).

Ще одним підтвердженням виникнення оксидативного стресу в організмі свиноматок після опоросу є вірогідне зниження у їхній крові всіх досліджуваних показників

глутатіонової ланки САЗ (ГП, ГР та ВГ) на 10 добу після опоросу стосовно початку дослідю. Так, активність ключового ензиму цієї системи – ГП, як і активність ГР, знижувалася в еритроцитах тварин контрольної групи у цей період в 1,6 разу, а вміст ключового метаболіту глутатіонового редокс-циклу – ВГ спадав у 1,5 разу щодо періоду перед опоросом. На 25 добу після опоросу в еритроцитах контрольних свиноматок встановлено зростання вмісту ВГ в 1,3 разу порівняно з періодом перед опоросом, можливо, за рахунок компенсаторного підвищення його синтезу, але не за рахунок відновлення в ГР-азній реакції, активність якої знизилась у 2,2 разу порівняно з початком дослідю. Зростаючу концентрацію ГПЛ упродовж усього періоду досліджень в еритроцитах свиноматок контрольної групи можна пояснити низькою активністю ГП у їхній крові (табл. 2).

Встановлений нами спад ензиматичної активності системи АОЗ і зростання концентрації ГПЛ у крові свиноматок на 25 добу після опоросу може також бути наслідком переорієнтації обміну речовин у їхньому організмі, яка збігається з початком різкого зниження процесів молокоутворення, починаючи з 21 доби після опоросу [5, 9].

Стосовно свиноматок дослідної групи, то згодовування Гуміліду викликало інтенсифікацію глутатіонової ланки АОЗ у їхній крові. Ми встановили вірогідне підвищення щодо контролю активності ГП на 10 (в 1,5 разу) та 25 (в 1,9 разу) доби після опоросу, ГР – на 25 добу після опоросу – в 3,1 разу, а вміст ВГ зростав у крові дослідних тварин у цей же період – в 1,8 разу. Необхідно зауважити, що у групі дослідних свиноматок активність ензимів глутатіонової ланки, на відміну від контрольних тварин, на 25 добу після опоросу була вищою від вихідного показника (табл. 2).

Отже, дослідження на свиноматках показали, що в кінці поросності та під час лактації в їхньому організмі відбувається активація вільнорадикальних процесів і протягом перших 25 діб після опоросу система АОЗ не встигає повністю відновитися та подолати оксидативний стрес, який виникає. У тварин дослідної групи спостерігається нормалізація вільнорадикальних процесів і активування антиоксидантного захисту, можливо, за рахунок властивості гумінових речовин утворювати хелатні сполуки з металами, зокрема з мікроелементами, та вітамінами. Це дає можливість підвищувати засвоєння тваринами згаданих речовин і є більш ефективним, ніж згодовування кожного компонента корму окремо. Їх використання, з одного боку, може компенсувати дефіцит поживних речовин, а з іншого – стимулювати обмінні процеси в організмі тварин, у тому числі й систему АОЗ організму [3, 7, 11, 12].

У результаті проведених досліджень можна зробити висновок, що активність системи АОЗ тварин дослідної групи була вищою, ніж у тварин, яких утримували на стандартному раціоні. Ці дані можуть бути підтвердженням того, що БАКД «Гумілід» можна розглядати як адаптоген, який, знижуючи рівень вільнорадикальних процесів у крові тварин, зменшує вплив стресових чинників у найбільш критичні періоди життя, а саме поросності й лактації у свиноматок. Слід зауважити, що описані позитивні зміни в організмі свиноматок дослідної групи (зниження концентрації КГП і ТБК-активних продуктів на тлі зростання активності СОД, ГП, ГР і вмісту ВГ), підтримувалися на вищому рівні до 25 доби після опоросу щодо контрольних тварин, а це може бути свідченням пролонгованості її дії на організм (припинення згодовування гумінової кормової добавки – 10 доба після опоросу).

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Барабой В. А.* Стресс: природа, биологическая роль, механизмы, исходы. К.: Фитосоцицентр, 2006. 424 с.

2. Влізко В. В., Федорук Р. С., Ратич І. Б. та ін. Лабораторні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині: довідник. Львів: СПОЛІОМ, 2012. С. 355–369.
3. Степченко Л. М. Регуляторні механізми дії біологічно активних речовин гумінової природи на організм продуктивної птиці // Фізіологічний журнал. 2010. Т. 56. № 2. С. 306.
4. Томсон А. Э., Наумова Г. В., Шурхай С. Ф. и др. Антиоксидантная активность препаратов из торфа и растительного сырья // Природопользование. 2011. № 19. С. 165–169.
5. Чумаченко В. В. Біохімічні та імунологічні основи системи профілактики стресу в свиней: автор. дис. ... д-ра вет. наук. К., 2007. 24 с.
6. Ярован Н. И. Биохимические аспекты оценки, диагностики и профилактики технологического стресса у сельскохозяйственных животных: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М., 2008. 41 с.
7. Kocabağlı N., Alp M., Acar N., Kahraman R. The effects of dietary humate supplementation on broiler growth and carcass yield // Poult. Sci. 2002. N 81. P. 27–230.
8. Nurmi J. T., Tratnyek P. G. Design of Quinonoid-Enriched Humic Materials with Enhanced Redox Properties // Environ. Sci. Technol. 2002. Vol. 36. P. 617–622.
9. Pejsak Z. Choroby świń. Poznań: Pol. Wyd. Rol., 2002. 353 p.
10. Sahin E., Gumuslu S. Immobilization stress in rat tissues: Alterations in protein oxidation, lipid peroxidation and antioxidant defense system // Comp. Biochem. Physiol. Part C: Toxicol. Pharmacol. 2007. Vol. 144. N 4. P. 342–347.
11. Steinberg C. E. W. Ecology of humic substances in freshwaters // Springer. 2003. P. 332.
12. Ziechmann W. Humic substances and their medical effectiveness // Study of Huminat on the Human RH Line Cells: 12<sup>th</sup> International Peat Congress. Finland, 2004. T. 2. P. 1205–1208.

Стаття: надійшла до редакції 30.04.13

доопрацьована 11.10.13

прийнята до друку 01.11.13

## FREE RADICAL PROCESSES AND ANTIOXIDANT SYSTEM IN THE PIGS ORGANISM UNDER THE HUMIC SUPPLEMENTS

O. Buchko<sup>1</sup>, L. Stepchenko<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Animal Biology, NAAS of Ukraine  
38, V. Stus St., Lviv 79034, Ukraine*

<sup>2</sup>*Dnipropetrovsk State Agrarian University  
25, Voroshylov St., Dnipropetrovsk 49600, Ukraine  
e-mail: buchko\_oksana@ukr.net*

The paper deals with data about increasing of high performance animal's adaptive capacity under the intensive technologies of growth during farrowing and lactation. Application of dietary food additive "Humilid" to the diet of sows during the two weeks before and the week after farrowing (23 days) accompanied by reducing of TBA-active products concentration and protein carbonyl groups, increasing of superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase activity and content of reduced glutathione in the blood of animals compared to control group. These data suggest about the positive effect of this feed supplement on antioxidant defense system and normalization of free radical processes in the blood of animals, and a better adaptive ability of their organism. Therefore,



biologically active additive “Humilid” can be used as a stress corrector in the most critical periods of development, including prolongation of their action on the animal organism.

*Keywords:* antioxidant system, “Humilid”, adaptation, weaning free radical processes, pigs, humic addition.

## СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ И АНТИОКСИДАНТНАЯ СИСТЕМА ОРГАНИЗМА СВИНЕЙ ПОД ВЛИЯНИЕМ ГУМИНОВОЙ ДОБАВКИ

О. Бучко<sup>1</sup>, Л. Степченко<sup>2</sup>

*<sup>1</sup>Институт биологии животных НААН Украины  
ул. В. Стуса, 38, Львов 34, Украина*

*<sup>2</sup>Днепропетровский государственный аграрный университет  
ул. Ворошилова, 25, Днепропетровск 49600, Украина  
e-mail: buchko\_oksana@ukr.net*

В статье раскрывается вопрос повышения адаптационной возможности организма высокопродуктивных животных во время супоросности и лактации. При добавлении гуминовой добавки к рациону свиноматок на протяжении двух недель до и одной недели после опороса (23 сутки) в крови животных снижается концентрация ТБК-активных продуктов и карбонильных групп протеинов, возрастает активность супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы и уровень восстановленного глутатиона относительно контрольной группы животных. Полученные данные свидетельствуют о позитивном влиянии кормовой добавки на систему антиоксидантной защиты и нормализацию свободнорадикальных процессов в крови животных, а также о лучшей адаптационной возможности их организма. Поэтому биологически активную кормовую добавку «Гумилд» можно использовать в качестве адаптагена и стресс-корректора в самые критические периоды развития, учитывая пролонгированность ее действия на организм животных.

*Ключевые слова:* антиоксидантная система, «Гумилд», адаптация, свободнорадикальные процессы, свиньи, гуминовые вещества.

**CYTOLOGICAL EFFECTS IN BONE MARROW CELLS IN EXPERIMENTAL ANIMALS UNDER CHRONIC LOW-INTENSITY  $\gamma$ -IRRADIATION**

**D. Shibkova<sup>1\*</sup>, N. Efimova<sup>1</sup>, N. Sybirna<sup>2</sup>, A. Akleev<sup>3,4</sup>**

<sup>1</sup>*Chelyabinsk State Pedagogical University  
69, Lenin Ave., Chelyabinsk 454080, Russia*

<sup>2</sup>*Ivan Franko National University of Lviv  
4, Hrushevskiyi St., Lviv 79005, Ukraine*

<sup>3</sup>*Urals Research Center For Radiation Medicine  
68-A, Voronovskiyi St., Chelyabinsk 454076, Russia*

<sup>4</sup>*Chelyabinsk State University  
129, Bratiev Kashyrinykh St., Chelyabinsk 454001, Russia  
e-mail:sybirna\_natalia@yahoo.com  
e-mail:shibkova2006@mail.ru\**

Owing to irradiation in cells occur damage in the genome, resulting into the cell death, or, in the case of intracellular repair system activation and a development of adaptation - to survive. A result of exposure mainly depends on the state of prooxidant-antioxidant homeostasis. We found that chronic low-intensity  $\gamma$ -irradiation causes an increasing in the number of abnormal cell and expand the range of abnormalities in the granulocyte lineage of bone marrow. In erythroid lineage spectrum of abnormal cells decreased, but in this case increased frequency of abnormal cell shape.

*Keywords:* chronic low-intensity  $\gamma$ -rays, bone marrow, granulocyte lineage, erythroid lineage.

Under conditions of exposure of different species of animals to low doses of ionizing radiation, the stimulation effects have been detected, which lie in the phenomenon of compensatory intensification of physiological functions and serve as the indirect evidence of the induction of changes in the genetic apparatus [3]. Hence, such effects caused by low doses, expressed in the form of adaptive responses of cells, may be triggered by the activation of the inducible reparation systems. Based on such changes in the irradiated cells the probability of fixation of DNA damages in true mutation is altered. According to S.A. Heras'kyn [2], this approach does not require postulation of new cellular reactions for its justification and can uncontroversially explain all phenomena, which take place after the exposure to low doses of ionizing radiation.

It is suggested that among the heterogeneous pool of cells, that comprise an evolutionary reserve, there is a programmed subpopulation, the death of which is preceded by genetically determined cellular responses - auto-induction of chromosomal abnormalities or other structural genome realignments. This leads to the emergence of new genetic variants and makes possible the selection of variants, which will be the most adapted to the alterations in the environment or to the potentially expected new stimuli. The number of cells derived from this population, which are in the process of genetic adaptation and are exposed to low dose of ionizing radiation, will depend on the population size [10, 11].

Due to radiation-associated genomic damages, the cells can go through one of the following two ways: 1) cell death, including apoptosis, and 2) their survival, combined with a) the emergence of mutations in the cell progeny, b) the adaptation and return of the cells to their initial state, and c) with functional changes, caused by adaptation processes, which make the cells

differ from those that were prior to the radiation exposure. Selection of the possible consequences of the exposure to radiation essentially depends on the state of the key elements of the redox homeostasis [1].

The objective of this study was a cytological characterization and estimation of the spectrum of abnormalities in bone marrow cells in CBA line mice under chronic  $\gamma$ -radiation exposure at a dose-rate of 1 cGy/day.

### Materials and methods

The experiment was held on 80 mice (line CBA), whose weight was in the range of 24–26g and who aged 90 days prior to the beginning of the research. The laboratory experiment was conducted in the Urals Research Center for Radiation Medicine (Chelyabinsk).

The source of gamma-rays was a modified OCK-400 device with a charge of  $^{137}\text{Cs}$  [8]. Exposure of the experimental animals was carried during the day and at night, except for the time for cleaning of cages and examination of the animals (which did not exceed 1 hour). The total tissue-absorbed doses in the period of the study (30, 90, 180 and 270 days) of chronic external  $\gamma$ -radiation with a dose-rate of 1 cGy/day varied from 0.3 to 2.7 Gy.

*Cytological methods of bone marrow cells research.* Fixation and staining of bone marrow specimens were carried out by generally accepted Romanovsky-Giemsa method (1968). Differential ratio of cells, the mitotic index and the index of maturation in the myeloid and erythroid lineage were analyzed [5, 7]. The various pathological changes in the bone marrow cells, which are associated with mitosis (chromosome fragments, chromosome and cytoplasmic bridges, polynuclear and giant cells were taken into account.

*Statistical analysis of the research outcomes.* For comparison of the average values in the analysis of hematological data Student's t-test was applied. The authenticity of differences of cytogenetic indices in bone marrow cells were assessed by the chi-squared and Fisher criteria [4, 6].

### Results and discussion

Results of cytological indices research of bone marrow cells in intact CBA line mice (Table 1, Table 2) indicated that the mitotic index of normocytes was not changed with age, and the mitotic index of neutrophils decreased 5 times by the time the experimental animals reached 12 months. Chronic  $\gamma$ -radiation at a dose-rate of 1 cGy/day was accompanied by a three-time decrease in the mitotic activity of neutrophils on the 180th day of exposure to radiation, and the mitotic index of normocytes dropped twice: on the 30th and 270th day of the experiment by 2,6 and 6,6 times respectively.

Maturation index of normocytes in irradiated mice does not differ from the same age control values during all periods of the experiment, and the maturation of neutrophil index increased 1,5–2,5 times under the total absorbed doses 1,8–2,7 Gy.

Table 1

Cytological indices of bone marrow cells in CBA mice  
under chronic  $\gamma$ -radiation at a dose-rate of 1 cGy/day

Duration of exposure to radiation, days		Mitotic index of neutrofilis (%)	Mitotic index of normocytes (%)	Maturation index of neutrofilis	Maturation index of normocytes
30	Control	1,45±0,56	3,24±0,86	1,76±0,40	0,80±0,02
	1 cGy/day	0,62±0,61	1,22±0,93*	2,59±0,35	0,76±0,00
90	Control	0,81±0,42	2,60±0,93	2,78±0,60	0,82±0,03
	1 cGy/day	0,60±0,32	1,89±0,53	3,77±1,38	0,80±0,03
180	Control	1,25±0,34	2,19±0,51	3,63±0,40	0,78±0,02
	1 cGy/day	0,38±0,09*	2,01±1,09	5,74±0,08*	0,82±0,02
270	Control	0,29±0,21	2,78±0,43	2,85±0,29	0,77±0,01
	1 cGy/day	0,71±0,24	0,60±0,53*	7,24±1,77*	0,82±0,03

**Notes:** Data are means  $M\pm m$ ; \* – significantly different from control ( $P < 0.05$ ).

It can be assumed, when the index of neutrophils maturation is increased and the mitotic indices of neutrophils and normocytes (in the period during 180–270th day of exposure to radiation) are decreased on the background of control level of karyocytes of bone marrow [9], the compensatory reactions occurred in the neutrophil series. These reactions are directed on maintaining of the repopulation process of granulocyte lineage development in bone marrow of irradiated animals.

Irradiation with a dose-rate of 1 cGy/day had no effect on leuko/erythroid correlation in bone marrow (Table 2): during the experiment, the fraction of erythroid and granulocyte blast cells was almost unchanged in comparison to control values. Based on the state of leuko/erythroblastic correlation, the kinetics of hematopoietic cells of these lineages repopulation can be evaluated. The obtained results show the lack of competitive interconnection between the erythroid and granulocyte lineages under the total absorbed dose in the range of 0,3 to 2,7 Gy.

Table 2

Cytological indices of bone marrow cells in CBA mice  
under chronic g-radiation at a dose-rate of 1 cGy/day (continuation)

Duration of exposure to radiation, days		Leuko/erythroblastic correlation	Fraction of leukocytes in general amount of cells
30	Control	0,75±0,03	3,24±0,86
	1 cGy/day	0,71±0,04	1,22±0,93*
90	Control	0,73±0,04	2,60±0,93
	1 cGy/day	0,77±0,04	1,89±0,53
180	Control	0,76±0,02	2,19±0,51
	1 cGy/day	0,75±0,02	2,01±1,09
270	Control	0,73±0,01	2,78±0,43
	1 cGy/day	0,72±0,01	0,60±0,53*

**Notes:** Data are means  $M \pm m$ ; \* – significantly different from control ( $P < 0.05$ ).

Cytological analysis detected a statistically reliable increase in the fraction of blast cells in granulocytic series in the bone marrow by 80% on the 30th day of chronic  $\gamma$ -radiation under a total cumulative dose of 0,3 Gy (Table 3). Herewith, the fraction of abnormal neutrophils decreased 2,6 times, in comparison to the same age control. Increase in the number of abnormal cells in the catena of neutrophils by 1,5–2 times was observed starting from the 180th day of the experiment (the total absorbed dose made 1,8–2,7 Gy).

Table 3

The fraction of cells with abnormalities and number of blast cells in the bone marrow  
of CBA mice under chronic g-irradiation at the dose-rate of 1 cGy/day

Duration of exposure to radiation, days	Fraction of cell abnormalities in myeloid series (neutrophils), %	Fraction of cell abnormalities in erythroid series (normocytes), %	Number of blast cells of myeloid series, %	Number of blast cells of erythroid series, %
30	Control	0,88±0,15	1,43±0,17	0,78±0,06
	1 cGy/day	0,34±0,07*	2,61±0,21*	1,38±0,40
90	Control	0,55±0,11	1,81±0,54	0,60±0,17
	1 cGy/day	0,73±0,08	2,39±0,35	0,95±0,23
180	Control	0,41±0,14	3,28±0,55	1,22±0,19
	1 cGy/day	0,83±0,11*	2,46±0,44	1,01±0,17
270	Control	0,60±0,08	3,03±0,32	1,45±0,12
	1 cGy/day	0,93±0,13*	3,86±0,16	1,31±0,28

**Notes:** Data are means  $M \pm m$ ; \* – significantly different from control ( $P < 0.05$ ).

The spectrum of cytological abnormalities in granulocyte and erythroid lineages of the bone marrow in intact CBA mice is presented in Tables 3 and 5. Analysis of cytological abnormalities in *granulocyte lineage* of the bone marrow in control animals revealed no age devia-

tions. The data in Table 4 show that in the proliferative pool of granulocytic lineage the most frequently detected forms of affected cells are promyelocytes and myelocytes – namely binucleated and giant forms. For the aging pool are typical giant and hypersegmented cells. In the population of stab neutrophils no cells with dysplastic changes were detected.

Table 4

The fraction of cells with abnormalities in granulocyte lineage in the bone marrow of intact mice (line CBA) (absolute number of cells/10<sup>3</sup> karyocyte)

Pool of cells	Micronucleus	Concatenated metaphase	Binuclear cells	Giant cells	Hypersegmentation
Proliferative:	0,25±0,02	0,57±0,09	1,83±0,28	0,76±0,21	--
- myeloblasts	0,06±0,01	--	0,06±0,04	0,125±0,09	--
- promyelocytes	0,06±0,01	0,06±0,03	0,42±0,12	0,38±0,13	--
- myelocytes	0,13±0,02	0,51±0,05	1,35±0,11	0,25±0,04	--
Metamyelocytes	0,06±0,01	--	--	0,38±0,07	--
Stab neutrophils	--	--	--	--	--
Segmented neutrophils	0,06±0,01	--	0,06±0,02	--	0,19±0,03

Notes: Data are means M±m.

In irradiated CBA mice significant changes in the number of abnormal cells of granulocyte lineage in bone marrow were not detected. Similarly to the control group, abnormal cell forms were predominantly detected among promyelocytes and myelocytes, however the range of cell abnormalities increased: cells with the presence of cytoplasmic bridge, the telophase bridge, and karyorrhexis appeared (Table 5). Quantitative and qualitative analysis of abnormal cells of neutrophil group depending on the total absorbed dose allows to state the following. With the increasing of absorbed dose (1,8–2,7 Gy) the number of cells with chromosomal aberrations in the proliferating pool increase, herewith the spectrum of abnormal cells expands. In the maturing pool of irradiated mice cytological pathologies in the form of giant forms and hypersegmented neutrophils were identified primarily on the 180–270 days of radiation exposure.

Table 5

The fraction of cells with abnormalities in granulocyte lineage in the bone marrow of CBA mice under chronic  $\gamma$  - irradiation at a dose-rate 1 cGy/day (absolute number of cells/10<sup>3</sup> karyocyte)

Pool of cells	Micro-nucleus	Concatenated metaphase				Kario-reksys				Binucleated cells				Giant cells			Hypersegmented		
		3	3	9	6	1	3	6	9	1	3	6	9	3	6	9			
	Duration of exposure, month																		
Proliferative pool, among the:	0,70±0,13	0,70±0,19	0,52±0,09	0,87±0,26	2,07±0,39	3,49±0,61	3,93±0,82	2,08±0,23	0,69±0,17	1,05±0,17	0,87±0,11	5,21±0,83	--	--	--				
- myeloblasts	--	--	--	--	--	--	--	0,52±0,21	0,69±0,17	--	--	1,57±0,27	--	--	--				
- promyelocytes	0,70±0,13	0,35±0,12	0,52±0,09	0,44±0,11	0,69±0,13	2,79±0,33	0,87±0,09	0,52±0,02	--	0,35±0,08	0,87±0,11	1,57±0,21	--	--	--				
- myelocytes	--	0,35±0,10	--	0,44±0,15	1,38±0,21	0,70±0,24	3,05±0,64	1,04±0,11	--	0,70±0,04	--	2,07±0,22	--	--	--				
Metamyelocytes	--	--	--	--	--	--	--	0,52±0,21	--	0,69±0,05	--	0,52±0,05	--	--	--				
Stab neutrophils	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--				
Segmented neutrophils	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	1,39±0,32	2,62±0,41	0,52±0,04				

Notes: Data are means M±m.

Analysis of *erythroid lineage* cells of the bone marrow in the control group animals (Table 6) showed that the number of abnormal cells compared to the cells of myeloid lineage are 1,5 times lower in the aging pool and 5 times lower in the proliferative pool. Cellular abnormalities are mainly present as binuclear forms and by the presence of cells with the concatenated metaphase.

Table 6

The fraction of cells with abnormalities in erythroid lineage in the bone marrow of intact mice (line CBA) (absolute number of cells/10<sup>3</sup> karyocyte)

Pool of cells	Micronucleus	Concatenated metaphase	Cytoplasmic bridge	Karyorrhexis	Giant cells	Binuclear cells	Dissociation of the cytoplasm
Normoblast	–	0,06±0,01	–	–	–	–	–
Pronormocyte	–	–	–	–	–	0,06±0,02	–
Basophilic normocyte	–	0,19±0,03	0,06±0,03	–	–	0,19±0,04	–
Polychromatophilic normocyte	0,06±0,01	0,125±0,01	–	0,06±0,01	0,06±0,02	0,19±0,03	–
Oxyphilic normocyte	–	–	–	–	–	0,57±0,04	0,06±0,01

Notes: Data are means M±m.

In irradiated experimental animals the spectrum of cellular abnormalities in the erythroid lineage of the bone marrow decreased due to the absence of cells with cytoplasmic bridge, karyorrhexis and giant cells, if compared to the control. The number of pathological form of cells increased to the maximum when the accumulation of total absorbed doses reached 2–4 Gy (6–9 month of the exposure), herewith anomalies of erythroid cells were observed mainly on the final stages of maturation, i.e. among the polychromatic and oxyphilic normocytes (Table 7). These facts may testify that under the exposure to low-intensity radiation (to the accumulation of total absorbed doses of about 1 Gy) DNA repair systems are activated and effectively operate in poorly differentiated erythroid cells. Our data may indicate also acceleration in the process of maturation of these cells.

Table 7

The fraction of cells with abnormalities in erythroid lineage in the bone marrow of CBA mice under chronic  $\gamma$  - irradiation at a dose-rate of 1 cGy/day (absolute number of cells/10<sup>3</sup> karyocyte)

Pool of cells	Micronucleus		Concatenated metaphase	Dissociation of the cytoplasm			Binuclear cells			
	6	9		1	1	3	1	3	6	9
	Duration of exposure, month									
Normoblast	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Pronormocyte	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1,34±0,12
Basophilic normocyte	1,34±0,15	–	–	–	–	1,22±0,29	–	–	–	–
Polychromatophilic normocyte	–	–	1,22±0,07	–	–	–	1,15±0,31	4,00±0,42	1,34±0,26	–
Oxyphilic normocyte	–	1,34±0,22	–	1,22±0,04	1,15±0,19	4,88±0,63	2,30±0,34	–	–	5,35±0,62

Notes: Data are means M±m.



Thus, in the course of chronic low-intensity external  $\gamma$ -irradiation of CBA mice the following processes took place:

- increase in the number of pathological forms of cells of granulocyte lineage in the bone marrow associated with an increase in the total cumulative dose of radiation;
- expansion of the range of pathological changes in the granulocyte lineage (due to the appearance of cells with cytoplasmic bridge, a bridge in telophase and karyorrhexis) and, conversely, reduced range of abnormal cells in the erythroid lineage, in which there were no cells with such abnormalities as cytoplasmic bridge, karyorrhexis and giant cells;
- increase in the frequency of abnormal form of cells in the granulocyte proliferative pool and the maturing pool of the erythroid lineage.

#### REFERENCES

1. *Burlakova E. B., Mykhaylov V. F., Mazuryk V. K.* System of the redox homeostasis under radiation-induced genomic instability // *Radiation Biol. and Radioecology*. 2001. Vol. 41. N 5. P. 489–499.
2. *Heras'kyn S. A.* Critical analysis of modern concepts and approaches to the assessment of the biological effects of low doses of ionizing radiation // *Radiation Biol. and Radioecology*. 1995. Vol. 35. N 5. P. 563–571.
3. *Heras'kyn S. A.* The concept of biological effects of low doses of ionizing radiation on cells // *Radiation Biol. and Radioecology*. 1995. Vol. 35. N 5. P. 571–578.
4. *Hlants S.* Biomedical Statistics: Teaching and Reference Manual / Transl. from eng. Yu.A. Danylova, ed. by N.E. Buzykashvyly, D.V. Samoylova. M.: Praktyka, 1999. 459 p.
5. *Hol'dberh D. Y., Hol'dberh E. D., Shubyn N. H.* Animal Hematology. Tomsk: Publishing office Tom. Univ., 1973. 180 p.
6. *Lakyn H. F.* Biometry. M.: Vysshaya Shkola, 1990. 352 p.
7. *Pausheva Z. P.* Practicum on Plant Cytology. M.: Kolos, 1980. 304 p.
8. *Shvedov V. L., Holoshchapov P. V., Korytnyy V. S.* Experimental complex for the radio-ecological modeling // *Ecol.* 1984. N 2. P. 66–68.
9. *Shybkova D. Z., Akleev A. V.* Adaptive and compensatory response of hematopoiesis under chronic radiation exposure: a monography. M.: Publishing office RADEKON; Chelyabinsk: Publishing office CSPU. 2006. 346 p.
10. *Spytkovskyy D. M.* On some new biophysical and biochemical aspects of the mechanisms in the course of exposure to low and close to them doses of ionizing radiation (low LET) on the cells of eukaryotes // *Radiation Biol. and Radioecology*. 1999. Vol. 39. N 1. P. 145–155.
11. *Spytkovskyy D. M., Zaytsev S. V., Talyzyna T. A.* Modeling of the features of the initiation of genetic damage caused by low doses of ionizing radiation in eukaryotic cells as based on the concept of the existence of evolutionary cell reserve // *Radiation Biol. and Radioecology*. 1994. Vol. 34. N 6. P. 739–747.

Стаття: надійшла до редакції 31.05.13

доопрацьована 09.10.13

прийнята до друку 21.10.13

**ЦИТОЛОГІЧНІ ЕФЕКТИ У КЛІТИНАХ КІСТКОВОГО МОЗКУ  
ПРИ ХРОНІЧНОМУ НИЗЬКОІНТЕНСИВНОМУ  $\gamma$  –ОПРОМІНЕННІ  
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ТВАРИН**

**Д. Шибкова<sup>1</sup>, Н. Єфімова<sup>1</sup>, Н. Сибірна<sup>2</sup>, О. Аклєєв<sup>3,4</sup>**

<sup>1</sup>Челябінський державний педагогічний університет  
пр. Леніна, 69, Челябінськ 454080, Росія

<sup>2</sup>Львівський національний університет імені Івана Франка  
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна

<sup>3</sup>Уральський науково-практичний центр радіаційної медицини  
вул. Вороновського, 68-А, Челябінськ 454076, Росія

<sup>4</sup>Челябінський державний університет  
вул. Братів Кашириних, 129, Челябінськ 454001, Росія  
e-mail:sybirna\_natalia@yahoo.com  
e-mail:shibkova2006@mail.ru\*

Унаслідок дії іонізуючого випромінювання у клітинах виникають пошкодження в геномі, в результаті яких клітина може загинути. Виживання клітини можливе лише у разі активації внутрішньоклітинних систем репарації та, як наслідок, розвитку адаптації. Результат опромінення головним чином залежить від стану антиоксидантного-прооксидантного гомеостазу. Виявлено, що хронічне низькоінтенсивне  $\gamma$ -опромінення призводить до збільшення кількості патологічних форм клітин і розширення спектра патологій у гранулоцитарному ростку кісткового мозку. У еритроцитарному ростку спектр аномальних клітин скорочувався, проте зростала частота аномальних форм клітин.

*Ключові слова:* хронічне низькоінтенсивне  $\gamma$ -випромінювання, кістковий мозок, гранулоцитарний росток, еритроїдний росток.

**ЦИТОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ В КЛЕТКАХ КОСТНОГО МОЗГА  
ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ НИЗКОИНТЕНСИВНОМ  $\gamma$ -ОБЛУЧЕНИИ  
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ**

**Д. Шибкова<sup>1</sup>, Н. Ефимова<sup>1</sup>, Н. Сибирная<sup>2</sup>, А. Аклеев<sup>3,4</sup>**

<sup>1</sup>Челябинский государственный педагогический университет  
пр. Ленина, 69, Челябинск 454080, Россия

<sup>2</sup>Львовский национальный университет имени Ивана Франко  
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина

<sup>3</sup>Уральский научно-практический центр радиационной медицины  
ул. Вороновского, 68-А, Челябинск 454076, Россия

<sup>4</sup>Челябинский государственный университет  
ул. Братьев Кашириных, 129, Челябинск 454001, Россия  
e-mail:sybirna\_natalia@yahoo.com  
e-mail:shibkova2006@mail.ru\*

Вследствие действия ионизирующего излучения в клетках возникают повреждения в геноме, в результате которых клетка может погибнуть. Выживание

клетки возможно в случае активации внутриклеточных систем репарации и, как следствие, развития адаптации. Результат облучения главным образом зависит от состояния антиоксидантно-прооксидантного гомеостаза. Нами обнаружено, что хроническое низкоинтенсивное  $\gamma$ -облучение приводит к увеличению количества патологических форм клеток и расширению спектра патологий в гранулоцитарном ростке костного мозга. В эритроцитарном ростке спектр аномальных клеток сокращался, однако увеличивалась частота аномальных форм клеток.

*Ключевые слова:* хроническое низкоинтенсивное  $\gamma$ -излучение, костный мозг, гранулоцитарный росток, эритроидный росток.

## ОКРЕМІ ПОКАЗНИКИ ЛІПІДНОГО ОБМІНУ В СИРОВАТЦІ КРОВІ ГУСЕЙ ЗАЛЕЖНО ВІД ДОДАТКОВОГО ВВЕДЕННЯ РІЗНИХ ДОЗ ВІТАМІНУ Е В РАЦІОН У РЕПРОДУКТИВНИЙ ПЕРІОД

О. Моравська

*Прикарпатський Інститут імені Михайла Грушевського МАУП  
вул. Винниченка, 30, Львів 79008, Україна  
e-mail: elena.moravska@mail.ru*

У статті наведено результати досліджень щодо змін вмісту сумарних ліпідів та їхніх окремих класів, змін жирнокислотного складу, а також вмісту продуктів пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) у сироватці крові дорослих гусей залежно від додаткового введення різних доз вітаміну Е в раціон у репродуктивний період. Встановлено, що при додатковому введенні вітаміну Е в оптимальній дозі (35 МО/кг) ефективно регулюються окремі ланки ліпідного обміну. Зокрема, на фоні зменшення сумарного вмісту ліпідів у сироватці крові гусей зростає вміст фосфоліпідів зі зниженням вмісту вільного холестеролу. Поряд із цим, ефективно регулюється жирнокислотний склад зі зростанням індексу ненасиченості жирних кислот і зменшується вміст продуктів ПОЛ.

*Ключові слова:* гуси, сироватка крові, сумарні ліпіди, окремі класи ліпідів, жирнокислотний склад, продукти ПОЛ.

Відомо, що вітамін Е, поряд із різнобічним впливом на перебіг біохімічних процесів, ефективно регулює окремі ланки ліпідного обміну в організмі тварин і птиці, що, у свою чергу, позитивно відображається як на загальнофізіологічному стані організму, так і на репродуктивних функціях.

Одним із чинників, що ефективно впливає на процеси ліпідного обміну, шляхом структуризації бішару клітинних мембран та регуляції процесів ПОЛ, є  $\alpha$ -токоферол [2, 6, 7].

У літературних джерелах наведені дані щодо впливу  $\alpha$ -токоферолу на синтез фосфоліпідів і обмін холестерину та жовчних кислот [15, 17–19]. Зокрема, відомо, що фосфоліпіди є основними компонентами клітинних мембран. Зазначено, що фосфатидна кислота, яка є попередником у синтезі як фосфоліпідів, так і триацилгліцеридів синтезується під впливом гліцерол-3-фосфат-ацилтрансферази, яка для синтезу ацил-КоА використовує переважно насичені жирні кислоти і насамперед пальмітинову ( $C_{16:0}$ ) та ненасичені жирні кислоти, зокрема олеїнову ( $C_{18:1}$ ) [4, 5].

$\alpha$ -Токоферол, впливаючи на активність ферменту  $\beta$ -каротин-15,15'-діоксигенази, який бере участь в ензиматичному окисненні  $\beta$ -каротину по центральному подвійному зв'язку, сприяє посиленому синтезу вітаміну А, шляхом захисту тіолових груп ферменту [11]. Встановлено, що токоферол і ретинол впливають на активність  $\Delta 9$ -десатурази (стеароїл-КоА десатурази), що каталізує синтез моноєнових кислот, де основним продуктом каталізу цього ферменту є олеїнова кислота. Олеїнова кислота – це основний компонент триацилгліцеролів і входить до складу фосфоліпідів і естерів холестеролу, а також впливає на активність  $\Delta 6$ - і  $\Delta 5$ -десатураз, які каталізують біосинтез поліненасичених жирних кислот і здатні вбудовуватись у фосфоліпідний бішар, впливаючи на проникність клітинних мембран [14, 16, 20, 21].

$\alpha$ -Токоферол впливає на збільшення вмісту фосфоліпідів, що корелює зі зменшенням вмісту холестеролу та підвищенням активності антиоксидантної системи у структурі клітинних мембран, а також регулює активацію синтезу специфічних рецепторів на клітинних мембранах, які відповідають за поглинання ліпопротеїнів низької щільності (ЛПНЩ) [12]. Більша частина холестерину як зовнішньоклітинно, так і внутрішньоклітинно естерифікується вищими жирними кислотами, переважно лінолевою ( $C_{18:2}$ ) та олеїною ( $C_{18:1}$ ), однак за різними механізмами та за участю різних ферментів. Зокрема, зовнішньоклітинна естерифікація, яка здійснюється за участю лецитин-холестерин-ацилтрансферази (ЛХАТ) плазми, більш активно відбувається у ліпопротеїнах плазми крові високої щільності (ЛПВЩ), які сприяють виходу мембранного холестерину та протидіють надмірному його накопиченню у клітинах [4]. Накопичення у клітині, а саме в мембранах ендоплазматичного ретикулу, неестерифікованого холестеролу викликає пригнічення активності  $\beta$ -гідрокси- $\beta$ -метилглутарил-КоА-редуктази – ключового ферменту, регулює швидкість біосинтезу холестеролу клітиною, та підвищення активності ацил-КоА-холестерин-ацилтрансферази – ферменту, який регулює внутрішньоклітинну естерифікацію холестеролу. Внаслідок цього збільшується швидкість реестерифікації холестеролу та пригнічується синтез рецепторів для ліпопротеїнів низької щільності (ЛПНЩ) на поверхні клітини, а наслідком є зниження захоплення клітиною ЛПНЩ [12, 18, 19]. Так, сучасними дослідженнями встановлено, що шляхом впливу на рецептори плазматичних мембран і, зокрема, на регуляцію рецепторів V1 у печінці,  $\alpha$ -токоферол стимулює проникнення ліпопротеїнів низької щільності (ЛПНЩ), які є основним класом для перенесення холестерину в клітину. Завдяки цьому знижується вміст загального холестерину у крові [18, 19]. При введенні інших антиоксидантів в організм тварин зниження вмісту загального холестеролу не спостерігалось, а отже, впливає припущення, що дія  $\alpha$ -токоферолу реалізується не лише за антиоксидантним механізмом, але й шляхом впливу на рецептори клітинних мембран [18, 19]. Зокрема, існує думка, що специфічність дії вітаміну Е обумовлена його взаємодією з токоферолзв'язуючими білками, а це не дає замінити вітамін Е синтетичними антиоксидантами [7]. Разом з тим, встановлено, що підвищені дози вітаміну Е виявляють прооксидантну дію, а це призводить до порушення фізіологічного перебігу процесів (ПОЛ) [2, 6].

Виходячи з вищесказаного, можна зробити висновок, що  $\alpha$ -токоферол чинить різнобічну позитивну дію стосовно окремих ланок обміну речовин в організмі, зокрема, ліпідного обміну, однак слід зазначити, що вплив  $\alpha$ -токоферолу має чітко виражений дозозалежний характер.

Метою нашої роботи було дослідити вплив додаткового введення різних доз вітаміну Е до стандартного раціону гусей у репродуктивний період на вміст загальних ліпідів, їх окремих класів, жирнокислотний склад ліпідів, вміст дієвих кон'югатів, гідроперексидів ліпідів і ТБК-позитивних продуктів у сироватці крові гусей.

#### Матеріали та методи

Дослідження проводили на базі фермерського господарства с. Меденичі Дрогобицького р-ну Львівської обл. на племінних гусях сірої оброшинської породи 3-річного віку упродовж 90-добового періоду. Утримання гусей вигульне, з вільним доступом до корму і води. У кожній відокремленій групі утримували по 5 гусок і 1 гусака. Гуся контрольної та дослідних груп отримували упродовж дослідного періоду стандартний комбікорм ПК-33-3-89, збалансований за всіма елементами живлення згідно з рекомендованими нормами, який містить з розрахунку на 1 кг комбікорму: 10 МО вітаміну Е; 5000 МО вітаміну А; 700 МО вітаміну D [9].

У роботі використано 4 групи тварин (контрольна і три дослідні). У раціон дослідних груп на 1 кг комбікорму додатково вводили вітамін Е відповідно: 25 МО – 1-ша дослідна група; 35 МО – 2-га дослідна група і 45 МО – 3-тя дослідна група. У дослідженнях використовували „MICROVIT™ E PROMIX 50” (α-токоферол–ацетат) французької фірми „Adisseo” у вигляді добавки до комбікорму з ретельним їх змішуванням.

У дослідженнях використовували сироватку крові дорослих гусей (венозна кров, із підкрильної вени). У сироватці крові гусей визначали загальний вміст ліпідів, їх окремих класів, жирнокислотний склад ліпідів, вміст дієнових кон’югатів, гідроперекисів ліпідів і ТБК-позитивних продуктів.

Ліпіди екстрагували сумішшю метанолу і хлороформу у співвідношенні 1:2 за методом Фолча і визначали їхню кількість ваговим методом, шляхом зважування сухого залишку [1]. Окремі класи ліпідів виділяли методом тонкошарової хроматографії на силікагелі у системі гексан, діетиловий ефір, оцтова кислота у відношенні 70:30:1 [1]. Жирнокислотний склад визначали методом газорідинної хроматографії [10]. Вміст дієнових кон’югатів у тканинах визначали за методом, який ґрунтується на властивості спряжених подвійних зв’язків поглинати випромінювання при довжині хвилі 233 нм [13]. Рівень гідроперекисів ліпідів у тканинах визначали за їх реакцією з тіоціанатом амонію після попереднього екстрагування ліпідів етанолом [1]. Вміст ТБК–позитивних продуктів визначали за методом, в основі якого лежить реакція між малоновим діальдегідом та тіобарбітуровою кислотою [8]. Отримані цифрові дані опрацьовували статистично, використовуючи t-критерій Стьюдента за допомогою комп’ютерної програми “Microsoft Excel”.

#### Результати і їхнє обговорення

Важливим моментом у стабілізації ліпідного обміну є регуляція мікров’язкості ліпідної фази мембран одним із показників якої є рівень співвідношення холестерол/фосфоліпіди. Зменшення цього співвідношення корелює зі зростанням індексу ненасиченості жирних кислот, підвищенням антиоксидантної активності й переходом ліпідної фази у «рідкий стан». Зміна мікров’язкості ліпідної фази впливає на структурні перебудови у мембранах, результатом чого є зміна метаболічної активності мембранозв’язаних ферментів.

У зміні активності важливе значення має регуляція концентрації того чи іншого ліпиду, який відіграє роль ефектора ферменту, а також наявність продуктів пероксидного окиснення, зокрема гідроперекисів [6, 12]. Зменшення активності супероксиддисмутази у мікросомальних мембранах корелює зі зниженням індексу ненасиченості жирних кислот [7]. Також існують дані, що від складу ліпідів і мікров’язкості ліпідної фази мембран залежить активність таких регуляторних ферментів як аденілатциклаза та фосфодіестераза, що каталізують утворення та розщеплення циклічних нуклеотидів цАМФ (Аденозин-3’, 5’-монофосфат циклічний) та цГМФ (Гуанозин-3’, 5’-монофосфат циклічний) [6, 12].

Із наведених нижче даних (табл. 1) можна побачити, що при додатковому введенні α-токоферолу до раціону гусей у кількості 35 МО/кг комбікорму (2-га дослідна група) спостерігаються більш виражені вірогідні зміни у сироватці крові дорослих гусей, ніж у сироватці крові гусей 1-ї та 3-ї дослідної групи. А саме, більш істотно зменшується сумарний вміст ліпідів ( $P < 0,01$ ), що свідчить про інтенсифікацію процесів ліпідного обміну. Також спостерігається зменшення вільного холестеролу і триацилгліцеролів на фоні збільшення вмісту фосфоліпідів ( $P < 0,05$ ) порівняно із результатами контрольної групи, що свідчить про перехід ліпідів мембран у більш «рідкий» стан, що, за даними літературних джерел [6, 12], корелює з підвищенням антиоксидантної активності.



Таблиця 1

Загальний вміст ліпідів і перерозподіл окремих їх класів у сироватці крові дорослих гусей залежно від додаткового введення різних доз вітаміну Е в раціон гусей ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

Досліджувані показники	Групи гусей			
	контрольна	1-ша дослідна	2-га дослідна	3-тя дослідна
Загальні ліпіди, г%	3,69±0,15	3,37±0,15	2,99±0,07**	3,07±0,13*
Класи ліпідів, (% до загальних ліпідів)				
Фосфоліпіди	14,88±0,31	15,31±0,15	15,90±0,19*	15,67±0,17
Моно- і діацилгліцероли	14,36±0,32	14,01±0,10	13,81±0,11	13,85±0,12
Вільний холестерол	10,70±0,32	10,05±0,17	9,62±0,15*	9,84±0,19*
НЕЖК	7,47±0,18	7,44±0,15	6,95±0,26	7,23±0,30
Триацилгліцероли	32,17±0,13	31,94±0,19	31,49±0,23*	31,77±0,17
Естерифіков. холестерол	20,42±0,38	21,25±0,19	22,23±0,21	21,64±0,13*

**Примітка.** У цій і наступних таблицях зірочками показані значення, що статистично вірогідно відрізняються від контрольних, відповідно (\* $P<0,05$ ; \*\* $P<0,01$ ; \*\*\* $P<0,001$ ).

Встановлено, що вказані зміни у перерозподілі окремих класів ліпідів (табл. 1) корелюють зі змінами жирнокислотного складу (табл. 2), де більш виражені вірогідні зміни простежуються також у крові гусей 2-ї дослідної групи під впливом додаткового введення 35 МО вітаміну Е на кг комбікорму. Зокрема, інтенсивно знижується вміст насичених (на 7,30%) і мононенасичених жирних кислот (на 6,9%), серед яких спостерігаються вірогідні зміни вмісту пальмітинової  $C_{16:0}$  ( $P<0,01$ ), стеаринової  $C_{18:0}$  ( $P<0,01$ ) та пальмітоолеїнової  $C_{16:1}$  ( $P<0,05$ ) і олеїнової  $C_{18:1}$  ( $P<0,001$ ) кислот, порівняно з результатами контрольної групи. Поряд з цим, збільшується вміст поліненасичених жирних кислот (на 21%), серед яких виділимо вірогідне збільшення вмісту лінолевої  $C_{18:2}$ , ліноленової  $C_{18:3}$ , арахідонової  $C_{20:4}$ , ейкозапентаєнової  $C_{20:5}$ , докозапентаєнової  $C_{22:5}$  та докозагексаєнової  $C_{22:6}$ , порівняно з результатами контрольної групи.

Таблиця 2

Жирнокислотний склад крові дорослих гусей залежно від додаткового введення різних доз вітаміну Е в їх раціон, % ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

Код жирної кислоти	Групи гусей			
	контрольна	1-ша дослідна	2-га дослідна	3-тя дослідна
$C_{14:0}$ (Міристинова)	0,49±0,03	0,46±0,02	0,42±0,01	0,44±0,02
$C_{16:0}$ (Пальмітинова)	27,24±0,13	26,22±0,52	25,94±0,17**	25,95±0,16**
$C_{16:1}$ (Пальмітоолеїнова)	3,62±0,23	3,24±0,13	2,89±0,17*	3,03±0,16
$C_{17:0}$ (Маргаринаова)	0,51±0,03	0,50±0,01	0,47±0,01	0,48±0,08
$C_{18:0}$ (Стеаринова)	7,64±0,24	7,09±0,07	6,43±0,13**	6,84±0,10*
$C_{18:1}$ (Олеїнова)	44,65±0,17	42,25±0,85*	42,06±0,75***	42,09±0,91**
$C_{18:2}$ (Лінолева)	7,10±0,11	7,64±0,20*	7,85±0,14**	7,60±0,15*
$C_{18:3}$ (Ліноленова)	0,70±0,08	0,84±0,03	0,93±0,05*	0,87±0,04
$C_{20:1}$ (Гондоїнова)	0,52±0,06	0,46±0,01	0,39±0,02	0,42±0,01
$C_{20:2}$ (Ейкозадієнова)	0,11±0,02	0,15±0,01	0,20±0,05	0,20±0,07
$C_{20:3}$ (Ейкозатрієнова)	0,10±0,02	0,14±0,10	0,19±0,05	0,18±0,09
$C_{20:4}$ (Арахідонова)	5,07±0,22	5,27±0,17	6,61±0,21**	6,07±0,26*
$C_{22:2}$ (Докозадієнова)	0,21±0,02	0,30±0,05	0,33±0,05	0,32±0,07
$C_{20:5}$ (Ейкозапентаєнова)	1,04±0,14	0,87±0,05	0,68±0,05*	0,76±0,05
$C_{24:1}$ (Нервонова)	0,12±0,01	0,14±0,09	0,18±0,06	0,18±0,08
$C_{22:5}$ (Докозапентаєнова)	0,37±0,03	0,44±0,05	0,61±0,04**	0,54±0,05*
$C_{22:6}$ (Докозагексаєнова)	0,45±0,05	0,62±0,08	0,99±0,07***	0,97±0,10**
Насичені	35,88	34,27	33,26	33,71
Мононенасичені	48,91	46,09	45,55	45,69
Поліненасичені	15,15	16,27	18,39	17,51

Що стосується індексу ненасиченості (рис. 1), збільшення якого корелює зі зростанням вмісту фосфоліпідів і зменшенням вмісту холестеролу, а саме зі зменшенням співвідношення холестерол/фосфоліпідів (рис. 1), і свідчить про підвищення антиоксидантної активності, то у 1-й дослідній групі (додаткове введення 25 МО вітаміну Е на кг комбікорму) він зростав на 11,1%, у 2-й дослідній групі (35 МО/кг) на 27,8% і у 3-й дослідній групі на 22,2% порівняно з результатами контрольної групи. Зростання індексу ненасиченості корелює зі зниженням рівня співвідношення холестерол/фосфоліпідів. Більш істотне зростання індексу ненасиченості зі зменшенням рівня співвідношення холестерол/фосфоліпідів спостерігається при введенні підібраної нами середньої дози  $\alpha$ -токоферолу (2-га дослідна група).

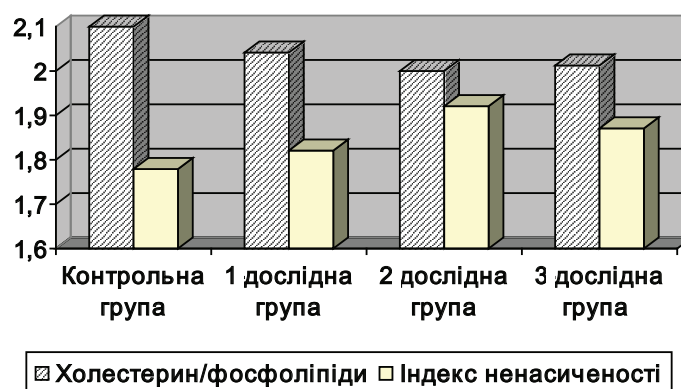


Рис. 1. Зміна індексу ненасиченості та співвідношення холестерол/фосфоліпідів у крові дорослих гусей під впливом додаткового введення в раціон різних доз вітаміну Е.

Аналізуючи дані, наведені у табл. 3 можна побачити, що у першій дослідній групі  $\alpha$ -токоферол, при додатковому введенні у кількості 25 МО/кг комбікорму, виявляє незначний вплив на зменшення вмісту продуктів ПОЛ у сироватці крові дорослих гусей, що, можливо, свідчить про недостатню дозу вітаміну Е. Тоді як у другій дослідній групі, при додатковому введенні вітаміну Е у кількості 35 МО/кг комбікорму,  $\alpha$ -токоферол виявляє виражену регулюючу дію на вміст продуктів ПОЛ у сироватці крові гусей. Зокрема, спостерігається вірогідне ( $P < 0,002$ ) зменшення вмісту дієнових кон'югатів – на 22,1% та вірогідне ( $P < 0,025$ ) зменшення вмісту ТБК-позитивних продуктів – на 26,5% порівняно з контрольною групою. Це може бути наслідком дії  $\alpha$ -токоферолу, який, утворюючи кластери в ліпідному шарі біомембран, відіграє роль буферу, що підтримує концентрацію ліпідних радикалів на стаціонарному рівні без ризику накопичення продуктів пероксидного окиснення [2, 6]. У третій дослідній групі (з додатковим введенням токоферолу у кількості 45 МО/кг комбікорму) простежується тенденція до зростання вмісту продуктів ПОЛ, порівняно з результатами у другій дослідній групі (35 МО/кг), що пояснюється прооксидантною дією токоферолу в підвищених дозах [2, 6]. Зокрема, у вказаній дослідній групі вміст дієнових кон'югатів ( $P < 0,01$ ) зменшується – на 18,2%, а вміст ТБК-позитивних продуктів ( $P < 0,05$ ) – на 19,7%, порівняно з контрольною групою, що, відповідно, на 3,9% та на 6,8% відрізняється, з тенденцією до зростання, від результатів другої дослідної групи.

Вказані зміни відображаються і на репродуктивних якостях птиці. Зокрема, кількість інкубаційних яєць за 90-добовий період яйцекладки у 1-й дослідній групі, де до раціону гусей додавали 25 МО вітаміну Е на 1 кг комбікорму, зросла на 3,59%, у 2-й дослідній

групі, де до раціону гусей додавали 35 МО вітаміну Е, – на 13,85% і у 3-й дослідній групі (45 МО вітаміну Е на кг комбікорму) – на 10,26% порівняно з результатами у контрольній групі. Також відзначено зростання кількості запліднених яєць, зокрема у 1-й дослідній групі на 5,3%, у другій дослідній групі – на 12,7% і у 3-й дослідній групі – на 11,1%, порівняно з результатами контрольної групи. Що ж стосується рівня виводимості гусенят, то у 1-й дослідній групі він зростав на 2,8%, у 2-й дослідній групі – на 20,5% і у 3-й дослідній групі – на 18,11%, порівняно із результатами контрольної групи. Такі зміни щодо показників продуктивності, можливо, пояснюються різнобічною дією  $\alpha$ -токоферолу, а саме антиоксидантною активністю щодо стабілізації процесів ПОЛ плазматичних мембран сперміїв і активації гексокінази та цитохромоксидази – ключових ферментів енергетичного обміну мітохондрій статевих клітин гусаків, а також можливим збільшенням вмісту докозагексаєнової жирної кислоти, яка, на думку деяких вчених, відіграє важливу роль у забезпеченні функціональної активності сперматозоїдів [5]. Можливо і те, що збільшення вмісту лінолевої та арахідонової жирних кислот, які є попередниками регуляторних ейкозаноїдів, впливає на підвищення репродуктивних функцій за рахунок регуляції синтезу простагландинів у статевих органах [3]. Зокрема, дослідженнями авторів [3] показано, що простагландини  $E_2$  і  $F_2\alpha$ , які продукуються клітинами преовуляторного фолікула, поряд із іншими біологічно активними речовинами, стимулюють розрив фолікула й овуляцію.

Таблиця 3

Вміст продуктів ПОЛ у сироватці крові дорослих гусей залежно від додаткового введення різних доз вітаміну Е в раціон гусей ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

Досліджувані показники	Групи гусей			
	контрольна	1-ша дослідна	2-га дослідна	3-тя дослідна
Дієнові кон'югати, мкмоль/мл	107,6 $\pm$ 4,27	98,2 $\pm$ 3,79	83,8 $\pm$ 2,08**	88,0 $\pm$ 2,98**
Гідроперекиси ліпідів, $E_{480}$ /мл	1,35 $\pm$ 5,33	1,14 $\pm$ 6,95	0,86 $\pm$ 3,91	0,90 $\pm$ 3,45
ТБК-позитивні продукти, мкмоль/мл	13,92 $\pm$ 1,07	12,91 $\pm$ 0,68	10,23 $\pm$ 0,52*	11,18 $\pm$ 0,43*

Отже, підсумовуючи дані, можна зробити висновок, що найбільш істотні та, насамперед, позитивні зміни спостерігаються у сироватці крові дорослих гусей 2-ї дослідної групи (при додатковому введенні 35 МО вітаміну Е на кг стандартного комбікорму), а це, у свою чергу, показує, що, окрім антиоксидантної дії,  $\alpha$ -токоферол чинить стабілізуючий вплив на окремі ланки ліпідного обміну. Зокрема, поряд із впливом на зниження вмісту продуктів ПОЛ,  $\alpha$ -токоферол впливає на перерозподіл окремих класів ліпідів зі зростанням вмісту фосфоліпідів і зменшенням вільного холестерину та регулює жирнокислотний склад із зростанням вмісту поліненасичених жирних кислот в основному за рахунок лінолевої, ліноленової, арахідонової, докозапентаєнової та докозагексаєнової кислот. Однак цей процес носить дозозалежний характер, а при підвищенні дози вітаміну Е спостерігається тенденція до прооксидантної дії  $\alpha$ -токоферолу. Зокрема, у нашому досліді слабо виражена прооксидантна дія, внаслідок незначного підвищення додаткової дози  $\alpha$ -токоферолу, простежується у третій дослідній групі.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Андреева Л. В., Вербицький П. І., Віщур О. І. та ін. Фізіолого-біохімічні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині: довідник. Львів: ВКП «ВМС», 2004. 399 с.
2. Бурлакова Е. Б., Крашаков С. А., Храпова Н. Г. Роль токоферолов в пероксидном окислении липидов биомембран // Биол. мембраны. 1998. Т. 15. № 2. С. 137–167.

3. Варфоломеев С. Д., Мевх А. Т. Простагландины – молекулярные биорегуляторы. М.: Изд-во МГУ, 1985. 308 с.
4. Гонський Я. І., Максимчук Т. П., Калинський М. І. Біохімія людини. Тернопіль: Укрмедкнига, 2002. 744 с.
5. Гула Н. М., Маргітич В. М. Жирні кислоти та їх похідні при патологічних станах. К.: Наук. думка, 2009. 333 с.
6. Евстигнеева Р. П., Волков И. М., Чудинова В. В. Витамин Е как универсальный антиоксидант и стабилизатор биологических мембран // Биол. мембраны. 1998. Т. 15. № 2. С. 119–135.
7. Капралов А. А., Донченко В. Г., Петрова Г. В. Роль витамина Е в процессах функционирования клетки. Антиоксидантные и неантиоксидантные механизмы // Успехи современной биологии. 2003. Т. 123. № 6. С. 573–589.
8. Коробейникова С. Н. Модификация выделения продуктов перекисного окисления липидов в реакции с ТБК // Лабораторное дело. 1989. № 7. С. 8–9.
9. Кирилів Я. І., Ратич І. Б. Методи контролю повноцінності комбикормів та оцінка кількості і якості продукції. Львів: ВКП «ВМС», 2004. 185 с.
10. Немировський В. І., Терещук О. М., Гнатів В. І., Скорохід В. Й. Визначення органічних кислот у біологічному матеріалі методом газохроматографічного аналізу: метод. рекомендації. Львів, 1989. 40 с.
11. Ребров В. Г., Громова О. А. Витамины и микроэлементы. М.: Алев-В, 2003. 648 с.
12. Северин С. Е. Биохимия липидов и их роль в обмене веществ. М.: Наука, 1981. 167 с.
13. Стальная И. Д. Метод определения диеновой конъюгации ненасыщенных высших жирных кислот // Современные методы в биохимии. М.: Медицина, 1977. С. 63.
14. Juan P. Infante A function for the vitamin E metabolite  $\alpha$ -tocopherol quinone as an essential enzyme cofactor for the mitochondrial fatty acid desaturases // FEBS Lett. 1999. Vol. 446. N 1. P. 1–5.
15. Maraschiello C., Esteve E., Regueiro J. A. Cholesterol oxidation in meat from chickens fed  $\alpha$ -tocopherol and  $\beta$ -carotene supplemented diets with different unsaturation grades // Lipids. 1998. Vol. 33. N 6. P. 705–713.
16. Okayasu T., Kameda K., Ono T., Imai Y. Effect of dietary vitamin B<sub>2</sub> and vitamin E on the  $\Delta^9$ -desaturase and catalase in rat liver microsomes // Biochim. Biophys. Acta. 1977. Vol. 489. P. 389–402.
17. Phonpanichrasamee C., Komaratat P., Wilairat P. Hypocholesterolemic effect of vitamin E on cholesterol-fed rabbit // Int. J. Vitam. Nutr. Res. 1990. Vol. 60. P. 240–244.
18. Scott V., Varsha T., Kumar K. et al. Novel Transcriptional Activities of Vitamin E: Inhibition of Cholesterol Biosynthesis // Biochem. 2008. Vol. 47. N 2. P. 744–752.
19. Witt W., Kolleck I., Fechner H. et al. Regulation by vitamin E of the scavenger receptor BI in rat liver and HepG2 cells // J. Lipid. Res. 2000. Vol. 41. – P. 2009–2016.
20. Zolfaghari R., Cifelli C. J., Banta M. D., Ross A. C. Fatty Acid  $\Delta^5$ -Desaturase mRNA Is Regulated by Dietary Vitamin A and Exogenous Retinoic Acid in Liver of Adult Rats // Archiv. Biochem. Biophys. 2001. Vol. 391. N 1. P. 8–15.
21. Zolfaghari R., Ross A. C. Recent advances in molecular cloning of fatty acid desaturase genes and the regulation of their expression by dietary vitamin A and retinoic acid // Prostagland., Leukotrien. and Essential Fatty Acids. 2003. Vol. 68. N 2. P. 171–179.

Стаття: надійшла до редакції 20.02.13

доопрацьована 10.12.13

прийнята до друку 12.12.13

**SEPARATE INDEXES LIPID'S METABOLISM IN SERUM BLOOD GOOSE  
DIPEND OF COMPLETE INTRODUCTION DIFFERENT DOSES VITAMIN E  
IN RATION IN REPRODUCTIVE PERIOD**

**O. Moravska**

*At Carpathian`s Institute Grushevsky`s IAMP  
30, Vynnychenko St., Lviv 79008, Ukraine  
e-mail: elena.moravska@mail.ru*

In article results of researches concerning changes of the contents of total general lipids and their separate classes, changes of fat – acid structure, and also the contents of products peroxidations lipids in whey of blood of adult geese are stated depending on additional introduction of various dozes of vitamin E in a diet during the reproductive period. It is shown of dozes dependent influence of tocopherol. It is established, that at additional introduction of vitamin E in optimum quantities (in our research – 35 UI/kg – 2-nd group) are effectively adjusted separate processes lipids an exchange. On a background of reduction of the contents total lipids in whey of blood of geese the contents phospholipids with decrease in a level of free cholesterol raises. In parallel, it is adjusted fatty acid structure with increase in an index not saturations of fat acids and reduction of the contents of products peroxidations lipids.

*Keywords:* geese, whey of blood, total lipids, separate classes of lipids, fat acids, products of peroxidations lipids.

**ОТДЕЛЬНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ЛИПИДНОГО ОБМЕНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ  
ГУСЕЙ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ДОПОЛНИТЕЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ РАЗНЫХ  
ДОЗ ВИТАМИНА Е В РАЦИОН В РЕПРОДУКТИВНЫЙ ПЕРИОД**

**Е. Моравская**

*Прикарпатский институт имени М. Грушевского МАУП  
ул. Винниченко, 30, Львов 79008, Украина  
e-mail: elena.moravska@mail.ru*

В статье представлены результаты исследований изменений содержания суммарных липидов и их отдельных классов, изменений жирно-кислотного состава, а также содержания продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в сыворотке крови взрослых гусей в зависимости от дополнительного введения разных доз витамина Е в рацион в репродуктивный период. Установлено, что при дополнительном введении витамина Е в оптимальной дозе (35 МЕ/кг) эффективно регулируются отдельные процессы липидного обмена. А именно, на фоне уменьшения содержания суммарных липидов в сыворотке крови гусей увеличивается содержание фосфолипидов со снижением содержания свободного холестерина. Также эффективно регулируется жирно-кислотный состав с увеличением индекса ненасыщенности жирных кислот и уменьшается содержание ПОЛ.

*Ключевые слова:* гуси, сыворотка крови, суммарные липиды, отдельные классы липидов, жирно-кислотный состав, продукты ПОЛ.

УДК 582.52:581.461

**МОРФОЛОГІЯ ТА ВАСКУЛЯРНА АНАТОМІЯ КВІТОК *DRACAENA SURCULOSA* LINDL. І *SANSEVIERIA AETHIOPICA* THUNB. (*ASPARAGACEAE* JUSS.)**

**О. Фіщук<sup>1</sup>, А. Одінцова<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Східноєвропейський національний університет імені Лесі Українки  
пр. Волі, 13, Луцьк 43025, Україна

<sup>2</sup>Львівський національний університет імені Івана Франка  
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна  
e-mail: amorpha@ukr.net

Вивчено морфологію та васкулярну анатомію квіток *Dracaena surculosa* і *Sansevieria aethiopica*. Показано, що у досліджених видів оцвітину й андроцеї характеризуються значними рисами подібності, проте виявлено відмінності у внутрішній будові зав'язі, вертикальній зональності септального нектарника та структурі вентрального комплексу провідних пучків. Медіанні насінні зачатки в обох видів іннервуються двома пучками. Септальний нектарник у *Sansevieria aethiopica* в 1,5 разу перевищує довжину гнізд зав'язі та продовжується в основу і дах зав'язі. Обидва типи зональності септального нектарника, виявлені у досліджених видів, були описані нами раніше для представників роду *Sansevieria*. Встановлені риси будови квіток досліджених видів підтверджують велику морфологічну подібність родів *Dracaena* та *Sansevieria*.

*Ключові слова:* *Dracaena surculosa*, *Sansevieria aethiopica*, морфологія квітки, васкулярна анатомія, гінецей, септальний нектарник.

Представники роду *Dracaena* Vand. ex L. поширені у тропічній і субтропічній Африці, Азії, на островах Тихого та Індійського океанів, а також у Центральній Америці [3, 9]. Це деревні розеткові рослини з атиповим вторинним потовщенням стебла, для яких характерні різноманітні ксероморфні риси анатомо-морфологічної будови пагонів. Види близького роду *Sansevieria* Thunb. є кореневищними травами зі шкірястими або сукулентними листками і поширені переважно в Африці [9]. Представники обидвох родів широко культивуються як декоративні рослини. Під час ембріологічних і порівняльно-морфологічних досліджень андроцеї та гінецеї у представників родини Agavaceae, до якої раніше відносили роди *Dracaena* і *Sansevieria*, було встановлено близьку подібність цих родів [17]. Згідно з молекулярними даними [7, 8, 11, 14], згадані роди розглядають у межах родини Asparagaceae s. l. Це викликає низку таксономічних проблем, оскільки дотепер не виявлено жодної діагностичної морфологічної ознаки для цієї великої та гетерогенної родини. Використання морфологічних ознак у філогенетичній систематиці представників родини Asparagaceae не дало розв'язків посталих проблем, оскільки для аналізу було використано лише ознаки зовнішньої морфології та деякі анатомічні ознаки [14]. Відповідно, метою нашої роботи було провести детальні дослідження мікроморфології квітки й особливостей її провідної системи на прикладі двох представників родів *Dracaena* і *Sansevieria* та виявити нові ознаки, які можуть бути використані у філогенетичних реконструкціях родини Asparagaceae та родів *Dracaena* і *Sansevieria* зокрема.



### Матеріали та методи

Об'єкт дослідження – квітки *Dracaena surculosa* та *Sansevieria aethiopica* на стадії бутона і розкритої квітки. Матеріал збирали у ботанічному саду імені академіка О.В. Фоміна Київського національного університету імені Тараса Шевченка і фіксували у 70% етанолі. З фіксованого матеріалу виготовляли препарати серій поперечних зрізів квітки завтовшки 20 мкм згідно зі стандартною методикою [1], зрізи зафарбовували розчинами астра-блау та сафраніну. Для вивчення препаратів використовували оптичний мікроскоп марки LABOVAL 4 фірми CARL ZEISS (Jena) та біокуляр марки МБС-10. Рисунки зрізів виготовляли з використанням мікрофотографій, отриманих за допомогою камери марки CANON 1000 D. Висоту зон гніцея обраховували за кількістю поперечних зрізів.

### Результати і їхнє обговорення

#### Морфологія квітки *Dracaena surculosa*

Квітка *Dracaena surculosa* 35–40 мм завдовжки, злегка зигоморфна (рис. 1, А). Приквітка конусоподібно згорнута, близько 3,7 мм завдовжки. Квітоніжка до 14,5 мм завдовжки, має зчленування на 3/4 довжини. Приквіточка одна, задня, 1,8 мм завдовжки. Оцвітину проста, шестичленна, зрослолисткова, віночкоподібна, білого кольору. Квіткова трубка сформована трубкою оцвітини та прирослими до неї тичинковими нитками. Вона є глечикоподібна, 18–20 мм завдовжки, 1,7 мм в діаметрі (рис. 1, Б). Відгини листочків простої оцвітини завдовжки дорівнюють квітковій трубці, однакові, 1,8 мм завширшки, із зігнутими досередини верхівками. Тичинки однакової довжини (рис. 1, Б), близько 20,5 мм завдовжки, прикріплюються до квіткової трубки в місці її переходу у відгин. Тичинкові нитки веретеноподібні. Пиляки лінійні, завдовжки 1,9 мм, прикріплюються до тичинкової нитки посередині їх висоти. Зав'язь оберненояйцеподібна, опуклотригранна, 1,3 мм у діаметрі та 1,8 мм заввишки, різко звужується у місці переходу у стовпчик (рис. 1, В). Стовпчик має центральне розміщення, двічі зігнутий, завдовжки до 20 мм. Лопаті приймочки півкокружлі, відігнуті (рис. 2, Р). Висота квітколожа за серією зрізів – близько 900 мкм (рис. 2, Б–Д). Ідіобласти з клітинними включеннями, рафідами, наявні у квітоніжці, в основі квіткової трубки, вільних верхівках листочків оцвітини, тичинкових нитках, у стінці зав'язі та стовпчику. У паренхімі стінки зав'язі наявні великі міжклітинники.

У основі зав'язі не містить порожнин (рис. 2, Е, Ж). Висота основи зав'язі (від місця відокремлення зав'язі та квіткової трубки до дна її гнізд) – 260 мкм. Гнізда зав'язі містять по одному насінному зачатку в медіанному положенні, з мікропіле, обернутим донизу (рис. 2, І). Різниця у висоті гнізд зав'язі одної квітки становить 20–40 мкм (див. таблицю). Дах зав'язі (від рівня верхньої поверхні гнізд до зникнення септальних нектарників) займає 580 мкм (рис. 2, М, Н). Канали стовпчика формуються не апікально, а дещо зсунуті на вентральну стінку гнізд, так що на зрізі через верхню частину зав'язі помітні одночасно і гнізда, і канали стовпчика (рис. 2, Л). У стовпчику ці канали заповнені секретом і об'єднані між собою (рис. 2, О, П).

На рівні 260 мкм вище дна гнізд з'являється трипроменева порожнина септального нектарника, яка на 40 мкм вище трансформується у три порожнини, розділені між собою постгенітально зімкнутими епідермісами. У такому вигляді септальний нектарник продовжується вздовж гнізд зав'язі близько 580 мкм та вздовж її даху ще 300 мкм (рис. 2, І–М). Вище порожнини септального нектарника об'єднуються зі септальними борозенками, формуючи залозисті нектарні щілини (рис. 2, Н), висота яких 240–280 мкм (див. таблицю). До основи стовпчика ці щілини поступово виклинюються, а плодолистки злипаються постгенітально (рис. 2, О).

Висота гнізд зав'язі та септального нектарника  
*Dracaena surculosa* Lindl. і *Sansevieria aethiopica* Thunb.

Номер квітки	<i>Dracaena surculosa</i> Lindl.		<i>Sansevieria aethiopica</i> Thunb.	
	Загальна висота септального нектарника (А+Б) *, мкм	Висота гнізд зав'язі, мкм	Загальна висота септального нектарника *, мкм	Висота гнізд зав'язі, мкм
1.	880+280	800, 820, 840	1060+240	780, 800, 800
2.	900+240	820, 860, 860	900+240	760, 780, 780
3.	880+280	820, 820, 840	940+260	720, 740, 800
4.	880+280	800, 820, 840	920+260	760, 800, 800
5.	900+240	840, 860, 860	860+240	720, 720, 740
Середнє значення	888+264	835	936+248	767

**Примітка.** \* Запис А+Б означає висоту внутрішнього септального нектарника (А) та висоту нектарної щілини (Б).

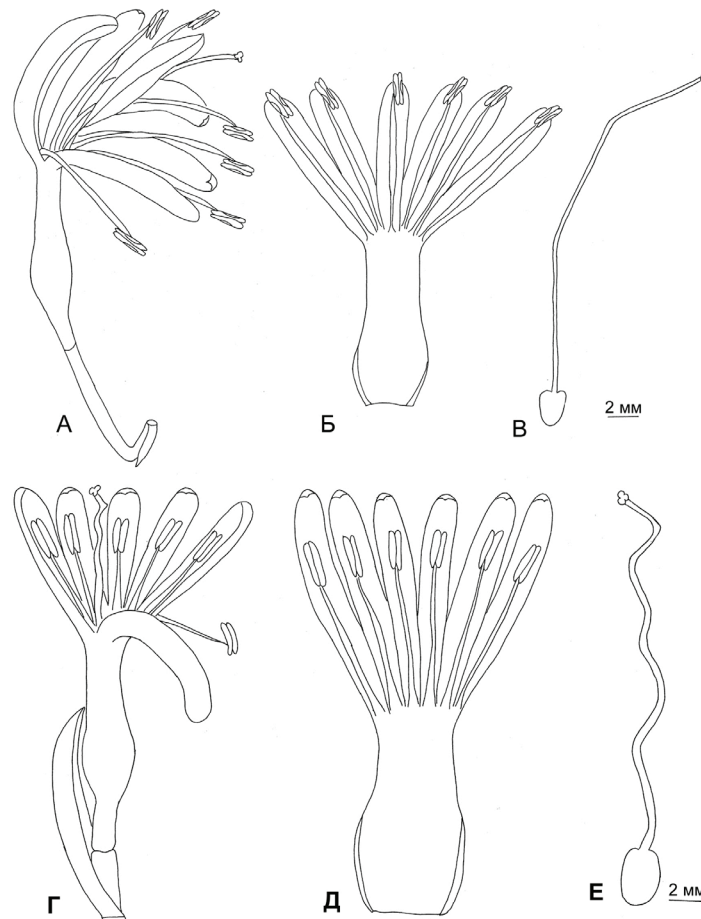


Рис. 1. Морфологія квітки *Dracaena surculosa* Lindl. (А-В) та *Sansevieria aethiopica* Thunb. (Г-Е): А – загальний вигляд квітки; Б – розгорнута оцвітину й андроцей; В – маточка, *Sansevieria aethiopica* Thunb.; Г – загальний вигляд квітки; Д – розгорнута оцвітину й андроцей; Е – маточка.

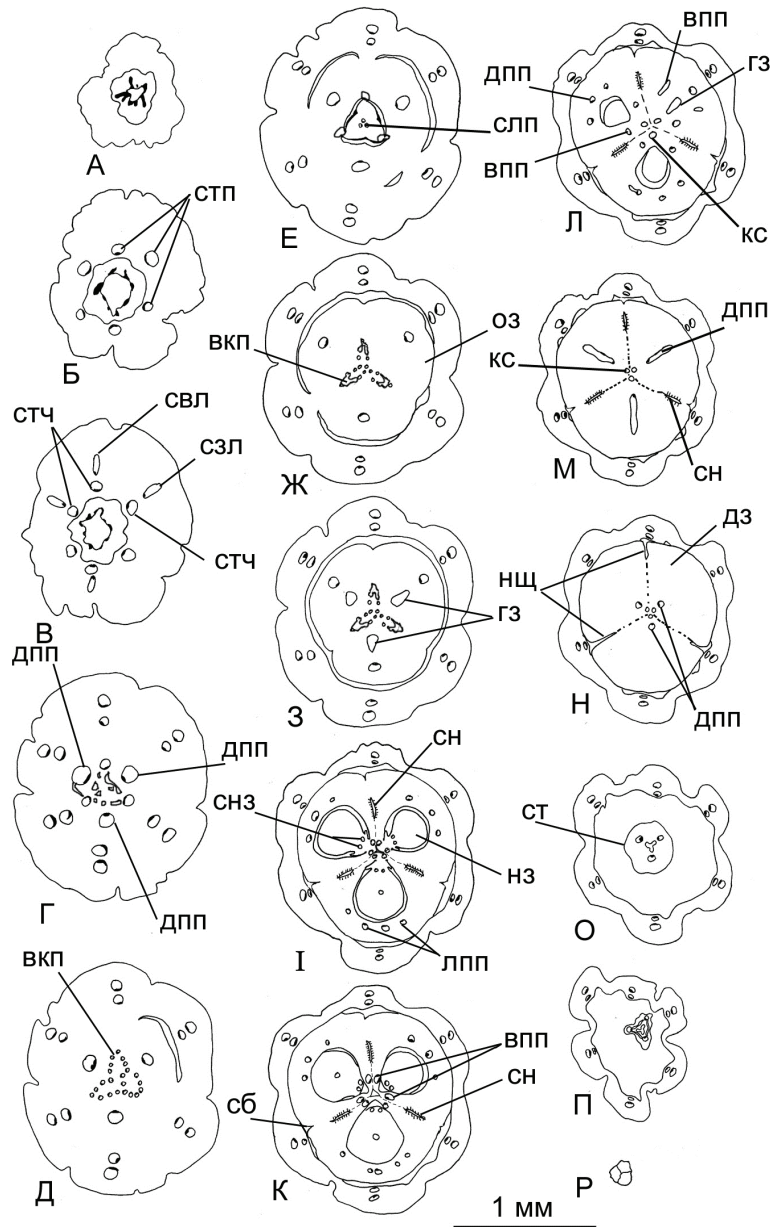


Рис. 2. Серія поперечних зрізів квітки *Dracaena surculosa* Lindl.: (А–Р). Зрізи А–Д проведені на рівні квітконіжки і квітколожа; Е–Л – на рівні основи і гнізд зав'язі, М–П – на рівні даху зав'язі та стовпчика; Р – приймочка. Умовні позначення: вкп – вентральний комплекс пучків, впп – вентральний пучок плодолистка, гз – гніздо зав'язі, дз – дах зав'язі, дпп – дорзальний пучок плодолистка, кс – канал стовпчика, кт – квіткова трубка, нз – насінний зачаток, нщ – нектарна щілина, оз – основа зав'язі, сб – септальна борозенка, свл – слід внутрішнього листочка оцвітини, сзл – слід зовнішнього листочка оцвітини, слп – сліпий пучок, сн – септальний нектарник, снз – слід насінного зачатка, ст – стовпчик, стп – стовбурові пучки, стч – слід тичинки, тч – тичинка.

Внутрішню структуру гінецея ми аналізували згідно з концепцією вертикальної зональності гінецея В. Ляйнфельнера [12] та рекомендацій С. Волгіна і В. Тихомирова [2]. Гінецей *Dracaena surculosa* містить такі структурні зони за В. Ляйнфельнером [12]: синасцидіатну, гемісинасцидіатну, гемісимплікану й асимплікатну (рис. 4, А). Синасцидіатна зона коротка (60 мкм), стерильна. Гемісинасцидіатна зона найдовша, в основі й у верхній частині вона стерильна, в середній її частині міститься насінний зачаток. На рівні прикріплення насінного зачатка плодолистки роз'єднуються між собою, формуючи в центрі зав'язі маленьку трикутну порожнину (рис. 1, К). Гемісимплікатна зона розміщена вище насінного зачатка, більша частина цієї зони розміщена у даху зав'язі (рис. 2, Л, М). Співвідношення висоти цих трьох зон становить 1:12:6. Асимплікатна зона починається від місця об'єднання септального нектарника зі септальною борозенкою.

### Морфологія квітки *Sansevieria aethiopica*

Квітки *Sansevieria aethiopica* значно відрізняються між собою за розмірами, 13,5–41 мм завдовжки (рис. 1, Г), подібні на квітки *Dracaena surculosa*, з деякими відмінностями, зазначеними нижче. Приквітка видовженойцеподібна, близько 15 мм завдовжки, 4,5 мм завширшки. Квітоніжка 8 мм завдовжки, до 1,6 мм у діаметрі, має зчленування на 2/3 довжини. Приквіточки дві, видовженойцеподібні: бічна передня 5 мм завдовжки, 2,7 мм завширшки (при основі – 3 мм), бічна задня 4,3 мм завдовжки та 2,2 мм завширшки (при основі – 2,6 мм). Квітова трубка 6,75–21 мм завдовжки, 1,5–2,0 мм у діаметрі, такої ж довжини, як вільні листочки оцвітини (рис. 1, Д). Листочки простої оцвітини 2–3 мм завширшки. Довжина зовнішніх тичинок 10,5–36,2 мм, довжина внутрішніх тичинок – 11,0–36,5 мм. Тичинкові нитки при основі крилаті, ребристі. Пиляки до 3,6 мм довжиною, з'єднані дещо нижче середини з тичинковою ниткою. Зав'язь 1,6 мм у діаметрі, 1,45–2,0 мм заввишки. Стовпчик хвилясто зігнутий (рис. 1, Е). Висота квітколожа за серією зрізів – близько 820 мкм (рис. 3, Б–Е). У всіх частинах квітки наявні рафіди.

Основа зав'язі *Sansevieria aethiopica* завдовжки близько 200 мкм. У цього виду різниця у висоті гнізд зав'язі одної квітки становить 20–80 мкм (див. таблицю). Дах зав'язі займає 360 мкм, канали стовпчика апікальні (рис. 4, Б). На 120 мкм нижче дна гнізд з'являються три окремі порожнини септальних нектарників, замкнуті ззовні та зісередини конгенітально (рис. 3, Ж). Така структура нектарника зберігається вздовж 260 мкм, а вище порожнини нектарника об'єднується трипроменевою щилиною із двох рядів епідермальних клітин, зімкнутих постгенітально (рис. 3, І, К). Нектарні щілини більш витягнуті у радіальному напрямку, ніж у *Dracaena surculosa* (рис. 3, Л–Н), їхня висота близько 240 мкм (див. таблицю). Зональність гінецея *Sansevieria aethiopica* така сама, як у *Dracaena surculosa*, проте в цього виду відносна й абсолютна висота синасцидіатної зони більша (140 мкм), а співвідношення висоти трьох нижніх зон – 1:3,9:1,9.

### Васкулярна анатомія квіток *Dracaena surculosa* та *Sansevieria aethiopica*

У *Dracaena surculosa* провідний циліндр квітоніжки суцільний (рис. 2, А), в основі квітколожа у ньому майже на одному рівні відходять шість провідних стовбурів на радіусах листочків оцвітини, після чого лакуни замикаються (рис. 2, Б–В). Стовбурові пучки короткі, одразу діляться радіально на слід листочка оцвітини і слід тичинки. Таким чином, у квітковій трубці від її основи розміщуються шість пар провідних пучків – сліди листочків оцвітини та тичинок. У вільних внутрішніх листочках оцвітини їхні сліди формують бічні відгалуження.

Вище формування стовбурових пучків оцвітини й андроцею провідний циліндр трансформується у групу пучків різного розміру, що неупорядковано анастомозують між

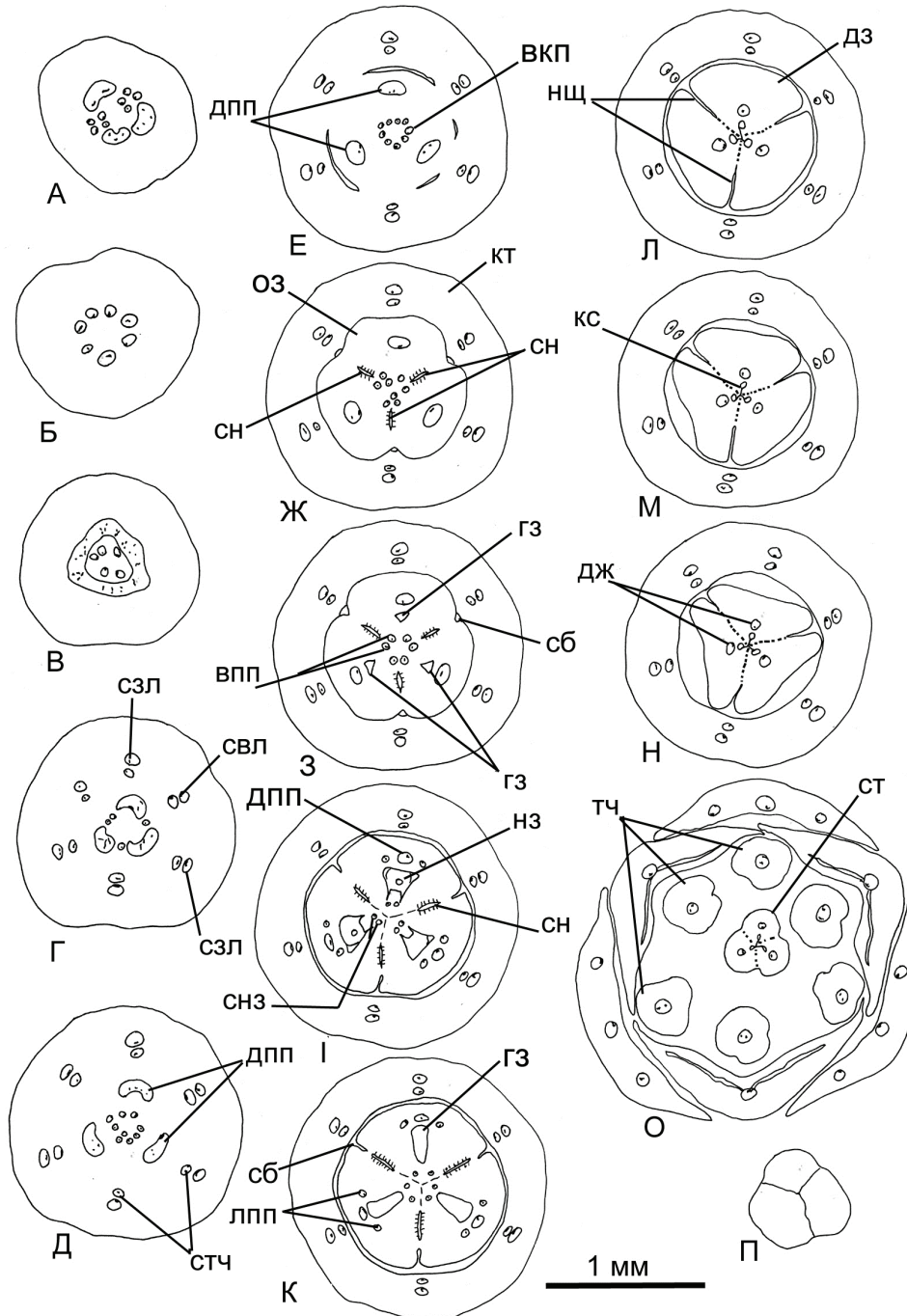


Рис. 3. Серія поперечних зрізів квітки *Sansevieria aethiopica* Thunb. (А–П). Зрізи А–Д проведені на рівні квітконіжки і квітколожа, Е–К – на рівні основи і гнізд зав'язі, Л–О – на рівні даху зав'язі та стовпчика, П – приймочка. Підписи ж такі, як на рис. 2.



собою (рис. 2, Г), а ще вище три із цих пучків відокремлюються від решти як дорзальні пучки плодолистків, залишаючи в центрі трикутне в перерізі сплетіння дрібних пучків, яке ми позначасмо вентральним комплексом, оскільки з нього формуються вентральні пучки плодолистків (рис. 2, Д–З). Дорзальні пучки плодолистків крупні, входять в основу зав'язі та продовжуються у стовпчик. На рівні середини висоти зав'язі від дорзальних пучків відходять по два латеральні пучки, які розміщуються поблизу дорзального, продовжуються вздовж стінки зав'язі та сліпо закінчуються в її даху (рис. 2, І–Л).

На рівні нижньої частини гнізд зав'язі (в гемісинасцидіатній зоні) від зовнішніх частин вентрального комплексу формуються парні вентральні пучки плодолистків, а в центрі залишаються кілька сліпих пучків (рис. 2, Е). Від кожного вентрального пучка відходить гілка у насінний зачаток, а самі вентральні пучки пересуваються назовні в перегородки і зливаються з латеральними пучками у верхній частині зав'язі (рис. 2, Л), іноді залишаючи сліпий пучок. У даху зав'язі дорзальні пучки плодолистків відхиляються горизонтально до центру і входять у стовпчик (рис. 2, М, Н), а латеральні пучки сліпо закінчуються, іноді вони утворюють анастомози з дорзальними пучками.

Провідна система квітки *Sansevieria aethiopica* організована подібним чином, із деякими відмінностями, зазначеними нижче. У верхній частині квітконіжки провідний циліндр має пучкову будову, а вище стає майже суцільним, з кількома пучками у серцевині (рис. 3, А–В), вентральний комплекс пучків менше розвинутий, формується у квітколожі з кількох дрібних пучків, що розміщуються в одному колі з дорзальними пучками плодолистків (рис. 3, Г–Е). В основі зав'язі вентральний комплекс представлений колом зі 7–8 дрібних пучків, 6 із яких продовжуються як вентральні пучки плодолистків, а інші – сліпо закінчуються (рис. 3, Е–З). Латеральні пучки плодолистків відходять дещо нижче прикріплення насінних зачатків (рис. 3, І–К) і ніколи не зливаються з дорзальними пучками. Сліди зовнішніх листочків оцвіттини також відгалужують бічні пучки у вільних лопатях оцвіттини, причому нижче, ніж у внутрішніх листочках (рис. 3, О).

#### Порівняльно-морфологічний аналіз квітки *Dracaena surculosa* та *Sansevieria aethiopica*

Вважається, що для представників роду *Dracaena s. str.* (excl. *Pleomele*, *Sansevieria*) характерні дуже коротка квіткова трубка і розширені посередині тичинкові нитки [13]. У досліджених зразків *Dracaena surculosa* квіткова трубка дорівнює довжині вільних листочків оцвіттини, і за цією ознакою *Dracaena surculosa* не відрізняється від *Sansevieria aethiopica*. Іннервація квіткової трубки, оцвіттини й андроцея у досліджених видів також суттєво подібна. Це підтверджує думку про велику морфологічну подібність родів *Dracaena* та *Sansevieria* [9, 17]. Проте досліджені види відрізняються за розмірами приквіток і числом приквіточок, що вказує на відмінності у будові суцвіття. Зовнішні розміри зав'язі та стовпчика обох видів практично однакові, але приймочка у *Dracaena surculosa* значно меншого розміру, ніж у *Sansevieria aethiopica* (рис. 2, Р, рис. 3, П).

Внутрішня структура гінецея у досліджених видів відрізняється за співвідношенням висоти вертикальних зон за В. Ляйфельнером [12], а також за структурою септального нектарника (рис. 4). Зокрема, висота гемісинасцидіатної та гемісимплекатної зон приблизно співвідносяться як 2:1 в обох видів, але висота синасцидіатної зони варіює, причому вона довша у *Sansevieria aethiopica* з довгим септальним нектарником, який у ній простягається. Виявлено також відмінності між видами за місцем формування каналів стовпчика (субапикально або апікально).

Порівняльний аналіз структури септального нектарника ми проводили відповідно до концепції його вертикальної зональності [4]. У нектарнику *Dracaena surculosa*



можна виділити такі зони, які відповідають різним описовим типам нектарників за Е. Дауманом [10] і Р.Шмідом [15]: зона трипроменевого об'єданого нектарника (коротка, нефункціональна), зона «ліліюїдного» роздільного нектарника з постгенітально замкнутою центральною частиною та зона зовнішнього нектарника (нектарна щілина) (рис. 4, А). У нектарнику *Sansevieria aethiopica* замість зони об'єданого нектарника наявна видовжена (260 мкм) зона роздільного нектарника з конгенітально замкнутими порожнинами нектарника на рівні основи зав'язі та синасцидіатної зони (рис. 4, Б). У *Dracaena surculosa* нектарник розміщений на рівні гемісинасцидіатної, гемісимплатної та асимплатної зон гінецея, а у *Sansevieria aethiopica* – ще також на рівні синасцидіатної зони.

Слід відзначити велику висоту квітколожа (більше висоти гнізд зав'язі) та високі основи і дах зав'язі в обох досліджених видів (рис. 4). Така ж особливість, ще більш виражена, була виявлена раніше у *Sansevieria hyacinthoides* (L.) Druce [5] та *Sansevieria suffruticosa* N. E. Br. [6]. За рахунок існування потовщених основи і даху зав'язі висота септального нектарника (включно з нектарною щілиною) перевищує висоту гнізд зав'язі, особливо це виражено у видів із зоною роздільного нектарника: у *Sansevieria hyacinthoides* – у два рази [5], а у *Sansevieria aethiopica* – у півтора рази (див. таблицю).

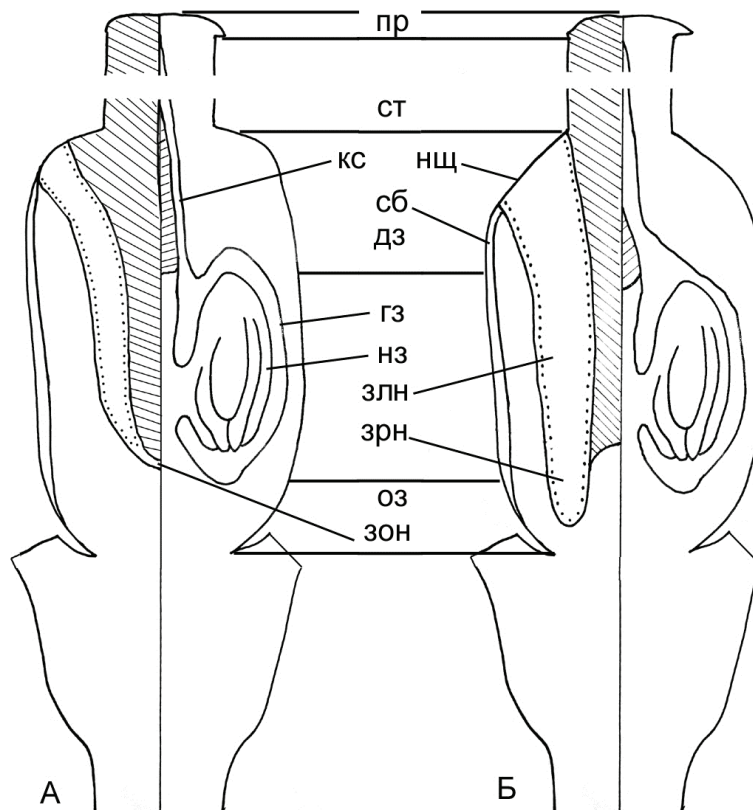


Рис. 4. Вертикальна структура гінецея *Dracaena surculosa* Lindl. (А) та *Sansevieria aethiopica* Thunb. (Б): гз – гніздо зав'язі, дз – дах зав'язі, злн – зона «ліліюїдного» роздільного нектарника, зон – зона об'єданого нектарника, зрн – зона роздільного нектарника, кс – канал стовпчика, нз – насінний зачаток, нщ – нектарна щілина, оз – основа зав'язі, пр – приймочка, сб – септальна борозенка, ст – стовпчик. Ділянки постгенітального зростання плодолистків заштриховані.

Розростання основи і даху зав'язі у представників родів *Dracaena* та *Sansevieria* може бути пов'язане зі збільшенням висоти септального нектарника (у зв'язку із необхідністю збільшення продукції нектару) або зі збільшенням об'єму соковитих тканин у плоді. Плід у *Dracaena* та *Sansevieria* – верхня тонкостінна одно-тринасінна ягода [9], тому ймовірно запасання речовин у потовщених основі та даху зав'язі. Це припущення потребує підтвердження шляхом вивчення морфології та гістології плоду зазначених видів.

Дані В. А. Ван Хіла [16] про розвиток гінцея у *Dracaena surculosa* Lindl. та *Sansevieria zeylanica* Willd., отримані за допомогою методики СЕМ, не дали можливості диференціювати ці види за структурою гінцея. Проте наші дослідження за допомогою вивчення серії поперечних зрізів квітки показали наявність відмінностей у структурі як гінцея, так і септального нектарника зокрема. На поперечних зрізах квітки з'ясувалася також значна подібність структури провідної системи гінцея. Були виявлені відмінності у формуванні вентральних пучків плодолистків, зокрема вентральний комплекс пучків у *Sansevieria aethiopica* менше виражений, ніж у *Dracaena surculosa*. Характерною рисою обидвох досліджених видів є двопучковий слід насінного зачатка, описаний раніше лише для драцен [17], але не наведений для роду *Sansevieria*, в якого нами був виявлений однопучковий слід [5, 6].

Таким чином, морфологічна й анатомічна будова квітки представників родів *Dracaena* і *Sansevieria* виявляє значні риси подібності, проте найбільші відмінності між видами виявлені у внутрішній структурі гінцея та септального нектарника зокрема. Отримані дані є перспективними для подальшого аналізу та використання у філогенетичних дослідженнях представників родів *Dracaena* і *Sansevieria*.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Барыкина Р. П., Веселова Т. Д., Девятков А. Г. и др. Справочник по ботанической микро-технике. Основы и методы. М.: Изд-во Моск. ун-та, 2004. 287 с.
2. Волгин С. А., Тихомиров В. Н. О структурных типах моноциклического синкарпного гинцея покрытосеменных // Бюлл. МОИП. Отд. биол. 1980. Вып. 85 (6). С. 63–74.
3. Иванина Л. И. Семейство драценовые (Dracaenaceae). Жизнь растений. Т. 6. Цветковые растения / под ред. А. Л. Тахтаджяна. М.: Просвещение, 1982. С. 169–177.
4. Одінцова А. В. Вертикальна зональність септальних нектарників однодольних // Сучасна фітоморфологія: матеріали міжнар. конф. учених (Львів, 14–16 травня 2013 р.). 2013. Т. 4. С. 317–318. (<http://phytomorphology.org/PDF/MP4/04317318.pdf>).
5. Фіщук О. С., Одінцова А. В. Мікроморфологія та васкулатура гінцея *Sansevieria hyacinthoides* (L.) Druce (Asparagaceae Juss.) // Сучасна фітоморфологія – Modern Phytomorphology: матеріали міжнар. конф. учених (Львів, 14–16 травня 2013 р.). 2013. Т. 3. С. 245–248. (<http://phytomorphology.org/PDF/MP3/03245248.pdf>).
6. Фіщук О. С., Одінцова А. В. Морфологія та васкулярна анатомія квітки *Sansevieria suffruticosa* N. E. Br. (Asparagaceae Juss.) // Біологічні Студії – *Studia Biologica*. 2013. Т. 7. № 1. С. 139–148.
7. APG III (The Angiosperm Phylogeny Group). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III // *Bot. J. Linn. Soc.* 2009. Vol. 161. P. 105–121.
8. Bogler D. J., Simpson B. B. Phylogeny of Agavaceae based on ITS rDNA sequence variation // *Am. J. Bot.* 1996. Vol. 83. P. 1225–1235.

9. *Bos J. J.* Dracaenaceae / The families and genera of vascular plants. III. Flowering plants: Monocotyledons: Liliaceae (except Orchidaceae). Vol. ed. K. Kubitzki et al. Springer, 1998. P. 238–241.
10. *Daumann E.* Das Blütennektarium der Monocotyledonen unter besonderer Berücksichtigung seiner systematischen und phylogenetischen Bedeutung // Feddes Repert. 1970. Bd.80 (7–8). S. 463–590.
11. *Kim J. H., Kim D. K., Fores T. F.* et al. Molecular phylogenetics of Ruscaceae *sensu lato* and related families (Asparagales) based on plastid and nuclear DNA sequences // Ann. Bot. 2010. Vol. 106. P. 775–780.
12. *Leinfellner W.* Der Bauplan des synkarpen Gynözeums // Österr. Bot. Zeitschr. 1950. Bd. 97(3–5). S. 403–436.
13. *Lu P.-L., Morden C.* Phylogenetics of the plant genera *Dracaena* and *Pleomele* (Asparagaceae) // Botanica Orientalis – J. Plant Sci. 2010. Vol. 7. P. 64–72.
14. *Rudall P. J., Conran J. G., Chase M. W.* Systematics of Ruscaceae / Convallariaceae: a combined morphological and molecular investigation // Bot. J. Linn. Soc. 2000. Vol. 134. P. 73–92.
15. *Schmid R.* Functional interpretations of the morphology and anatomy of septal nectaries // Acta Bot. Neerl. 1985. Vol. 34(1). P. 125–128.
16. *Van Heel W. A.* On the development of some gynoecea with septal nectaries // Blumea. 1988. Vol. 33(2). P. 477–504.
17. *Wunderlich R.* Die Agavaceae Hutchinsons im Lichte ihrer Embryologie, ihres Gynoeceum-, Staubblatt- und Blattbaues // Österr. Bot. Zeitschr. 1950. Bd. 97 (3–5). S. 437–502.

Стаття: надійшла до редакції 31.05.13

доопрацьована 10.07.13

прийнята до друку 09.09.13

**MORPHOLOGY AND VASCULAR ANATOMY  
OF THE FLOWER IN *DRACAENA SURCULOSA* LINDL. AND *SANSEVIERIA  
AETHIOPICA* THUNB. (ASPARAGACEAE JUSS.)**

**O. Fishchuk<sup>1</sup>, A. Odintsova<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Lesya Ukrainka Eastern European National University  
13, Voli Ave., Lutsk 43025, Ukraine  
e-mail: dracaenaok@ukr.net*

<sup>2</sup>*Ivan Franko National University of Lviv  
4, Hrushevskiyi St., Lviv 79005, Ukraine  
e-mail: amorpha@ukr.net*

The floral morphology and vascular anatomy in *Dracaena surculosa* and *Sansevieria aethiopica* have been studied. It was shown that the perianthium and androecium in the studied species have a lot of similar features. In the same time, there were obtained some differences in the inner ovary structure, vertical zonality of septal nectary, and the structure of the ventral complex of bundles. The median ovule is supplied by a pair of bundles in both species. Septal nectary in *Sansevieria aethiopica* is 1,5 times longer than the locules, it is expanded in the ovary base and roof. Both types of septal nectary zonality that are described in studied species were previously revealed in *Sansevieria* species. Investigated features of

the flower confirm the significant morphological resemblance between the genera *Dracaena* and *Sansevieria*.

*Keywords:* *Dracaena surculosa*, *Sansevieria aethiopica*, flower morphology, vascular anatomy, gynoeceium, septal nectary.

**МОРФОЛОГИЯ И ВАСКУЛЯРНАЯ АНАТОМИЯ ЦВЕТКА  
*DRACAENA SURCULOSA* LINDL. И *SANSEVIERIA AETHIOPICA* THUNB.  
(*ASPARAGACEAE* JUSS.)**

**О. Фищук<sup>1</sup>, А. Одинцова<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Восточноевропейский национальный университет имени Леси Украинки  
пр. Воли, 13, Луцк 43025, Украина  
e-mail: dracaenaok@ukr.net*

<sup>2</sup>*Львовский национальный университет имени Ивана Франко  
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина  
e-mail: amorpha@ukr.net*

Изучены морфология и васкулярная анатомия цветков *Dracaena surculosa* и *Sansevieria aethiopica*. Показано, что у исследованных видов околоцветник и андроей характеризуются значительным сходством, однако имеются отличия во внутреннем строении завязи, вертикальной зональности септального нектарника и структуре вентрального комплекса проводящих пучков. Медианные семязпочки иннервируются двумя пучками у обоих видов. Септальный нектарник у *Sansevieria aethiopica* в 1,5 раза превышает длину гнезд завязи и продолжается в основание и крышу завязи. Два типа зональности септального нектарника, выявленные у изученных видов, были описаны нами ранее у представителей рода *Sansevieria*. Установленные особенности строения цветков изученных видов подтверждают большое морфологическое сходство родов *Dracaena* и *Sansevieria*.

*Ключевые слова:* *Dracaena surculosa*, *Sansevieria aethiopica*, морфология цветка, васкулярная анатомия, гинецей, септальный нектарник.

## МІКОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА КОРЕНЕВОЇ ЗОНИ РОСЛИН *CAREX HIRTA* L. У НАФТОЗАБРУДНеноМУ ДЕРНОВО-ПІДЗОЛИСТОМУ ҐРУНТІ

Л. Буньо<sup>1\*</sup>, О. Худик<sup>2</sup>, В. Оліферчук<sup>2</sup>, О. Цвілинюк<sup>1</sup>, О. Терек<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Львівський національний університет імені Івана Франка  
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна  
e-mail: biofr@franko.lviv.ua; bioza@ukr.net

<sup>2</sup>Національний лісотехнічний університет України  
вул. Ген. Чупринки, 103, Львів 79057, Україна  
e-mail: dendro@is.lviv.ua

Досліджено вплив нафтового забруднення на видовий склад мікобіоти кореневої зони рослин *C. hirta*. Виявлено зменшення чисельності більшості видів мікроскопічних грибів за дії нафти. Водночас нафтове забруднення ґрунту сприяло зростанню чисельності меланінвмісних грибів, які можуть використовуватись у біоіндикації техногенно забруднених ґрунтів. Встановлено, що навіть через рік після розливу нафти мікроміцетний комплекс не відновлювався до вихідного стану.

*Ключові слова:* мікроскопічні гриби, нафтове забруднення ґрунту, *Carex hirta* L., ризосфера, ризоплана, едафосфера.

Щороку в Україні у ґрунти потрапляє близько 100–120 млн т ксенобіотиків (важкі метали, пестициди, нафта, нафтопродукти та ін.) [27]. Унаслідок тривалого й інтенсивного антропогенного впливу в ґрунтах розвиваються деградаційні процеси [21], і ґрунти змінюють свої властивості [51].

Одним із основних компонентів ґрунтового біоценозу є мікроскопічні гриби [5, 12, 18]. Ці організми чутливі до змін властивостей ґрунту за дії різних полютантів, характеризуються широким спектром адаптивних властивостей [4, 56] і тому використовуються як тест-об'єкти для вивчення забруднених ґрунтів [16], слугуючи індикаторами їх стану [16, 17]. Відомо також, що мікроскопічні гриби забезпечують початкові етапи біологічної деструкції нафти [45].

Нафта впливає на стан асоціацій мікроміцетів у ґрунтах [10]. Особливого значення набувають дослідження мікроценозних угруповань у кореневій зоні (ризоплана та ризосфера) рослин. У цій зоні деструкція нафти відбувається найбільш інтенсивно завдяки взаємодії рослин з мікоризними грибами [53, 54, 58]. Проте роботи щодо порівняльного аналізу комплексів ґрунтових мікроміцетів в умовах антропогенної трансформації ґрунту в літературі практично відсутні [20], за винятком окремих досліджень [31].

Осока шорсткововолосиста (*Carex hirta* L.) – одна із небагатьох рослин родини осокових, яка утворює мікоризу [38] і використовується у фіторекультиватії нафтозабруднених ґрунтів. Аналіз літературних даних свідчить, що відомості про основні кількісні та якісні характеристики мікобіоти кореневої зони осокових досить обмежені. Тому вивчення особливостей формування мікроміцетних комплексів у *C. hirta* за дії нафти є актуальним і потребує еколого-систематичних досліджень.

### Матеріали та методи

Дослідження проводили на дослідних ділянках у м. Бориславі. У рови (4 x 1 x 0,25 м), дно яких вистелене поліетиленовою плівкою з перфораціями, вносили по 1000 кг

грунту. Вологість ґрунту на час зважування становила 15%. Ділянка з чистим ґрунтом (еталонний ґрунт) слугувала контролем. Ділянка із ґрунтом, штучно забрудненим нафтою, була модельним ґрунтом. Нафту вносили до ґрунту в концентрації 50 г нафти на 1 кг ґрунту. Повторність ділянок двократна. Через 16 днів після внесення нафти (необхідний термін для вивітрювання летких токсичних нафтопродуктів) [35] у ґрунт висаджували вегетативні особини *C. hirta*. Рослини були однакові за віком і розмірами. Вологість ґрунту підтримували у межах 60% від повної вологоємності. Відбір зразків ґрунту здійснювали на 30-ту і 381-шу добу росту рослин *C. hirta*, що відповідає 46 та 411 добам деструкції нафти. Відбір із кореневої зони рослин *C. hirta* на 30-ту і 381-шу добу росту здійснювали з-під рослин однакового віку, які перебували на віргінільному етапі розвитку. Оскільки результати досліджень еталонного ґрунту на 30-ту і 381-шу добу перебували в межах похибки, то контролем слугував тільки ґрунт на 30-ту добу росту рослин *C. hirta*.

Об'єктом досліджень були мікроскопічні гриби кореневої зони (ризоплана і ризосфера) рослин *C. hirta* і міжрядь (едафосфера) еталонного та модельного ґрунтів.

Проби ґрунтів для виділення мікроскопічних грибів із дотриманням стерильності відбирали на глибині 5–8 см (вересень 2010 р.), де акумулюється найбільша кількість полютантів і спостерігається найвищий вміст мікроорганізмів [18]. Відбір ґрунтових зразків здійснювали згідно з існуючими методами [22, 25] та діючими ДСТУ [41].

Для виділення мікроскопічних грибів із ґрунту й ризосфери використовували метод ґрунтового розведення; з ризоплани – метод водних змивів [22, 23]. Ґрунтову суспензію висівали на живильне агаризоване середовище: сусло-агар (СА) із додаванням поліміксину (50 мг на 0,5 л середовища) для гальмування розвитку бактеріальної мікрофлори. Повторність кожного посіву була трикратною. Кількісний і якісний склад грибів визначали за методом Теппер [3]. Тривалість культивування грибів – 4–14 діб за температури 28°C. Чисельність мікроміцетів виражали в одиницях КУО (колонієутворюючі одиниці) на 1 г ґрунту чи маси сирової речовини. Ідентифікацію виділених ізолятів грибів проводили за макро-, мікоморфологічними та фізіолого-культуральними ознаками, користуючись визначниками [1, 13, 24, 28, 33, 34, 43, 44, 46, 48–50, 52, 55].

Систематичну належність мікроміцетів визначали за системою, опублікованою у 9-му виданні „Ainsworth & Bisby's Dictionary of the fungi” [42], а в окремих випадках – згідно з іншими сучасними літературними джерелами [28, 57]. Назви видів проводили у відповідності до бази даних [48]. Латинські назви грибів подані за книгою “Fungi of Ukraine” [47]. Оскільки для більшості грибів родів *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* та *Fusarium* ще не встановлені зв'язки з телеоморфами, то в нашій роботі ми розглядаємо їх у складі групи *Anamorphic fungi*.

Визначення еколого-систематичного аналізу стану мікобіоти ґрунтів проводили з використанням відповідних екологічних показників: частоти трапляння мікроміцетів, коефіцієнта подібності Сьоренсена-Чекановського, коефіцієнта різноманіття Шеннона й індексу домінування Сімпсона [25, 29], а також індексу меланізації мікобіоти [7, 25, 26], які є основними універсальними показниками реакції біоти на різні фактори впливу [29].

Частоту трапляння виду розраховували за формулою:

$$C = A100/B,$$

де  $C$  – частота трапляння, %;  $A$  – кількість зразків, у яких виявлено даний вид;  $B$  – загальна кількість досліджених зразків [23]. Якщо частота трапляння мікроскопічних грибів становить більше 50%, то ці види є домінуючими; 30–50% – ті, що часто трапляються; трапляння на рівні 10% і менше – рідкісні види [7].



Для порівняння ступеня подібності й відмінності списку видів мікроскопічних грибів, виділених із різних ґрунтів, використовували коефіцієнт Сьоренсена-Чекановського [25]:

$$S = 2C/(A+B),$$

де  $S$  – коефіцієнт Сьоренсена-Чекановського;  $C$  – кількість спільних видів грибів для двох пунктів;  $A$  і  $B$  – загальна кількість видів грибів, виділених з першого ( $A$ ) та другого ( $B$ ) пунктів дослідження.

Коефіцієнт біологічного різноманіття (коефіцієнт Шеннона) розраховували за формулою [29]:

$$H = -\sum p_i \log_2 p_i, \quad p_i = n_i/N,$$

де  $H$  – коефіцієнт Шеннона;  $p_i$  – ймовірність значущості для кожного виду гриба в певному типі ґрунту;  $n_i$  – значущість кожного виду гриба в певному типі ґрунту;  $N$  – значущість у всіх видів грибів у певному типі ґрунту. Чим вищий цей коефіцієнт, тим видовий склад мікроскопічних грибів ґрунту є різноманітніший.

Індекс домінування (індекс Сімпсона) розраховували за формулою [29]:

$$C = \sum (n_i/N)^2 = \sum (p_i)^2,$$

де  $C$  – індекс Сімпсона. Позначення аналогічні вищевказаним при розрахунку коефіцієнту Шеннона.

Для порівняння видового складу грибів застосовувався коефіцієнт дискримінації Стургена-Радулеску [39], який розраховували за формулою:

$$P = \frac{X + Y - Z}{X + Y + Z},$$

де  $P$  – коефіцієнт Стургена-Радулеску;  $X$  – кількість видів грибів, які трапляються в чистому ґрунті;  $Y$  – кількість видів грибів, які реєструються в нафтозабрудненому ґрунті, але відсутні в чистому ґрунті;  $Z$  – кількість спільних видів, які знайдено в обох типах ґрунту. Зміна коефіцієнта є допустимою в межах від -1 до +1. При  $\rho = -1$  подібність видових спектрів мікроміцетів є повною, а при  $\rho = +1$  доведено їх повну відмінність (дискримінацію).

Визначення кольору колоній, який необхідний для опису ізолятів, проводили двома способами. За допомогою шкали Бондарцева [2] і за допомогою адитивної моделі RGB. Оцінювали інтенсивність забарвлення за допомогою програми Adobe Photoshop CS5.

Статистичну обробку одержаних результатів проводили з використанням загальноприйнятих методів [15, 40] за допомогою програм Microsoft Excel та Statistica 9.0.

### Результати і їхнє обговорення

Результати досліджень загальної чисельності мікроміцетів кореневої зони та міжряддя дали змогу встановити, що чисельність ґрунтових грибів, виділених із ризоплани рослин *C. hirta*, які росли на нафтозабрудненому ґрунті, перевищувала показники контролю: в 6 разів за терміну деструкції нафти 46 діб і в 2 рази за терміну деструкції нафти 411 діб (табл. 1). У ризосфері рослин *C. hirta* за дії нафти ці показники були нижчими, порівняно з еталонним ґрунтом: у 2,1 (46 доба) та 1,4 (411 доба) рази відповідно. Чисельність грибів у міжрядді нафтозабрудненого ґрунту була в 1,3 разу (46 доба деструкції нафти) та 2,5 разу (411 доба деструкції нафти) більшою щодо міжряддя еталонного ґрунту (табл. 1). Ці дані узгоджуються з літературними відомостями, в яких показано, що комплекс ґрунтових мікроміцетів після короточасного інгібування відповідає на нафтове забруднення збільшенням чисельності й посиленням активності. Водночас розвиваються так звані «спеціалізовані» групи мікроскопічних грибів, які беруть участь у різних етапах утилізації вуглеводнів [45].

Таблиця 1

Загальна чисельність мікроміцетів, виділених із кореневої зони *C. hirta* та едафосфери у дерново-підзолистому ґрунті

Варіанти досліджу	Кількість мікроміцетів, КУО x г <sup>-1</sup> ґрунту x 10 <sup>4</sup>				Кількість мікроміцетів, КУО x г <sup>-1</sup> кореня x 10 <sup>4</sup>	
	міжряддя		ризосфера		ризоплана	
	$\bar{X}$	<i>m</i>	$\bar{X}$	<i>m</i>	$\bar{X}$	<i>m</i>
Еталонний ґрунт	13,0	3,5	12,3	1,6	18,5	0,5
Модельний ґрунт (46 днів деструкції нафти)	17,5	1,0	6,0	1,0	109,3	4,4
Модельний ґрунт (411 доба деструкції нафти)	33,1	1,4	8,5	0,5	34,5	1,0

Аналіз виділених ізолятів мікроскопічних грибів за морфолого-культуральними ознаками показав, що мікоценози ризосфери і ризоплани відрізнялися за родовим і видовим різноманіттям від ґрунту міжряддя як в еталонному ґрунті, так і в модельних ґрунтах (рис. 1).

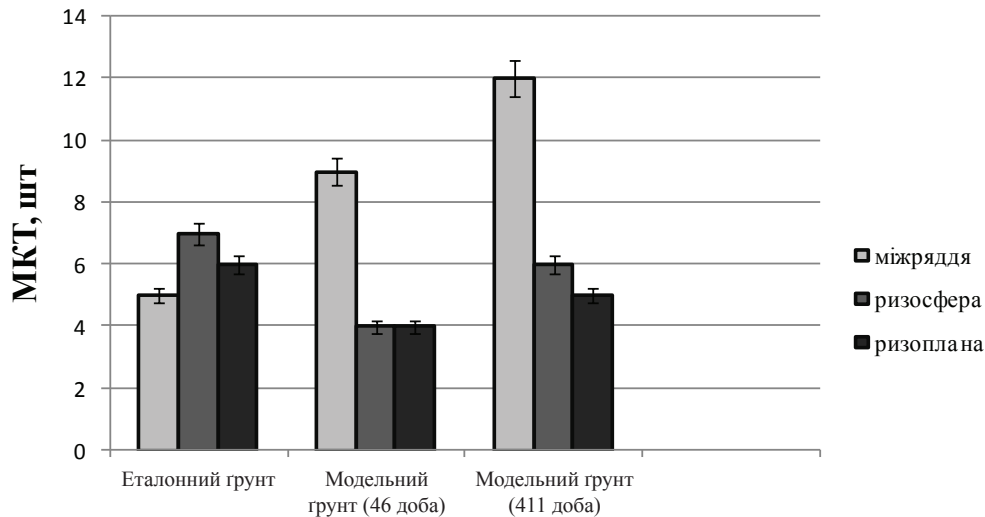


Рис. 1. Співвідношення кількості морфотипів мікроскопічних грибів, виділених із кореневої зони рослин *C. hirta* та едафосфери на 46-ту і 411-ту добу деструкції нафти.

З кореневої зони *C. hirta*, які росли у чистому ґрунті, виділено 13 видів грибів; з нафтозабрудненого ґрунту через 46 та 411 днів деструкції нафти – 8 і 11 видів відповідно. Найбільшим видовим різноманіттям характеризується міжряддя нафтозабрудненого ґрунту на 411-ту добу деструкції нафти (рис. 1). Найменш різноманітним за видовим складом був комплекс грибів ризосфери та ризоплани рослин *C. hirta* із нафтозабрудненого ґрунту з терміном деструкції нафти 46 днів (рис. 1).

Нами було ідентифіковано 26 видів мікроскопічних грибів із 11 родів, які належать до 3 класів: *Zygomycetes*, *Leotiomycetes*, *Hyphomycetes*. Найбагатшим за видовим складом виявився рід *Penicillium* – 10 видів. Його представники становили 38,5% усіх виділених грибів. Три види було ідентифіковано з роду *Aspergillus*, по 2 види з родів *Rhizopus*, *Trichoderma*, *Cladosporium*. Інші роди були представлені одним видом (табл. 2).



Аналіз таксономічного складу мікроскопічних грибів показав, що за впливу нафти відбулися зміни видового складу мікобіоти ґрунтів (табл. 2). Найбільш різноманітними за видовим складом виявилися мікоценози міжрядь нафтозабрудненого ґрунту на 411-ту добу деструкції нафти. Тут ідентифіковано 12 видів (рис. 1). У цих комплексах мікроміцетів за кількістю видів переважали гриби роду *Penicillium* (7 видів), їхня частка становила 58,3% (табл. 2). Можливо, така резистентність грибів *Penicillium* обумовлена наявністю склероціїв – міцеліальних структур, що допомагають їм пристосуватися до несприятливих умов навколишнього середовища; в даному випадку – вплив нафти.

З нафтозабрудненого ґрунту серед виділених видів переважали меланінвмісні гриби (рис. 2). Індекс меланізації мікобіоти (кількість темнозабарвлених грибів) у нафтозабрудненому ґрунті становив 25–34%, що свідчить про меланізацію мікобіоти і може слугувати біоіндикаційним показником забруднення довкілля [6–8, 18, 20, 30].

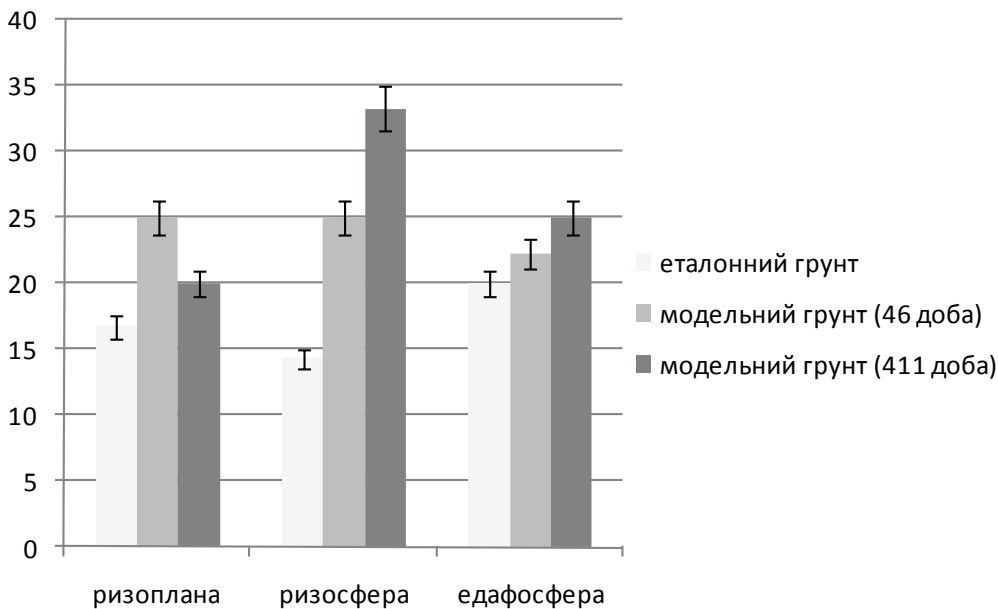


Рис. 2. Частка темнозабарвлених мікроміцетів у складі мікобіоти нафтозабрудненого дерново-підзолистого ґрунту.

Індекс меланізації був найвищим для колоній, які проросли із ґрунту, забрудненого нафтою з терміном деструкції 46 діб (рис. 3). Проростали абсолютно чорні колонії: R=0 G=0 B=0 (C=75% M=68% Y=67% K=90%). В еталонному ґрунті темних колоній не зафіксовано. Для найтемніших колоній RGB становило: R=29 G=54 B=18 (C=77% M=51% Y=92% K=64%) (рис. 3).

Переважаання темнозабарвлених мікроміцетів у нафтозабрудненому ґрунті можливе саме завдяки нагромадженню у них темних пігментів, які мають антиоксидантні властивості й забезпечують захист від посухи і підвищеної інсоляції, що характерне для ґрунтів, забруднених сировою нафтою [37].

Цікавим виявилось спостереження у мікобіоті нафтозабрудненого ґрунту, у складі якої трапляється два види меланінвмісних грибів: *Aspergillus niger* van Tieghem і *Hormoconis resinae* f. *resinae* (Lindau). Перший – патогенний гриб, який може викликати у людини алергічні реакції [32] та глибокі мікози внаслідок вдихання спор або занесення інфекції з

грунтовим пилом унаслідок пошкодження шкірних покривів. Другий представник меланінвмісних грибів – найвідоміший у світі деструктор різних видів пального і нафтопродуктів, який утворює колонії на бензині, гасі тощо. Його знайдено у фільтрах і паливних баках літаків багатьох країн: Великобританії, Данії, Індії, Японії, Нової Зеландії, Бразилії, Каліфорнії тощо [11]. Він вважається основним чинником псування авіапального [14].

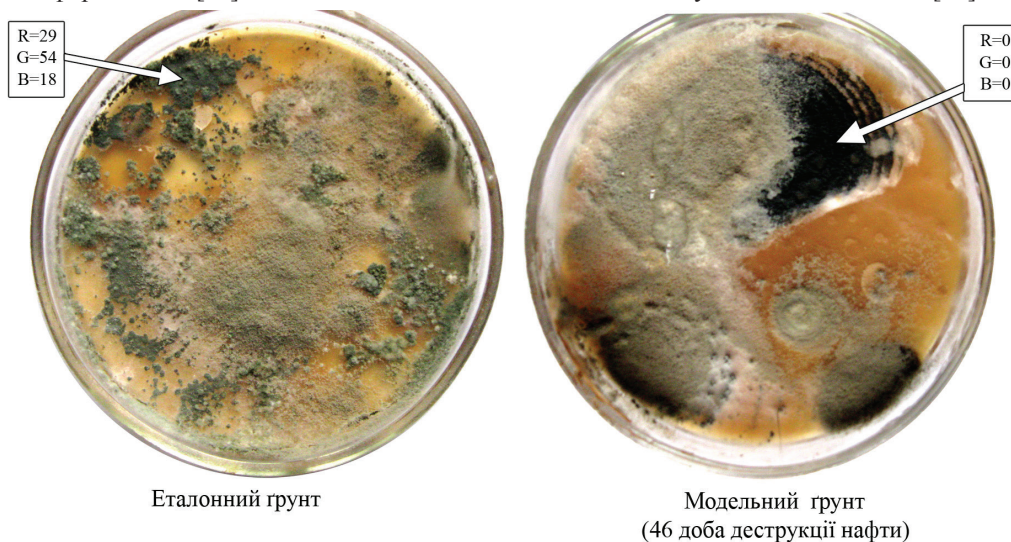


Рис. 3. Колонії мікроміцетів з едафосфери, які проросли з чистого та забрудненого нафтою ґрунтів (46-та доба деструкції нафти).

За шкалою домінантності видів Работнова [36], абсолютні домінанти (частота трапляння виду понад 50%) виявлено у модельному ґрунті з терміном деструкції нафти 411 діб, а також у еталонному ґрунті. У контролі це *Mortierella ramanniana*, *Rhizopus oryzae* (56%), у модельному ґрунті (411 доба деструкції) – *Aureobasidium pullulans* (67%), *Monilia sp.* (56%). У забрудненому нафтою ґрунті через 41 добу деструкції абсолютних домінант не виявлено (табл. 3). Наші дані узгоджуються з літературними [19], у яких вказано, що в забруднених ґрунтах можуть зберігатися лише кілька домінуючих видів, або ж вони зовсім відсутні.

Із домінант другого рангу (частота трапляння від 25 до 50%) у контрольному ґрунті виявлено тільки один вид – *Cladosporium cladosporioides* (44%), у нафтозабрудненому ґрунті як на 46-ту, так і на 411-ту добу деструкції нафти в основному це представники роду *Penicillium* (табл. 3). Для інших видів мікроміцетів частота трапляння не перевищувала 11% (табл. 3).

Аналіз подібності видового складу мікобіоти показав, що найбільшу подібність видової структури мікобіоти еталонного та нафтозабрудненого ґрунтів зафіксовано в зоні ризоплани ( $p=0,67$ ;  $S=0,40$ ) і едафосфери ( $p=0,65$ ;  $S=0,43$ ) на 46-ту добу деструкції нафти (табл. 4). Таку ж подібність ( $p=0,67$ ;  $S=0,40$ ) виявлено в ризосфері рослин *C. hirta* з нафтозабрудненого ґрунту на 46-ту і 411-ту доби деструкції нафти (табл. 4).

Найбільшу відмінність за видовим складом грибів, порівняно з контролем, виявлено у зоні едафосфери із ґрунту, забрудненого нафтою, на 411-ту добу деструкції нафти ( $p=0,89$ ;  $S=0,12$ ) (табл. 4). У цьому зразку (на 411-ту добу деструкції нафти) сформувалась найрізноманітніша мікобіота. Тут було виявлено вид *Monilia sp.*, що не є типовим для ін-

ших зразків (крім міжряддя нафтозабрудненого ґрунту на 46-ту добу деструкції нафти). Даний вид трапляється на ґрунтах, де є надлишок органіки. Оскільки нафта є органічною речовиною, а дерново-підзолистий ґрунт бідний на органічні речовини, – це може бути причиною появи даного виду гриба у нафтозабрудненому ґрунті.

Таблиця 3

Частота трапляння видів мікроскопічних грибів у ґрунті, забрудненому нафтою через 46 і 411 діб деструкції нафти, %

Види мікроміцетів	Еталонний ґрунт	Модельний ґрунт (46 доба)	Модельний ґрунт (411 доба)
<i>Mortierella ramanniana</i>	56	–	–
<i>Rhizopus oryzae</i>	56	–	11
<i>Rhizopus stolonifera</i>	11	–	–
<i>Monilia sp.</i>	–	22	56
<i>Aspergillus fumigatus</i>	–	11	11
<i>Aspergillus niger</i>	–	–	11
<i>Aspergillus sp.</i>	11	–	11
<i>Trichoderma lignorum</i>	11	11	11
<i>Trichoderma viride</i>	22	11	–
<i>Penicillium chrysogenum</i>	–	–	11
<i>Penicillium citrinum</i>	22	–	22
<i>Penicillium digitatum</i>	–	–	11
<i>Penicillium jensen</i>	–	–	11
<i>Penicillium ochraceus</i>	–	11	11
<i>Penicillium sp.</i>	11	33	33
<i>Penicillium gray</i>	–	11	–
<i>Penicillium ochro-chloron</i>	11	33	11
<i>Penicillium notatum</i>	–	33	44
<i>Penicillium rozeo-purpureum</i>	–	22	–
<i>Fusarium oxysporum</i>	22	11	11
<i>Aureobasidium pullulans</i>	–	11	67
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	44	33	–
<i>Cladosporium resiniae</i>	–	22	–
<i>Humicola grisea</i>	–	–	11
<i>Torula herbarum</i>	–	–	11

Таблиця 4

Порівняння видового складу мікроміцетів, виділених з еталонного та модельного дерново-підзолистого ґрунтів на різній відстані від кореня *C. hirta*, за коефіцієнтами Стугрена-Радулеску (р) та Сьоренсена-Чекановського (S)

Варіанти дослідів	Модельний ґрунт (46 доба)			Модельний ґрунт (411 доба)		
	ризоплана	ризосфера	міжряддя	ризоплана	ризосфера	міжряддя
Еталонний ґрунт	0.67/0,40	0.83/0,18	0.65/0,43	0.83/0,18	0.86/0,15	0.89/0,12
Модельний ґрунт (46 доба)				0.80/0,22	0.67/0,40	0.75/0,29

**Примітка.** Чисельник: коефіцієнт Стугрена-Радулеску (р); знаменник: коефіцієнт Сьоренсена-Чекановського (S).

Коефіцієнти подібності Сьоренсена-Чекановського для всіх зразків є досить низькими ( $S < 0,5$ ). За Марфеніною [19], ґрунти з невисоким вмістом нафти мають низькі коефіцієнти подібності Сьоренсена-Чекановського.

Індекси видової різноманітності мікроміцетів показують, що найрізноманітніший видовий склад характерний для мікроміцетів міжряддя модельних ґрунтів із терміном



деструкції 411 діб (H=3,17) та з терміном деструкції 46 діб (H=3,12). Найменш різноманітний видовий склад мікроміцетів був у ризосфері нафтозабрудненого ґрунту на 46-ту добу деструкції нафти (H=1,72) (табл. 5).

Таблиця 5

Індекси різноманіття мікроскопічних грибів у нафтозабрудненому ґрунті за дії росту рослин *C. hirta*

Проби ґрунту	Місце відбору проб	Коефіцієнт Шеннона (H)	Індекс Сімпсона (C)
Еталонний ґрунт	Едафосфера	2,04	0,278
	Ризосфера	2,66	0,159
	Ризоплана	2,30	0,229
Модельний ґрунт (46 доба деструкції нафти)	Едафосфера	3,12	0,118
	Ризосфера	1,72	0,333
	Ризоплана	1,92	0,231
Модельний ґрунт (411 доба деструкції нафти)	Едафосфера	3,17	0,169
	Ризосфера	2,51	0,183
	Ризоплана	1,97	0,298

Коефіцієнт Шеннона також виявився досить низьким у всіх варіантах, крім едафосфери нафтозабрудненого ґрунту. Низькі показники у коефіцієнта Шеннона характерні для ґрунтів, які зазнають постійного хронічного нафтового навантаження. Низькі значення коефіцієнта Шеннона виявили також А. В. Зачиняєва, Є. В. Лебедева [9] та О. Є. Марфеніна для дерново-підзолистих ґрунтів, забруднених важкими металами [19].

Варто відзначити, що при меншому терміні деструкції нафти значення коефіцієнта Шеннона (H) збільшувались, а індексу Сімпсона (C) – знижувались (табл. 5): H=3,17 і C=0,169; H=3,12 і C=0,118. За О. Є. Марфеніною та Т. Г. Мірчик [17], значення коефіцієнта Шеннона за антропогенного впливу знижується, а індекс Сімпсона збільшується.

Нафтове забруднення призвело до перебудови мікоценозу ґрунту. Отримані результати дають змогу констатувати, що у ґрунтах, які відрізняються за терміном деструкції нафти, виявлено низку спільних видів. Водночас подібність між мікобіотою ґрунту міжрядь, ризосфери і ризоплани рослин *C. hirta* досить незначна.

Забруднення ґрунту нафтою призвело до збільшення чисельності мікроміцетів і їхнього видового різноманіття в едафосфері. Таке збільшення відбувалося за рахунок мікроміцетів родів *Penicillium* і темнозабарвлених видів, які можуть слугувати індикаторами забруднення дерново-підзолистого ґрунту нафтою.

Нафта мала токсичний вплив на мікроміцети. Навіть через рік після вилливу нафти мікроміцетний комплекс не відновився до вихідного стану.

Коренева зона рослин *C. hirta* не сприяла виживанню мікроскопічних грибів за дії нафти. Навпаки, кількість видів у цій зоні зменшувалася порівняно з едафосферою.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Білай В. І., Коваль Э. З. Аспергиллы. К.: Наук. думка, 1988. 204 с.
2. Бондарцев А. С. Шкала цветов. М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1954. 28 с.
3. Векірчик К. М. Практикум з мікробіології: навч. посібник для студ. вищих навч. закладів. К.: Либідь, 2001. 189 с.
4. Власов Д. Ю. Микромицеты в литобиотных сообществах: разнообразие, экология, эволюция, значения: автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.24. СПб., 2008. 36 с.

5. Головченко А. В., Полянская А. В. Влияние нефти на численность, биомассу и жизнеспособность грибов в верховых торфяниках // Микробиология. 2001. № 1. С. 111–117.
6. Дяченко А. І., Гуца М. І., Шиліна Ю. В. Перспективи використання фітопатогенних мікроміцетів як тест-об'єктів для моніторингу стану навколишнього середовища // Наукові праці ІКБГІ. Т. 53. Вип. 40. 2006. С. 65–69.
7. Жданова Н. М. Моніторинг міксоміцетів при визначенні санітарного стану ґрунтів / Агроекологічний моніторинг та паспортизація сільськогосподарських земель. К.: Фітосоціоцентр, 2002. С. 146–152.
8. Жданова Н. Н., Василевская А. И. Меланинсодержащие грибы в экстремальных условиях. К.: Наук. думка, 1988. 196 с.
9. Зачиняева А. В., Лебедева Е. В., Ярмишко М. А. и др. Микологическая индикация почв Череповецкого промышленного района // Микология и фитопатология. 2006. Т. 40. Вып. 1. С. 39–46.
10. Иванов А. В., Тафеева Е. А., Давлетова Н. Х. Почва и эколого-гигиеническая безопасность на территории нефтедобывающих районов Республики Татарстан. Казань, 2007. 137 с.
11. Каневская И. Г. Биологическое повреждение промышленных материалов. Л.: Наука, 1984. 232 с.
12. Киреева Н. А., Мифтахова А. М., Бакаева М. Д. и др. Комплексы почвенных микромицетов в условиях техногенеза. Уфа: Гилем, 2005. 360 с.
13. Кириленко Т. С. Определитель почвенных сумчатых грибов. К.: Наук. думка, 1978. 264 с.
14. Коваль Э. З., Сидоренко Л. П. Микодеструкторы промышленных материалов. Л.: Наука, 1989. 192 с.
15. Лакин Г. Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1990. 352 с.
16. Лебедева Е. В. Микромицеты – индикаторы техногенного загрязнения почв // Микология и криптогамная ботаника в России: традиции и современность: Тр. междунар. конф. СПб.: СПбХФА, 2000. С. 173–176.
17. Марфенина О. Е., Мирчик Т. Г. Микроскопические грибы при антропогенном воздействии на почву // Почвоведение. 1988. № 9. С. 107–112.
18. Марфенина О. Е. Антропогенная экология почвенных грибов. М.: Медицина для всех, 2005а. 196 с.
19. Марфенина О. Е. Реакция микроскопических грибов на загрязнение почв тяжелыми металлами // Биол. науки. 1989. № 9. С. 89–93.
20. Марфенина О. Е. Микроскопические грибы в антропогенно нарушенных почвах: результаты исследований и нерешенные вопросы // Экология и биология почв: материалы Междунар. науч. конф. Ростов-на-Дону, 2005б. С. 304–306.
21. Медведев В. В. Мониторинг почв Украины. Харьков: Антиква, 2002. 428 с.
22. Методы почвенной микробиологии и биохимии / под ред. Д. Г. Звягинцева. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1991. 304 с.
23. Методы экспериментальной микологии грибов / под ред. В. И. Билай. К.: Наук. думка, 1982. 432 с.
24. Милько А. А. Определитель мукоральных грибов. К.: Наук. думка, 1974. 304 с.
25. Мирчинк Т. Г. Почвенная микология. М.: МГУ, 1988. 220 с.
26. Мэгарран Э. Экологическое разнообразие и его измерение. М.: Мир, 1992. 182 с.

27. Національна доповідь про стан навколишнього природного середовища в Україні у 2010 році / наук. ред. Ю.І. Бистрякова, А.І. Сташук. К.: Центр екологічної освіти та інформації, 2011. 254 с.
28. Новое в систематике и номенклатуре грибов / под ред. Ю. Т. Дьякова, Ю. В. Сергеева. М.: Нац. академия микологии; Медицина для всех, 2003. 496 с.
29. *Одум Ю.* Экология: в 2-х т. / пер. с англ. Т. 2. М.: Мир, 1986. 376 с.
30. *Олишевская С. В., Маничев В. И., Захарченко В. А.* и др. Влияние тяжелых металлов на микобиоту почв некоторых промышленных регионов Украины // Микология и фитопатология. 2006. Т. 40. № 2. С. 133–142.
31. *Олишевська С. В.* Еколого-систематична характеристика та біологічна активність мікроскопічних грибів, виділених із забруднених важкими металами ґрунтів України: дис. ... канд. біол. наук: 03.00.07. К., 2005. 192 с.
32. Определитель патогенных и условнопатогенных грибов / Д. Саттон, А. Фотергилл, М. Ринальди; пер. с англ.; под ред. И.Р. Дорожковой. М.: Мир, 2001. 486 с.
33. *Пидопличко Н. М.* Грибы – паразиты культурных растений: определитель. К.: Наук. думка, 1978. Т.2. 299 с.
34. *Пидопличко Н. М.* Пеницилли. К.: Наук. думка, 1972. 150 с.
35. *Пиковский Ю. И., Геннадиев А. Н., Чернявский С. С.* и др. Проблема диагностики и нормирования загрязнения почв нефтью и нефтепродуктами // Почвоведение. 2003. № 9. С. 1132–1140.
36. *Работнов Т. А.* Фитоценология. М.: Изд-во МГУ, 1978. 384 с.
37. *Свистова И. Д., Щербаков А. П., Корецкая И. И.* и др. Накопление токсичных видов микроскопических грибов в городских почвах // Гигиена и санитария. 2003. № 5. С. 54–57.
38. *Цвілинюк О. М., Буньо Л. В., Карпин О. В., Терек О. І.* Мікориза у *Carex hirta* L. як одна із умов виживання в нафтозабрудненому ґрунті // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2012. Вип. 60. С. 320–326.
39. *Шеляг-Сосонко Ю. Р.* Ліси України: біорізноманіття та збереження // Укр. ботан. журнал. 2001. Вип. 58. № 5. С. 519–529.
40. *Шмид В. М.* Математические методы в ботанике. Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1984. 288 с.
41. Якість ґрунту. Відбір проб: ДСТУ ISO 10381-6-2001. К.: Держспоживстандарт України, 2006. 18 с.
42. Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi. 9<sup>th</sup> ed. / P.M. Kirk, P.F. Cannon, J.C. David, J.A. Stalpers. Wallingford (UK): CAB International, 2001. 655 p.
43. *Bissett J.* A revision of the genus *Trichoderma* (II). Intra-generic classification // Can. J. Bot. 1991. Vol. 69. P. 2357–2372.
44. *Booth C.* The Genus *Fusarium*. Kew: Common. Mycol. Inst., 1971. 237 p.
45. *Chi-Yuan Fanand, Krishnamurthy S.* Enzymes for Enhancing Bioremediation of petroleum-contaminated soils // J. Air & Waste Management Association. 1995. Vol. 45. Iss. 6. P. 453.
46. *Domsch K. H., Gams W., Anderson T. H.* Compendium of Soil Fungi. (2nd ed.). Lubrecht & Cramer Ltd. 2007. 322 p.
47. Fungi of Ukraine: A preliminary Checklist / Ed. by D.W. Minter & I.O. Dudka. CAB International & M. G. Kholodny Institute of Botany, 1996. 361 p.
48. <http://indexfungorum.org>.
49. Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification / Ed. by R. A. Samson, J. I. Pitt. Netherlands, Australia, 2000. 510 p.

50. Introduction to Food and Airborne Fungi / Ed. by R.A. Samson, E.S. Hoekstra, J.C. Frisvad. Utrecht.: Centralbureau voor Schimmelcultures. Seventh edition. 2004. 384 p.
51. Kucharski J., Jastrzebska E. Effect of heating oil on the activity of soil enzymes and the yield of yellow lupine // Plant Soil Environ. 2006. Vol. 52. N 5. P. 220–226.
52. List of Cultures. Fungi (filamentous fungi and yeasts). Bacteria. Plasmids. Phages. 35<sup>th</sup> edition. Baarn: Institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences. 2001. 365 p.
53. Lupwayi N. Z., Rice W.A., Clayton G. W. Soil microbial density and community structure under wheat as influenced by tillage and crop rotation // Soil Biol. Biochem. 1998. N 30. P. 1733–1741.
54. Mahaffee W. F., Kloepper J. W. Temporal changes in the bacterial communities of soil rhizosphere and endorhiza associated with field-grown cucumber (*Cucumis sativus* L.) // Microb. Ecol. 1997. N 34. P. 210–223.
55. Modern concept in *Penicillium* and *Aspergillus* classification / Ed. by R.A. Samson, J.I. Pitt. New York: Plenum Press, 1990. 460 p.
56. Rosario de Filipe Anton Ma. Interacciones microorganismos-suelo-planta en la preservación del Medio Ambiente y la Salud // An. Real acad.nac.farm. 2004. Vol. 70. N 3. P. 743–776.
57. Samson R. A., Pitt J. I. Integration of Modern Taxonomic Methods for *Penicillium* and *Aspergillus* Classification. Harwood Academic Publishers, Amsterdam, The Netherlands. 2000. 510 p.
58. Yang Ch-H., Crowley D. E. Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status // Appl. Environ. Microbiol. 2000. Vol. 66. N 1. P. 345–351.

Стаття: надійшла до редакції 01.06.13

доопрацьована 03.10.13

прийнята до друку 07.10.13

## MYCOLOGICAL CHARACTERISTIC OF ROOT AREA OF PLANTS *CAREX HIRTA* L. IN OIL-POLLUTED SOD-PODZOLIC SOIL

L. Bunio<sup>1</sup>, O. Hudyk<sup>2</sup>, V. Oliferchuk<sup>2</sup>, O. Tsvilnyuk<sup>1</sup>, O. Terek<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ivan Franko National University of Lviv  
4, Hrushevskiyi St., Lviv 79005, Ukraine  
e-mail: bioza@ukr.net

<sup>2</sup>National Forestry University of Ukraine  
103, Gen. Chuprynky St., Lviv 79057, Ukraine  
e-mail: dendro@is.lviv.ua

Influence of oil pollution on specific structure of microbiota of root zone of plants *C. hirta* has investigated. Reduction of number of the majority of kinds of microscopic fungi at oil influence is revealed. At the same time, oil pollution of a soil promoted number increase melanin fungi which can be used in bioindication the anthropogenic polluted soils. It is established, that even in a year after oil flood *Micromicetes* complex was not restored to an initial condition.

**Keywords:** fungi, ground oil pollution, *Carex hirta* L., rhizosphere, rhizoplane, edaphosphere.

**МИКОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА  
КОРНЕВОЙ ОБЛАСТИ РАСТЕНИЙ *CAREX HIRTA* L.  
В НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННОЙ ДЕРНОВО-ПОДЗОЛИСТОЙ ПОЧВЕ**

**Л. Буньо<sup>1</sup>, О. Худик<sup>2</sup>, В. Олиферчук<sup>2</sup>, О. Цвильнюк<sup>1</sup>, О. Терек<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Львовский национальный университет имени Ивана Франко  
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина  
e-mail: bioza@ukr.net

<sup>2</sup>Национальный лесотехнический университет Украины  
ул. ген. Чупринки, 103, Львов 79057, Украина  
e-mail: dendro@is.lviv.ua

Исследовано влияние нефтяного загрязнения на видовой состав микобиоты корневой зоны растений *C. hirta*. Выявлено уменьшение численности большинства видов микроскопических грибов под воздействием нефти. Вместе с тем, нефтяное загрязнение почвы содействовало возрастанию численности меланинсодержащих грибов, которые могут использоваться в биоиндикации техногенно загрязненных почв. Установлено, что даже через год после разлива нефти микромицетный комплекс не восстанавливался до исходного состояния.

*Ключевые слова:* микроскопические грибы, нефтяное загрязнение почвы, *Carex hirta* L., ризосфера, ризоплана, эдафосфера.

## ВИДОВИЙ СКЛАД ПЕРЕЛОГОВИХ УГРУПОВАНЬ ПОЧАТКОВИХ СТАДІЙ СУКЦЕСІЇ НА ПІВНІЧНОМУ СХОДІ ЛУГАНСЬКОЇ ОБЛАСТІ

Л. Боровик

*Луганський природний заповідник НАН України  
вул. Рубіжна, 95, смт Станиця Луганська, Луганська обл. 93602, Україна  
e-mail: borovyk@mail.ru*

Досліджений видовий склад степових перелогів на бур'янистій стадії сукцесії. Проналізовані систематична, еколого-біоморфологічна структура ценофлори, склад синантропної фракції ценофлори, видове багатство угруповань. Встановлено, що ценофлора молодих перелогів налічує 184 види 32 родин, серед яких значна частка багаторічників (50,6%), рудерантів (54,4%) і видів широкої екологічної амплітуди (70,6%). Для перелогів віком 1–3 роки характерне переважання малорічників (64%) і рудерантів (73%). На перелогах 5–7 років відбувається значне розширення видового складу, переважно за рахунок степантів. Для ранніх стадій сукцесії, залежно від кліматичних умов, характерне закріплення різноманітних видів – рудерантів, степантів, пратантів, сильвантів, палюдантів і культивених видів.

*Ключові слова:* перелоги, відновлення степів, ценофлора, систематичний, еколого-біоморфологічний спектр, видове багатство.

Загальна схема поновлення степу на перелогах складається з низки послідовних стадій: бур'яниста → кореневищно-злакова → дернинно-злакова → стадія вторинної цілини [14]. Вивчення сукцесій на перелогах завжди було обумовлене наявністю експериментальних ділянок, що пов'язано зі системою господарчого використання ріллі, яке значно мінялося у процесі освоєння степу. Тому, незважаючи на довгий період від виходу перших робіт, механізми сукцесії в цілому залишаються погано дослідженими [25].

Молоді перелоги відповідають бур'янистій стадії сукцесії. Тривалість стадії становить 2–3 роки, але описані випадки затримки на бур'янистій стадії [16, 20]. В угрупованнях молодих перелогів на бур'янистій стадії сукцесії переважають рудеральні малорічники. Кількість багаторічників зростає у північних регіонах, тобто в умовах кращого зволоження, а також при поганій обробці ріллі. Процес відновлення степових угруповань на цій стадії проявляється у проникненні перших степових видів [10, 16, 20]. Підкреслюється, що склад угруповань дуже різноманітний і тісно пов'язаний з використанням перелогів [10, 16]. Виявлені загальні особливості динаміки перелогів підтверджуються сучасними спостереженнями [6, 7, 15, 21, 26].

Флористичний комплекс перелогів, порівняно з іншими антропогенними ектопами, характеризується багатим і специфічним видовим складом за рахунок видів місцевої флори [23]. Виявлення зонально-регіональних особливостей флористичного комплексу перелогів – одне з найважливіших завдань досліджень.

Відомості про регіональні особливості поновлення перелогів на місці Старобільських степів стислі та стосуються періоду 1940–50-х рр. [2, 11]. Деякі дані стосовно особливостей демутації перелогів регіону вже аналізувалися автором [3–5]. Було встановлено, що тривалість бур'янистої стадії становить до десяти років і обумовлена характером вихідного забур'янення агрофітоценозів (наявністю або відсутністю *Elytrigia repens* (L.) Nevski). На ділянках зі значним забур'яненням *Elytrigia repens* у перший рік формуються пірийні



перелоги. Основними домінантами угруповань бур'янистої стадії є *Artemisia absinthium* L., *Carduus acanthoides* L., *Cirsium setosum* (Willd.) Besser. Завдання цієї роботи – дати характеристику складу ценофлори бур'янистої стадії, охарактеризувати особливості її динаміки на ранніх стадіях сукцесії, проаналізувати динаміку таких загальних показників стадії, як видове багатство, активність видів.

#### Матеріали та методи

Район досліджень розташований на півночі степової зони, на південно-східних відрогах Середньоруської височини. За фізико-географічним районуванням України належить до Степової зони, Північностепової підзони, Задонецько-Донського краю, Старобільської схилово-височинної області [12]. Середня річна температура повітря становить 7,2°, річна сума опадів – 400–500 мм. Ґрунти представлені чорноземами звичайними середньоглибокими, середньо- та малогумусними на лесовидних суглинках. На схилах і на еродованих ділянках вододілів наявні різноманітні відмінності ґрунтів, пов'язані з близьким заляганням корінних порід (крейди, пісків, засоленних порід). Вихідною рослинністю вододілів і схилів є багаторізотравно-дерниннозлакові степи [8].

Протягом 2005–2011 рр. була досліджена рослинність на 12 ділянках молодих перелогів, які розташовані в межах Міловського та Біловодського районів Луганської області. На молодих перелогах (сукцесійним віком до 10 років) було виконано 183 стандартні геоботанічні описи на арових площадках за загальноприйнятою методикою [22]. Для біоморфологічної та еколого-ценотичної характеристики видів використано низку літературних джерел [17, 19, 23, 24] і власні спостереження.

Ценофлора розглядається як флористичний склад однорідних у ценотичному аспекті угруповань [9], у цьому разі – за віком демурації перелогів. Аналіз ценофлори проведений за стандартними показниками [13], які дають змогу охарактеризувати процес динаміки видового складу в ході сукцесії – систематичною структурою, біоморфічною, екологічною та ценоморфічною. Характеризується склад синантропної фракції ценофлори. Аналіз екологічних груп видів проведений за основним фактором зміни умов – зволоження ґрунту, також виділяються види, пов'язані зі специфічними ґрунтами. При аналізі ценотичної активності видів як ценотично значимі розглядаються види з постійністю класів 3–5 і покриттям класів 1–5 (1 та більше %). Класи покриття виділені за логарифмічною шкалою – 0 – менше 1%, 1-й – 1–5%, 2-й – 6–15%, 3-й – 16–25%, 4-й – 26–49%, 5-й – >50%, постійність (константність) видів оцінювалася за п'ятибальною шкалою з рівними інтервалами. Назви рослин подані за роботою С. Л. Мосякіна та М. М. Федорончука [27].

#### Результати і їхнє обговорення

Ценофлора досліджених перелогових угруповань бур'янистої стадії налічує 184 види, які належать до 32 родин (табл. 1). Більш ніж двома видами представлені 12 родин, у 3-х провідних родин представлено 47,3% видів, у 10-ти – 81,5%. Характерна висока частка родин, до яких належить значне число рудеральних видів – *Asteraceae* та *Brassicaceae*.

У складі ценофлори за чисельністю малорічні трави незначно переважають багаторічні і становлять відповідно 48,9% та 43,5% (табл. 2). Разом із деревночагарниковими видами (7,1%) багаторічники становлять більшість – 50,6%. Така значна частка багаторічників зумовлена низкою факторів – значним вихідним забур'яненням багаторічниками агрофітоценозів [5], тривалістю бур'янистої стадії, а також тим, що початок сукцесії на більшості досліджених ділянок припав на дуже вологі роки, що сприяло поширенню багаторічників. Розвиток рудеральних багаторічників пригнічується випасом, але він відсутній на більшості досліджених ділянок.

Таблиця 1

Систематичний спектр провідних родин перелогових угруповань ранніх стадій сукцесії

Родини	Число видів за віком сукцесії, років				Загальне число видів	
	1–3		5–7		Абсолютне	%
	Абсолютне	%	Абсолютне	%		
<i>Asteraceae</i>	30	30	46	26,4	47	25,5
<i>Poaceae</i>	13	13	20	11,5	23	12,5
<i>Brassicaceae</i>	8	8	15	8,6	17	9,2
<i>Fabaceae</i>	7	7	15	8,6	15	8,2
<i>Lamiaceae</i>	6	6	13	7,5	13	7,1
<i>Rosaceae</i>	4	4	10	5,7	10	5,4
<i>Apiaceae</i>	4	4	6	3,5	7	3,8
<i>Boraginaceae</i>	4	4	7	4,0	7	3,8
<i>Scrophulariaceae</i>	3	3	6	3,5	6	3,3
<i>Caryophyllaceae</i>	3	3	5	2,9	5	2,7
<i>Polygonaceae</i>	3	3	5	2,9	5	2,7
<i>Chenopodiaceae</i>	4	4	4	2,3	4	2,2
Інші	11	11	22	12,6	25	13,6
Всього	100	100	173	100	184	100

Таблиця 2

Еколого-біоморфологічний спектр ценофлори перелогів на початкових стадіях сукцесії

Еко-біоморфи	Число видів (%) за віком сукцесії, років		Загальне число видів	
	1–3	5–7	Абсолютне	%
<b>Основні біоморфи</b>				
Дерева та кущі	3	7,5	13	7,1
Напівкущики	-	0,6	1	0,5
Багаторічні трави	33	45,4	80	43,5
<b>Біоморфи за здатністю до вегетативного розмноження</b>				
Малорічні трави	64	46,5	90	48,9
Вегетативно-рухливі види	16	19,5	34	18,5
Вегетативно-малорухливі види	8	13,2	24	13
Вегетативно-нерухливі види	76	67,3	126	68,5
<b>Гігроморфи</b>				
Гігрофіти	-	1,1	2	1,1
Мезофіти	13	11,5	23	12,5
Ксеромезофіти	49	39,1	74	40,2
Мезоксерофіти	27	31,6	56	30,4
Ксерофіти	11	16,7	29	15,8
<b>Ценоморфи</b>				
Палюданти	-	1,1	2	1,1
Пратанти	3	11,5	20	10,8
Степанти	12	22,4	39	21,2
Сільванти	4	6,9	12	6,5
Рудеранти	73	54,1	100	54,4
Культигенні	8	4	11	6

Малорічні трави (90 видів) переважно представлені однорічниками (61 вид, 67,8%), з яких облігатні однорічники – 42 види (46,7%), дворічники налічують 29 видів (32,2%). Серед багаторічників 85,1% – трави, 13,8% – дерева та кущі. Напівкущики представлені тільки одним видом (*Artemisia austriaca* Jacq.). З багаторічних трав 80 видів (38,8%) – вегетативно-рухливі (кореневищні, коренепаросткові та деякі повзучі), вегетативно-малорухливі – 23,7% (короткокореневищні), вегетативно-нерухливі – 37,5%.

З деревно-чагарникових видів (13 видів) сім – адвентивні (*Acer negundo* L., *Cerasus mahaleb* (L.) Mill., *Fraxinus lanceolata* Borkh., *Robinia pseudoacacia* L., *Ulmus pumila*, *Elaeagnus angustifolia* L., *Armeniaca vulgaris* Lam.) та 6 – автохтонні (*Prunus stepposa* Kotov, *Rosa corymbifera* Borkh., *Ulmus suberosa* Moench, *Pyrus communis* L., *Acer tataricum* L.,

*Crataegus curvisepala* Lindm.). Три види – вегетативно рухливі (коренепаросткові), десять видів – поширюються винятково за рахунок насіннєвого розмноження.

За здатністю до вегетативного розмноження на перелогах переважають вегетативно-нерухливі види (68,5%), за рахунок значного числа рудеральних малорічників. За відношенням до фактора зволоження ґрунту абсолютну більшість становлять види широкої екологічної амплітуди – ксеромезофіти та мезоксерофіти разом налічують 70,6%. Ксерофіти і мезофіти майже дорівнюють за числом (15,8 та 12,5%), що вказує на поширення на початкових стадіях сукцесії видів різноманітних за екологією з переважанням видів широкої амплітуди.

За ценоморфами флористичний склад угруповань ранніх стадій різноманітний – переважають рудеранти (54,4%). Крім степантів (21,2%), значне число складають види інших ценотичних груп – пратанти (10,8%), сільванти (6,5%) та культигенні види (6%).

Група рудерантів включає 100 видів. Серед них переважають малорічники – 77 видів (однорічники – 52 види, дворічники – 25 видів), багаторічні рудеральні трави налічують 23 види. Переважають вегетативно-нерухливі види (77%), вегетативно-рухливі види становлять 15%. Ксерофітні рудеранти включають 12% (*Cirsium ucranicum* Besser, *Salvia aethiopsis* L., *Galium humifusum* M.Bieb. тощо), мезофітні – 17% (*Echinochloa crusgalli* (L.) P. Beauv., *Cichorium intybus* L., *Plantago major* L. тощо), більшість (71%) становлять види широкої екологічної амплітуди. Сеgetальні рудеранти представлені 48 видами, більшість (52) становлять рудеранти широкої ценотичної амплітуди, характерні для різноманітних порушених екоотопів.

Степанти налічують 39 видів, із них тільки 6 видів (15,4%) є типовими степантами, більш численні види широкої ценотичної амплітуди характерні для степових угруповань, але також поширені на сухих луках, у чагарниках (17 видів, 43,6%). Рудерально-степові види, характерні для випасених степів, враховуючи види широкої ценотичної амплітуди, становлять 21 вид (53,8%). Незважаючи на значну частку у видовому складі степантів, їх ценотична роль незначна, постійність і покриття більшості видів низькі. Степові види наявні на ділянках зі сприятливими умовами для занесення діаспор, якщо перелоги затиснуті між лісосмугами та не мають безпосередніх меж із цілиними ділянками, то число степових видів суттєво падає, на таких ділянках наявні деякі синантропні степанти.

Серед пратантів (20 видів) типові лучні види представлені незначним числом (*Festuca pratensis* Huds., *Phleum pratense* L.), абсолютно переважають екотонні види, які характерні для сухих лук, лучно-степових екоотопів і чагарників. Наявні синантропні лучні види, характерні для випасених, еродованих лук, лучних перелогів (*Leontodon autumnalis* L., *Trifolium repens* L., *Pastinaca sylvestris* Mill. тощо).

Наявність на степових перелогах мезофітних пратантів і деяких палюдантів не можна вважати випадковою. Такі види як *Phleum pratense*, *Festuca pratensis*, *Epilobium tetragonum* L. (на окремих ділянках – *Epilobium hirsutum* L.) досить стабільно траплялися на перелогах у період досліджень. Поява цих видів, безумовно, пов'язана з дуже вологими роками, на які припали початкові етапи сукцесії на деяких ділянках. Спостереження показали, що такі мезофітні види можуть довго утримуватися в перелогових угрупованнях.

У складі ценоморф окремо виділена група видів культигенного походження (11 видів, 6%), яка різноманітна за складом. До цієї групи належать дерева, які заносяться з насаджень та не є цілком натуралізованими (*Armeniaca vulgaris*, *Robinia pseudoacacia*). Зі звичайних культурних видів (5 видів), які деякий час утримуються на перелогах (1–3 роки), найбільш стійким виявляється *Helianthus annuus* L., який спонтанно поновлюється і трапляється на трирічних перелогах. Види, що використовуються у травосумішах

(4 види – *Bromopsis inermis* (Leyss.) Holub, *Medicago sativa* L., *Onobrychis arenaria* (Kit.) DC., *Poterium polygamum* Waldst. & Kit.) знайдені на окремих ділянках молодих перелогів, де в сивообігу відносно недавно були багаторічні трави. Ценотична роль таких видів на бур'янистих перелогах зазвичай незначна, але вони виявляються стійкими і стабільно фіксуються на ділянках, де закріпилися.

Зі сільвантів, яких виявлено 12 видів (6,5%), типові сільванти відсутні, наявні деревно-чагарникові та деякі екотонні трав'янисті види, які характерні для різноманітних угруповань заростей чагарників.

Відповідно до екологічних умов схилів, на досліджених ділянках представлені галофільні, кретофільні та псамофільні види. Галофітів виявлено 4 види (2,2%), серед яких 2 види – рудеральні галофіти (*Lactuca tatarica* (L.) C. A. Mey., *Lactuca saligna* L.) та 2 види – лучні галофіти (*Taraxacum erythrospermum* Andr., *Silaum silaus* (L.) Schinz & Thell.). Кретофіли представлені 6 видами (3,3%), з яких 4 види є рудерантами (*Meniocus linifolius* (Stephan ex Willd.) DC., *Sideritis montana* L., *Reseda lutea* L., *Erucastrum armoracioides* (Czern. ex Turcz.) Cruchet), 2 види характерні для кретофільно-степових угруповань (*Linum austriacum* L., *Gypsophila oligosperma* A. Krasnova). Псамофітів наявно 7 видів (3,8%), серед яких представлені однорічники та деякі багаторічники, характерні для порушених екотопів з піщаними ґрунтами (*Pilosella officinarum* F.Schult. & Sch.Bip., *Artemisia scoparia* Waldst. & Kit. тощо). Із цих видів на молодих перелогах звичайні лише *Lactuca tatarica* та *Lactuca saligna*, більшість видів трапляється рідко.

Адвентивна фракція ценофлори молодих перелогів становить 33,2%, 61 вид. Агріофіти представлені 13 видами (7,1%), ергазіофіти налічують 6 видів (3,3%). Більшість адвентивних видів є сегетальними або типовими рудерантами. Всі види природної флори, які поширюються на молодих перелогах, мають бути віднесені до апофітів. З цього переліку невелику групу (12 видів, 6,5%) типових степантів і пратантів віднесено до випадкових апофітів. Більшість із виявлених на молодих перелогах степантів і пратантів з різною частотою поширені в інших порушених екотопах. Група типових апофітів досить значна за числом і становить 111 видів (60,3%).

Велике значення має наявність на молодих перелогах рідкісних видів, з яких було виявлено 5 видів роду ковила – *Stipa capillata* L., *S. lessingiana* Trin. & Rupr., *S. pennata* L., *S. tirsia* Steven, *S. zaleskii* Wilensky. Всі вони поширені зрідка на ділянках зі сприятливими умовами для занесення насіння, але окремі особини трапляються і на значній відстані до цілинних ділянок.

Ценофлора перелогів ранніх стадій сукцесії тісно пов'язана зі сегетальною. Флористична подібність (за Жаккаром) сегетальних угруповань регіону досліджень і перелогів віком 1–3 роки становить 0,71. Всі види, виявлені в сегетальних угрупованнях [5], трапляються на молодих перелогах.

У ході сукцесії флористична різноманітність угруповань значно зростає. На перелогах сукцесійного віку 1–3 роки зафіксовано 96 видів із 22 родин, 5–7 річних – 174 види з 29 родин. Скорочується частка деяких провідних родин (*Asteraceae*) і зростає частка представників інших родин, передусім *Fabaceae*, *Lamiaceae*, *Rosaceae*. Коефіцієнт флористичної подібності угруповань віком 1–3 роки та віком 5–7 років становить 0,49.

У флористичному складі угруповань на перелогах віком 1–3 роки переважають малорічні трави (64%), на ділянках віком 5–7 років їхня частка знижується (до 46,5%), зростає частка багаторічних трав (33–45,4%) і деревно-чагарникових видів (3–13%). Частка вегетативно-нерухоливих видів на початку сукцесії вища (76%) та знижується (до 67,3%) за рахунок значного росту числа вегетативно-рухоливих багаторічників. Знижується частка

мезофітів (13–11,5%) і видів широкої екологічної амплітуди (76–70,7%), зростає частка ксерофітів (11–16,7%). Зменшується частка рудерантів (73–54,1%) і культигенних видів (8–4%), зростає частка видів інших ценотичних груп – степантів (12–22,4%), пратантів (3–11,5%), сільвантів (4–6,9%). Абсолютне число видів зростає у всіх біологічних, екологічних і ценотичних групах, за винятком культигенних видів, кількість яких зменшується.

Кількість нових видів, які з'являються в ході сукцесії, становить 84. Кількість зниклих видів – лише 10. Процес проникнення нових видів іде значно інтенсивніше, ніж випадання старих, що збігається з висновками, зробленими при дослідженні сукцесій в агростепу [1]. Серед зниклих видів 4 – культигенні, а різноманіття однорічних рудерантів зменшилося на 6 видів. Група сегетальних видів, які швидко «залишають» перелоги, незначна за числом, їхня участь в угрупованнях зменшується, але всі сегетальні види можуть появлятися на молодих перелогах.

Розширення видового складу відбувається за рахунок різноманітних за еколого-ценотичними та біоморфологічними характеристиками видів. Серед видів, які з'являються в ході сукцесії 32,1% – степанти; 31% – рудеранти; 21,4% – пратанти; 9,5% – сільванти і 2,4% – палюданти. З нових видів 56% – багаторічні трави, 1,1% – напівкущики, 11,9% – дерева та кущі, 16,7% – дворічники та 14,3% однорічники. На цьому етапі сукцесії на перелогах відбувається проникнення та закріплення різноманітних видів, але превалює процес появи ксерофітних багаторічних трав степової ценоморфи.

Незважаючи на широкий спектр видів, які виявлені на перелогах ранніх стадій, ценотичне ядро угруповань цілком формують рудеранти. Група домінантів і видів із високою постійністю налічує 40 видів (частково вони наведені в табл. 3). Серед них абсолютну більшість (35, 87,5%) становлять рудеранти, невеликим числом видів представлені пратанти (3), по одному виду – сільванти і степанти.

Групу видів із невисокою постійністю (класи 1–2), але високим покриттям (класи 1–2) становить ще 21 вид. Це види, які локалізовані на окремих ділянках або розростаються в окремі роки. Серед них також переважають рудеранти (57,1%), помітні степанти (28,6%), наявні сільванти, культигенні види та палюданти (по 1 виду). До цієї групи віднесені звичайні для перелогів рудеранти (*Linaria maeotica* Klokov, *Centaurea diffusa* Lam., *Salvia aethiopsis*, *Cichorium intybus*, *Plantago major*) та деякі сегетальні види (*Chenopodium album* L., *Ambrosia artemisifolia* L., *Amaranthus retroflexus* L.). Слід підкреслити, що чисельність популяцій малорічних рудерантів і їхні ценотичні показники дуже нестабільні по роках, залежно від умов зволоження, що зумовлює значне різноманіття угруповань на початкових етапах сукцесії. На перелогах віком 1–3 роки ценотично значуща група цілком сформована сегетальними видами, на 5–7-річних ділянках розростаються специфічні перелогові рудеранти. Таким чином, група ценотично значимих видів налічує 61 вид (33%), інші види трапляються зрідка.

Одна з найважливіших характеристик угруповань, що змінюється в ході сукцесії, – показник видового багатства [18]. Видове багатство угруповань віком 1–3 роки в середньому становить 22,4 виду (14–31 вид) на 100 м<sup>2</sup>, віком 5–7 років – 34,4 виду (19–51 вид). Максимальні значення характерні для периферійних ділянок перелогів. У низці робіт є дані про низьке видове багатство угруповань на ранніх стадіях сукцесії – на рівні від 8 до 18 видів [21]. За нашими спостереженнями, максимум розвитку угруповань бур'янистої стадії, на відміну від степових угруповань, припадає на середину липня - серпень. У цей період фіксується максимальна висота травостою, проективне покриття, продуктивність і видова насиченість. Саме в цей період треба виконувати геоботанічні описи. Описи, проведені в червні, мають значно нижчі показники видового багатства (до 20 видів на 100 м<sup>2</sup>).



Таблиця 3

Види	Ценотична активність видів за стадіями сукцесії, років	
	1–3	5–7
З високою активністю на перелогах 1–3 років		
<i>Consolida regalis</i> S.F.Grey	5/2*	3/1
<i>Conysa canadensis</i> (L.) Cronq.	4/1	2/2
<i>Fallopia convolvulus</i> (L.) A.Löve	5/1	3/2
<i>Lactuca saligna</i> L.	4/1	3/1
<i>Lactuca serriola</i> L.	5/4	4/2
<i>Lappula squarrosa</i> (Retz.) Dumort.	3/1	3/0
<i>Lathyrus tuberosus</i> L.	4/1	2/2
<i>Setaria glauca</i> (L.) P.Beauv.	4/1	3/2
<i>Sinapis arvensis</i> L.	2/3	2/2
<i>Sonchus arvensis</i> L.	5/1	3/2
<i>Stachys annua</i> (L.) L.	4/1	4/2
<i>Thlaspi arvense</i> L.	4/2	1/1
<i>Tripleurospermum inodorum</i> (L.) Sch.Bip.	4/1	3/1
<i>Xanthium albinum</i> (Widder) H.Scholz	3/3	2/2
З високою активністю на перелогах 5–7 років		
<i>Achillea pannonica</i> Scheele	–	3/1
<i>Agrimonia eupatoria</i> L.	1/0	3/1
<i>Artemisia absinthium</i> L.	3/3	5/5
<i>Artemisia vulgaris</i> L.	2/1	3/3
<i>Bromus sguarrosus</i> L.	1/1	4/2
<i>Carduus acanthoides</i> L.	2/2	5/4
<i>Cynoglossum officinale</i> L.	–	3/1
<i>Daucus carota</i> L.	2/0	5/1
<i>Echium vulgare</i> L.	–	3/1
<i>Elytrigia repens</i> (L.) Nevski	2/2	3/2
<i>Falcaria vulgaris</i> Bernh.	2/1	3/4
<i>Medicago lupulina</i> L.	1/0	3/1
<i>Melilotus albus</i> Medik.	1/0	3/1
<i>Melilotus officinalis</i> (L.) Pall.	3/1	3/5
<i>Picris hieracioides</i> L.	2/0	3/1
<i>Senecio grandidentatus</i> Ledeb.	2/0	4/2
<i>Taraxacum officinale</i> Wigg.	2/0	4/1
<i>Ulmus pumila</i> L.	1/0	3/2
<i>Verbascum lychnitis</i> L.	2/1	3/2
Наскрізнi види		
<i>Cirsium setosum</i> (Willd.) Besser	5/5	5/4
<i>Convolvulus arvensis</i> L.	5/4	5/4
<i>Euphorbia virgata</i> Waldst. & Kit.	5/4	4/4
<i>Lactuca tatarica</i> (L.) C. A. Mey.	3/4	3/5

**Примітка.** \* – постійність, клас /проективне покриття, клас (максимальний у масиві описів).

Дослідження степових перелогів на ранніх стадіях відновлення дало змогу встановити, що флористичний склад угруповань вирізняється значною різноманітністю, що зумовлено чисельністю групи синантропних видів широкої еколого-ценотичної амплітуди, які формують ценофлору молодих перелогів. У складі ценофлори характерна висока частка багаторічників (50,6%) і видів широкої екологічної амплітуди (70,6%). За складом ценоморф характерне переважає рудерантів (54,4%), але значну частку становлять степанти (21,2%) і види інших груп. На початкових стадіях сукцесії, залежно від кліматичних умов, з'являються та закріплюються різноманітні в еколого-ценотичному аспекті види, в тому числі невластиві степовим екотопам пратанти, сільванти, палюданти й культигенні види. Для перелогів віком 1–3 роки характерне абсолютне переважає малорічників (64%) та рудерантів (73%). На перелогах 5–7 років відбувається значне



розширення видового складу, переважно за рахунок степантів. Встановлено, що видове багатство угруповань ранньої стадії становить у середньому 22,4 виду на 100 м<sup>2</sup> (1–3-річні перелоги) та 34,4 виду на 100 м<sup>2</sup> (5–7-річні).

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Абдуллин М. Р., Миркин Б. М.* О некоторых методах количественного описания сукцессий // *Экология*. 1990. № 6. С. 468–470.
2. *Алексеев А. Д.* Естественные кормовые угодья конного завода № 63 Ворошиловградской области УССР // *Зап. Харьк. с.-х. ин-та*. 1946. № 5. С. 291–299.
3. *Боровик Л. П.* Природні та антропогенні фактори демутації перелогів на території Стрільцівського степу (відділення Луганського природного заповідника) // *Чорноморський ботан. журнал*. 2008. Т. 4. № 1. С. 98–106.
4. *Боровик Л. П.* Растительность залежей как важный компонент сохранения биоразнообразия на востоке Украины (Луганская область) // *Вісн. Одеськ. ун-ту*. 2008. Т. 13. Вып. 16. С. 69–73.
5. *Боровик Л. П.* Особенности сегетальных растительных сообществ востока Луганской области как начальной стадии сукцессии на залежах // *Вісн. Харків. ун-ту. Сер. біол.* 2011. Вып. 14. № 971. С. 33–42.
6. *Бринкерт А., Камп Й., Хёльцель Н., Сидорова Т.* Восстановление растительности на залежах в сухостепной подзоне Казахстана: важность выпаса // *Степной бюллетень*. 2012. № 6. С. 13–15.
7. *Ганнибал Б. К., Панкратова Л. А.* Элементы мозаики начальной стадии зарастания степной залежи в Воронежской области // *Степи Северной Евразии: материалы 4 Междунар. симпозиума. Оренбург, 2006*. С. 183–185.
8. *Геоботаничне районування Української РСР / за ред. А.І. Барбарич. К.: Наук. думка, 1977. 302 с.*
9. *Гнатюк Е. П., Крышень А. М.* Методы исследования ценофлор (на примере растительных сообществ вырубок Карелии). Петрозаводск: Карельский науч. центр РАН, 2005. 68 с.
10. *Горбачев Б. Н.* Растительность и естественные кормовые угодья Ростовской области (пояснительный текст к картам). Ростов: Ростовское книжн. изд-во, 1974. 151 с.
11. *Горшкова А. А.* Материалы к изучению степных пастбищ Ворошиловградской области в связи с их улучшением // *Тр. Бот. ин-та им. В.Л. Комарова. Сер. 3. Геоботаника*. 1954. № 9. С. 442–544.
12. *Екологічна енциклопедія: у 3 т. / редколегія: А. В. Толстоухов (гол. ред.) та ін. К.: ТОВ «Центр екологічної освіти», 2006. Т. 1. 432 с.*
13. *Екофлора України. Т. 1. / відп. ред. Я.П. Дідух. К.: Фітосоціоцентр, 2000. 284 с.*
14. *Залесский К. М.* Залежная и пастбищная растительность Донской области. Ростов-на-Дону, 1918. 84 с.
15. *Казанцева Т. И., Бобровская Н. И., Пащенко А. И., Тищенко В. В.* Особенности динамики и восстановления залежной растительности луговых степей заказника «Каменная степь» // *Отечественная геоботаника: основные вехи и перспективы. Материалы Всерос. конф. (Санкт-Петербург, 20–24 сентября 2011 г.)*. Т. 2. С. 88–91.
16. *Комаров Н. Ф.* Этапы и факторы эволюции растительного покрова черноземных степей // *Зап. Всесоюзн. географич. общ. Нов. серия. Вып. 13*. 1951. 326 с.
17. *Кондратюк Е. Н., Бурда Р. И., Остапко В. М.* Конспект флоры юго-востока Украины. Сосудистые растения. К.: Наук. думка, 1985. 272 с.

18. *Миркин Б. М., Наумова Л. Г.* Современное состояние основных концепций науки о растительности. Уфа: АН РБ, Гилем, 2012. 488 с.
19. Определитель высших растений Украины / Доброчаева Д.Н., Котов М.И., Прокудин Ю.Н. и др. К.: Наук. думка, 1987. 548 с.
20. *Осичнюк В. В.* Зміни рослинного покриву степу // Рослинність УРСР. Степи, кам'яні відслонення, піски. К.: Наук. думка, 1973. С. 249–333.
21. *Панкратова Л. А.* Исследование начальных стадий восстановления степной растительности в зоне европейской лесостепи на примере музея-заповедника «Дивногорье» (Воронежская область) // Актуальные проблемы геоботаники: 3 Всерос. школа-конф. Ч. 2. Петрозаводск: Карельский науч. центр РАН, 2007. С. 117–121.
22. Полевая геоботаника. Т. 3. М.; Л.: Наука, 1964. 530 с.
23. *Протопопова В. В.* Синантропная флора Украины и пути ее развития. К.: Наук. думка, 1991. 204 с.
24. *Тарасов В. В.* Флора Дніпропетровської та Запорізької областей. Судинні рослини. Біолого-екологічна характеристика видів. Дніпропетровськ: Вид-во ДНУ, 2005. 276 с.
25. *Тишков А. А.* Сукцессии степной растительности // Степи Северной Евразии: материалы VI Междунар. симпозиума. 2012. С. 716–720.
26. *Филатова Т. Д., Золотухин Н. И., Золотухина И. Б., Полуянов А. В.* Начальные стадии восстановления растительности на залежах Зоринского участка Центрально-Черноземного заповедника // Флора и растительность северной лесостепи: материалы науч. конф. Курск, 22 февраля 2000 г. Тула, 2000. С. 39–43.
27. *Mosyakin S. L., Fedoronchuk M. M.* Vascular plants in Ukraine. A nomenclatural checklist. Kiev, 1992. 346 p.

*Стаття: надійшла до редакції 15.03.13*

*доопрацьована 13.05.13*

*прийнята до друку 24.05.13*

**SPECIES COMPOSITION OF THE PLANT COMMUNITIES  
AT THE EARLY STAGE OF ABANDONED FIELD SUCCESSION  
IN THE NORTH-EAST OF LUGANSK REGION**

**L. Borovik**

*Lugansk Nature Reserve, NAS of Ukraine  
95, Rubizhna St., Stanitsa Luganska, Lugansk Region 93602, Ukraine  
e-mail: borovyk@mail.ru*

Species composition of abandoned fields at the ruderal stage of steppe regeneration was investigated. A taxonomic, ecobiomorphic structure and synanthropic fraction of the coenoflora, as well as species richness of the plant communities were analyzed. In total, 184 species from 32 families were registered for the coenoflora of early abandoned fields in the study site. Of them, perennial (50,6%), ruderal (54,4%) and ecological generalist (70,6%) species were the most numerous. The dominance of annual and biannual (64%), as well as ruderal species (73%) is characteristic for the flora of 1–3 year abandoned fields. In the 5–7 year abandoned fields, a process of flora enrichment with steppe species is going on. Depending on climate conditions, different ecological types of species (ruderal, steppe, meadow, forest, paludal and cultural) are registered at the early stage of succession.

*Keywords:* abandoned fields, steppe regeneration, coenoflora, taxonomic and ecobiomorphic spectrum, species richness.

**ВИДОВОЙ СОСТАВ ЗАЛЕЖНЫХ СООБЩЕСТВ НА НАЧАЛЬНЫХ СТАДИЯХ  
СУКЦЕССИИ НА СЕВЕРО-ВОСТОКЕ ЛУГАНСКОЙ ОБЛАСТИ**

**Л. Боровик**

*Луганский природный заповедник НАН Украины  
ул. Рубежная, 95, Станица Луганская, Луганская обл. 93602, Украина  
e-mail: borovyk@mail.ru*

Исследован видовой состав степных залежей на сорной стадии сукцессии. Анализируется систематическая, эколого-биоморфологическая структура ценофлоры, состав синантропной фракции ценофлоры, видовое богатство сообществ. Установлено, что ценофлора молодых залежей насчитывает 184 вида 32 семейств, среди которых значительна доля многолетников (50,6%), рудерантов (54,4%) и видов широкой экологической амплитуды (70,6%). Для залежей возрастом 1–3 года характерно преобладание малолетников (64%) и рудерантов (73%). На залежах возрастом 5–7 лет происходит значительное расширение видового состава, преимущественно за счет степантов. Для ранних стадий сукцессии, в зависимости от климатических условий, характерно закрепление различных видов – рудеральных, степантов, пратантов, сивантов, паллюдантов и культигенных видов.

*Ключевые слова:* залежи, восстановление степей, ценофлора, систематический, эколого-биоморфологический спектр, видовое богатство.

## ДО ІСТОРІЇ ДОСЛІДЖЕННЯ РОСЛИННОСТІ ВИСОКОГІР'Я СВИДОВЕЦЬКОГО МАСИВУ УКРАЇНСЬКИХ КАРПАТ

Т. Фостяк

Львівський національний університет імені Івана Франка  
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна  
e-mail: digital.herblw@gmail.com

Вивчення рослинного покриву Свидовецького масиву почалося ще в кінці XIX ст. Донині було проведено багато досліджень на цій території, проте на сьогодні результати класифікування рослинності не відповідають стандартам сучасного еколого-флористичного підходу. Це зумовлює необхідність проведення досліджень рослинності із застосуванням методу Браун-Бланке.

*Ключові слова:* історія, дослідження, рослинність, Свидовецький масив.

Дослідження флори і рослинності Українських Карпат, як відомо, розпочалися ще з кінця XVIII століття. Їх слід поділяти на три етапи: дорадянський (кінець XVIII ст. – 1939 р.), радянський (1939–1991), український (1991 р. – донині).

Хоча Свидовецький гірський масив є одним із осередків Українських Карпат з найвищим рівнем фіторізноманіття, проте лише деякі дані стосовно його флори і, меншою мірою – рослинності, знаходимо у працях, опублікованих наприкінці XIX – на початку XX ст., зокрема Г. Запаловичем [43] і Ф. Паксом [40, 41]. Г. Запалович уперше підкреслив своєрідність флори та рослинності Свидовця і висловився за виділення цієї території в окремий ботанічний підокруг [43].

У 20–30 роках XX ст. чехословацькі та польські дослідники розпочали систематичніше вивчення флори і рослинності української частини Східних Карпат. Зокрема, флору, рослинність і спосіб господарювання на Свидовці досліджував І. Краль. У своїй праці «Свидовець в Підкарпатській Русі» [39] він зазначав, що рослинний покрив на Свидовці схожий на такий у Альпах і Татрах, та хоча найбільше він подібний до рослинного покриву східної частини Південних Карпат, проте має свої відмінності, а також відрізняється від рослинного покриву сусідніх гірських масивів. Високогірну рослинність Свидовця І. Краль розділяв на два неперервні пояси – нижчий (від 1300 м, а по берегах річок і потоків від 1100 м і аж до 1600 м) та вищий (від 1600 до 1883 м). Також для високогір'я він відзначав наявність неперервного поясу гірського лісу, який межував із нижчим неперервним поясом високогір'я і навіть доходив до висоти 1600 м н.р.м. [39].

У 1929–1930 роках К. Домін досліджував рослинність полонин і торфовищ Свидовця – вершин Близниці, Герашески, Менчіла і Шиманового Котла й описав у своїх працях рідкісні для Карпат асоціації *Festucetum carpaticae* (Dom. 1925) Pawł. et Stecki 1926, *F. amethystinae* (Domin) Coldea 1984, *F. versicoloris muscosum* Deyl 1940 та угруповання *Juncetum trifidi* Krajina 1933. А також виділив Свидовецький геоботанічний район, який відніс до підобласті Східних Карпат [21, 34–38].

Найінтенсивніше рослинність Українських Карпат, у тому числі і Свидовця, вивчалася у часи радянської України. Після Другої світової війни, у 1946 р. була сформована перша радянська експедиція у Закарпатську область, яку очолював М. Г. Попов. Він дав характеристику рослинності території [30]. Проте в дослідженнях М. Г. Попова було багато

помилкових тверджень, на що вказали у критичній рецензії Ф. О. Гринь та М. І. Косець [13, 21]. Трохи згодом була сформована експедиція для вивчення рослинності лісів, лук і боліт всіх Українських Карпат, у складі якої працювали Ф. О. Гринь, Г. І. Білик, Є. М. Брадів, О. О. Зап'ятова, М. І. Косець та інші київські ботаніки [21]. У 1954 р. ці дослідники випустили на той час найповніше зведення про рослинність Закарпатської області [3], де на Свидовці у субальпійському поясі були виділені серед криволісся формації з *Pinus mugo* Turra і *Alnus viridis* (Chaix) DC., ялівцеві зарості; лучна рослинність була розділена на пустищні луки з трьома формаціями, справжні луки з чотирма формаціями та різнотравні луки – з формацією *Rumiceta alpinae* [12]. В альпійському поясі на Свидовці автори виділяють три формації альпійських пустищ: справжньоальпійські луки з формацією *Festuceta supinae*, що трапляється на Близниці, та *Deschampsia caespitosa alpinae* на південних схилах Близниці; строкаті альпійські луки, що належать до асоціації сеслерії Бельца; скельна рослинність Близниці із різноманітними рідкісними видами, такими як вероніка Баумгартена, волошка Кочі, деревій Шура [12, 32]. Окремо автори виділяють рослинність довгосніжних улоговин, що є барвистими, завдяки значній кількості видів із яскраво забарвленими квітками [12]. Гірські та високогірні болота автори не описували, проте вони зазначали, що є болітця, найчастіше – низинного типу [10].

Окрім цього, велику кількість публікацій [1, 5–9, 11, 14–20, 23] було присвячено вивченню окремих угруповань Українських Карпат, щоправда переважно у Чорногірському масиві. Вивчали формації різних типів рослинності, методи охорони та покращення угруповань, наприклад: Д. Я. Афанасьєв, який досліджував післялісові луки [1], І. В. Бережний – вересові пустища [7], Г. В. Козій та С. М. Стойко – рослинність лісів та, меншою мірою, полонин [16], К. А. Малиновський – біловусові пасовища [20, 23], М. І. Бедей вивчав асоціації костричників, зокрема запропонував охороняти асоціацію костриці карпатської [5, 6], яку раніше описав К. Домін, а згодом і сам М. І. Бедей у Шимановому Котлі (льодовиковий кар між Великою та Малою Близницями), на схилах полонини Герешаска, пн.-зх. схилах гори Татул та між першим і другим Коминами (назва вапнякових скель по дорозі до Близниці) [23].

У своїй роботі «Природні луки УРСР» Д. Я. Афанасьєв [2] поділяє рослинність на такі типи: 1) післялісові луки гірського поясу Карпат, які, у свою чергу, включають справжні, пустищні та торф'яністі луки; 2) високогірні луки – пустищні та справжні луки; 3) рослинність скель (зокрема, повідомляє, що під Близницею є асоціація *Dryas octopetala*, а також угруповання барвистого різнотрав'я, де трапляється велика кількість рідкісних і ендемічних видів); 4) пустища.

У 1980 р. виходить велика монографія К. А. Малиновського «Рослинність високогір'я Українських Карпат» [22] як підсумок 30-літньої праці (описи рослинності в період 1950–1970 рр.) над вивченням рослинності високогір'я Українських Карпат за домінантним підходом. Автор подає опис рослинних угруповань для всіх районів Карпат, вказує на ценотичні особливості кожного із синтаксонів, пропонує природоохоронні методи. Такі дослідження проводили і на території високогір'я Свидовецького масиву. Загалом К. А. Малиновський виділив на Свидовці 3 типи рослинності, 15 підтипів, 31 формацію, 42 асоціації, вказавши місця їхнього поширення. Також автор виділив 11 асоціацій рослинних угруповань вторинного походження, які він розподілив на короткочасно-похідні, довгочасно-похідні та рудеральні угруповання.

Наприкінці 70-х років ХХ ст. радянські дослідники почали відзначати переваги еколого-флористичного методу Браун-Бланке у класифікації трав'яних угруповань лучного типу [28, 29]. Незважаючи на те, що активність досліджень у Карпатському регіоні спала

і що тут досі використовують старий доміантний підхід, дедалі частіше рослинність вивчають із застосуванням методу еколого-флористичної класифікації.

Перед початком українського періоду дослідження високогірної рослинності Свидовецького масиву дослідники (Ю. Р. Шеляг-Сосонко, В. А. Соломаха, Б. М. Міркін) [33] підсумували результати розроблення класифікаційних схем рослинності України, доведених до рангу союзу. Вони включали 28 класів, 43 порядки, 65 союзів, проте дані про рослинність Українських Карпат не входили до цього переліку.

З початком українського періоду у 1992 р. К. А. Малиновський та ін. [26, 27] представили результати першої флористичної класифікації високогір'я Українських Карпат, зокрема виділяли 16 класів, 55 асоціацій, у тому числі 11 нових для науки. На Свидовці автори знайшли рослинні угруповання 6 класів і 18 асоціацій. Згодом було опубліковано і список прибережно-водних, болотних, лучних, чагарникових і чагарничкових угруповань високогір'я Карпат, який був продовженням попереднього списку. Налічувалося у цьому списку 27 асоціацій із 10 класів. У Свидовецьких горах було виявлено угруповання 16 асоціацій з 8 класів.

У 2000 та 2002 роках К. А. Малиновський і В. В. Крічфалушій створили продромус [24, 25], використовуючи понад 1300 авторських описів рослинних угруповань за доміантним методом, та кількох праць учених дорадянського періоду і виділили 14 класів, 19 порядків, 25 союзів, 51 асоціацію, 16 субасоціацій, у тому числі й новоописаних, для території високогір'я Українських Карпат. На Свидовецькому масиві, зокрема, були виділені 34 асоціації та 10 субасоціацій, що належать до 18 союзів, 16 порядків і 13 класів. Окрім цього, вказувалося поширення, природоохоронний статус і значення угруповань. Автори відзначили рідкісні, реліктові й ендемічні асоціації високогір'я Карпат.

До зміни методики опрацювання рослинності спонукала не лише недосконалість класифікації за доміантними, але і потреба в можливості порівнювати її з даними зі сусідніх територій, рослинність яких уже давно опрацьована за еколого-флористичним методом. Варто зауважити, що список синтаксонів рослинності високогір'я Українських Карпат, наведений К. А. Малиновським і В. В. Крічфалушієм, не є повним, і сучасні дослідники доповнюють його новими даними про рослинність із різних гірських масивів. Зокрема, у 2009 році в рамках проекту ВБИ-МАТРА/2007/004 проводили інвентаризацію трав'яної рослинності Українських Карпат, у результаті чого список був суттєво доповнений [31, 42].

Також слід згадати монографію М. І. Бедея «Близниці-Драгобрат» [4], що вийшла друком у 2006 р., де автор наводить результати багаторічних досліджень флори і рослинності східної частини Свидовецького масиву. Він зазначає, що флора Близниці та Драгобрата налічує 350 видів судинних рослин, які належать до 61 родини і 192 родів, значну частину яких, а саме 87, становлять рідкісні, реліктові та ендемічні види, багато з яких занесені до Червоної книги України [32]. Класифікація рослинності здійснена за доміантним методом.

Проаналізувавши праці вчених, котрі вивчали рослинність високогір'я Свидовецького масиву, слід підкреслити, що дослідження, проведені за доміантним принципом класифікування, у наш час не є достатніми. У той же час, описи рослинності за методом Браун-Бланке проведені на дуже незначних територіях масиву і не повністю відповідають вимогам цього методу, що спонукає до детальнішого вивчення рослинності цієї території.



## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Афанасьєв Д. Я.* Післялісові луки гірського лісового поясу Радянських Карпат і основні заходи їх поліпшення // Конф. по вивч. флори і фауни Карпат та прилеглих територій: тези доп. Київ, 1960. С. 13–21.
2. *Афанасьєв Д. Я.* Природні луки УРСР. К.: Наук. думка, 1968. 254 с.
3. *Барбарич А. І., Білик Г. І., Брадис Є. М.* та ін. Рослинність Закарпатської області УРСР. К.: Вид-во АН УРСР, 1954. 276 с.
4. *Бедей М. І.* Близниці-Драгобрат (флора, рослинність, охорона): монографія. Ужгород: Ліра, 2006. 105 с.
5. *Бедей М. І.* Вплив мінеральних добрив на продуктивність кострицевих лук в субальпійському поясі Карпат // Укр. ботан. журнал. 1968. Т. 25. № 1. С. 55–61.
6. *Бедей М. І.* Плодоношення костриць в природних фітоценозах Українських Карпат // Укр. ботан. журнал. 1969. Т. 26. № 4. С. 41–46.
7. *Бережний І. В.* Вересові пустища Українських Карпат, їх поширення, структура та природне поновлення // Конф. по вивч. флори і фауни Карпат та прилеглих територій: тези доп. Київ, 1960. С. 22–29.
8. *Брадис Є. М.* Высокогорная растительность Украинских Карпат // Конф. по вивч. флори і фауни Карпат та прилеглих територій: тези доп. Київ, 1960. С. 36–41.
9. *Брадис Є. М.* Болота гірської частини Закарпатської області // Укр. ботан. журнал. 1951. Т. 8. № 1. С. 25–30.
10. *Брадис Є. М.* Болотна рослинність // Рослинність Закарпатської області УРСР. К.: Вид-во АН УРСР, 1954. С. 211–215.
11. *Брадис Є. М., Андрієнко Т. Л., Лихобабина Є. П.* Оліготрофні болота Закарпатської області // Укр. ботан. журнал. 1969. Т. 26. № 1. С. 29–35.
12. *Брадис Є. М., Зап'ятова О. О.* Високогірна рослинність // Рослинність Закарпатської області УРСР. К.: Вид-во АН УРСР, 1954. С. 137–210.
13. *Гринь Ф. О., Косець М. И.* Рец. на книгу М.Г. Попова «Очерк растительности и флоры Карпат» // Укр. ботан. журнал. 1951. Т. 8. № 1. С. 102–104.
14. *Козій Г. В.* Луки гірських районів Українських Карпат, їх поліпшення і раціональне використання // Охорона природи в західних областях України: матеріали міжобласної конф. Львів, 1966. С. 102–106.
15. *Козій Г. В.* Флора і рослинність західних областей України // Праці Бот. саду Львів. ун-ту. 1953. С. 7–20.
16. *Козій Г. В., Стойко С. М.* Матеріали до вивчення рослинності Свидовецьких гір // Укр. ботан. журнал. 1958. Т. 15. № 3. С. 37–48.
17. *Комендар В. І.* Геоботанічна характеристика заростей вільхи зеленої (*Alnus viridis* DC.) в Українських Карпатах // Укр. ботан. журнал. 1963. Т. 20. № 4. С. 65–72.
18. *Косець М. І.* Нарис рослинності гірської частини Закарпатської області // Ботан. журнал. АН УРСР. 1949. Т. 6. № 1. С. 42–57.
19. *Котов М. И., Малиновский К. А., Чопик В. И.* Состояние и задачи дальнейшего изучения флоры и растительности Украинских Карпат // Конф. по вивч. флори і фауни Карпат та прилеглих територій: тези доп. Київ, 1960. С. 105–109.
20. *Малиновський К. А.* Динаміка урожаю біловусових пасовищ Карпат і питання правильного їх використання // Ботан. журнал АН УРСР. 1954. Т. 11. № 4. С. 28–42.
21. *Малиновський К. А.* Історія ботанічних досліджень і бібліографія флори та рослинності Українських Карпат (до 1970 р.). Львів: ДПМ НАНУ, 2005. 202 с.
22. *Малиновський К. А.* Рослинність високогір'я Українських Карпат. К.: Наук. думка, 1980. 280 с.

23. Малиновський К. А. Структура біловусових ценозів субальпійського пояса Карпат // Ботан. журнал АН УРСР. 1954. Т. 11. № 3. С. 51–66.
24. Малиновський К. А., Крічфалушій В. В. Високогірна рослинність // Рослинність України. К.: Фітосоціоцентр, 2000. Т. 1. 230 с.
25. Малиновський К. А., Крічфалушій В. В. Рослинні угруповання високогір'я Українських Карпат. Ужгород: Карпатська Вежа, 2002. 244 с.
26. Малиновський К. А., Міркін Б. М., Ішбірдин А. Р. та ін. Синтаксономія прибережно-водних, болотних, лучних, чагарникових і чагарничкових угруповань високогір'я Українських Карпат // Укр. ботан. журнал. 1992. Т. 49. № 4. С. 5–13.
27. Малиновський К. А., Міркін Б. М., Ішбірдин А. Р. та ін. Флористична класифікація високогірної рослинності Українських Карпат // Укр. ботан. журнал. 1992. Т. 49. № 3. С. 5–12.
28. Міркін Б. М., Шеляг-Сосонко Ю. Р. Актуальні питання класифікації рослинності // Укр. ботан. журнал. 1979. Т. 36. № 6. С. 513–523.
29. Міркін Б. М., Шеляг-Сосонко Ю. Р. Флористична класифікація лук СРСР та її перспективи // Укр. ботан. журнал. 1983. Т. 40. № 3. С. 8–14.
30. Попов М. Г. Закарпатська Україна і її рослинність // Доп. та повідомл. Львів. ун-ту. 1947. С. 87–89.
31. Тасенкевич Л. О., Веєн П. Інвентаризація трав'яної рослинності Українських Карпат (проект ВВІ-МАТРА/2007/004): метод. рекомендації. Львів: ДПМ НАНУ, 2008. 48 с.
32. Червона книга України. Рослинний світ. К.: Глобалконсалтинг, 2009. 900 с.
33. Шеляг-Сосонко Ю. Р., Міркін Б. М., Соломаха В. А. Стан класифікації рослинності України за методом Браун-Бланке // Укр. ботан. журнал. 1989. Т. 46. № 1. С. 5–11.
34. Domin K. Rašeliniště na Menčilu v oblasti Svidovce na Podkarpatské Rusi // Věda Přírodní. 1929. Ob. 10. S. 225–226.
35. Domin K. Juncetum trifidi na Bliznici v Podkarpatské Rusi // Věda Přírodní. 1930. Ob. 11. N 5/7. S. 216–217.
36. Domin K. Šimanův kotel na Svidovci v Podcarpatske Rusi // Vest. Kral. Čes. společ. nauk. Tř. II: Mřřirod. 1930. Ob. 4. S. 1–20.
37. Domin K. Tři zajímavé horské asociace na Gerešasce v skupine Svidovce // Věda Přírodní. 1930. N 5/7. S. 214–216.
38. Domin K. Vrcholová květena Velké Bliznice ve Svidivci // Věda Přírodní. 1930. Ob. 11. S. 188–190.
39. Král J. Svidovec v Podkarpatské Rusi. Sídla obyvatelství. Hospodářské využití. Praha, 1927. 126 s.
40. Pax F. Grundzüge der Pflanzenverbreitung in den Karpathen: Die Vegetation der Erde. Leipzig, 1898. Bd. 1. 270 S.
41. Pax F. Grundzüge der Pflanzenverbreitung in den Karpathen: Die Vegetation der Erde. Leipzig, 1908. Bd. 2. 322 S.
42. Tassenkevich L., Kruhlov I., Kalinovykh N. et al. Inventory of grasslands of the Ukrainian Carpathians. Lviv: SNHM, 2011. 88 p.
43. Zapalowicz H. Roślinna szata gór Pokucko-Marmaroskich // Spraw. Kom. Fizjograf. 1889. Vol. 24. 389 s.

Стаття: надійшла до редакції 27.09.13

доопрацьована 08.11.13

прийнята до друку 15.11.13

## TO THE HISTORY OF STUDY ON THE HIGHLANDS' VEGETATION OF THE SVYDOVETS MOUNTAIN RANGE

**T. Fostyak**

*Ivan Franko National University of Lviv  
4, Hrushevskiy St., Lviv 79005, Ukraine  
e-mail: digital.herblw@gmail.com*

The study on vegetation of the Svydovets massif began in the late nineteenth century. To the present, many researches have been conducted in this area. However the results of plant communities' description on dominant bases do not meet the standards of modern eco-floristic approach of vegetation classification, hence there is a need for the study of vegetation using the method of Braun-Blanquet.

*Keywords:* history, study, vegetation, Svydovets mountain range.

## К ИСТОРИИ ИЗУЧЕНИЯ РАСТИТЕЛЬНОСТИ ВЫСОКОГОРЬЯ СВИДОВЕЦКОГО МАССИВА УКРАИНСКИХ КАРПАТ

**Т. Фостяк**

*Львовский национальный университет имени Ивана Франко  
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина  
e-mail: digital.herblw@gmail.com*

Изучение растительного покрова Свидовецкого массива началось ещё в конце XX ст. За этот период было проведено много исследований на территории массива, однако результаты описания растительности по доминантному принципу не соответствуют стандартам современного эколого-флористического подхода. Это обуславливает необходимость проведения исследований растительности с применением метода Браун-Бланке.

*Ключевые слова:* история, изучение, растительность, Свидовецкий массив.

## БІОМОРФОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ *VERONICA APHYLLA* L.

М. Гелеш, А. Прокопів

Львівський національний університет імені Івана Франка  
вул. Черемшини, 44, Львів 79014, Україна  
e-mail: helesh.m@ukr.net

Дослідили морфогенез і структуру пагонової системи *Veronica aphylla* L. в аспекті сезонного розвитку. У пагоновій системі виявили два типи пагонів, відмінних за своїми морфо-функціональними особливостями: вегетативні поліциклічні та генеративні моноциклічні. Для *V. aphylla* характерне формування розеткових пагонів у поєднанні з довгим кореневищем, що підкреслює вузьку стенотопність виду до росту на слабо задернованих ділянках. Визначили властиву для виду життєву форму – зимозелений гемікриптофіт з ознаками хамефіта й моноподіальну розеткову модель пагоноутворення. Виявили способи пристосування до умов зростання і визначили причини вразливості виду.

*Ключові слова:* *Veronica aphylla* L., біоморфологія, пагонова система.

Якщо донедавна ніхто не піддавав сумніву приналежність роду *Veronica* L. до родини *Scrophulariaceae*, то в результаті APG-класифікації [19–21] рід віднесений до родини *Plantaginaceae*. А на основі останніх каріологічних, морфологічних та біогеографічних досліджень і аналізу послідовності ДНК запропоновані зміни й у межах триби *Veroniceae* [16, 17]. При пошуку відмінностей між таксономічними групами в межах роду часто виникають труднощі, пов'язані з морфологічними синапоморфіями, які намагаються розв'язувати з використанням різноманітних фітохімічних характеристик при розмежуванні клад у роді *Veronica* [18, 22, 25]. Разом з тим продовжується пошук нових ознак, зокрема в ультраструктурі насінин [23], і поглиблений детальний аналіз раніше отриманих даних морфологічної структури окремих видів, що можуть бути використані як додаткові ознаки при побудові кладограм і нададуть додаткову інформацію про філогенію роду. Саме до такого детального аналізу структурної організації пагонової системи одного із видів *Veronica* ми намагалися підійти у даній роботі, в тому числі зважаючи й на те, що біоморфологічні особливості відображають адаптаційну стратегію рослин до умов екотопу [5, 11].

На особливу увагу заслуговують високогірні види *Veronica*, чимало з яких є рідкісними і зникаючими та потребують не лише охорони, але і з'ясування причин їх обмеженого поширення у природі. Зокрема, *Veronica aphylla* L. – реліктовий вид із диз'юнктивним ареалом, поширений у високогір'ї Альп, Карпат і Балкан. В Українських Карпатах трапляється на Свидовці (гг. Близниця і Драгобрат) в субальпійському поясі на висоті 1700–1800 м н.р.м. на схилах південної експозиції, слабо задернованих ділянках, відслоненнях, осипах, на розсипищах і збагачених кальцієм скелях [3, 13–15]. Свидовець – єдиний гірський масив в Українських Карпатах, де трапляються оселища *V. aphylla* завдяки наявності кальцитових домішок у материнській породі, де петрофітна флора урізноманітнена базофільними видами [4].

Доволі детальний аналіз структури пагонових систем на широкому колі видів провела Н. П. Савіних [7–9], однак не у всіх цих видів був досліджений морфогенез пагонових систем та їх сезонний розвиток. Життєву форму *V. aphylla* Н. П. Савіних означила як

літньоозимозелений і вічнозелений гемікриптофіт, довгокореневищна трав'яна рослина з епігеогенним кореневищем, а модель пагоноутворення як симподіальну розеткову (варіант моделі за Н. П. Савіних) [9]. Проте відсутні дані, що стосуються особливостей пагоноутворення у ритмі сезонного розвитку. Такі дослідження *V. aphylla* допоможуть з'ясувати характерні пристосувальні риси у структурі пагонової системи та виявити причини вразливості виду.

### Матеріали та методи

Дослідження структури пагонової системи *V. aphylla* проводили на живому, фіксованому (70% етанолом) і гербарному матеріалі, який був зібраний у 2007, 2011 роках (г. Близниця і г. Драгобрат, хребет Свидовець). Проаналізували будову і розвиток пагонової системи з використанням різних методичних підходів [1, 2, 9–12]. Встановили життєву форму за біоморфологічною класифікацією К. Раункієра [24] і згідно з еколого-морфологічною класифікацією І. Г. Серебрякова [11].

### Результати і їхнє обговорення

*V. aphylla* – рихлодернинна рослина з розетковими пагонами і довгим тонким повзучим кореневищем, завдяки якому у рослини добре виражена здатність до вегетативного розростання. Пагони відновлення з'являються з приземних і надземних пазушних бруньок, часто по два-три, а тому кореневище розгалужене і з часом занурюється у ґрунт внаслідок засипання старших частин і обумовлює утворення рихлих куртин надземних пагонів.

У *V. aphylla* відстежуємо формування двох типів пагонів (рис. 1):

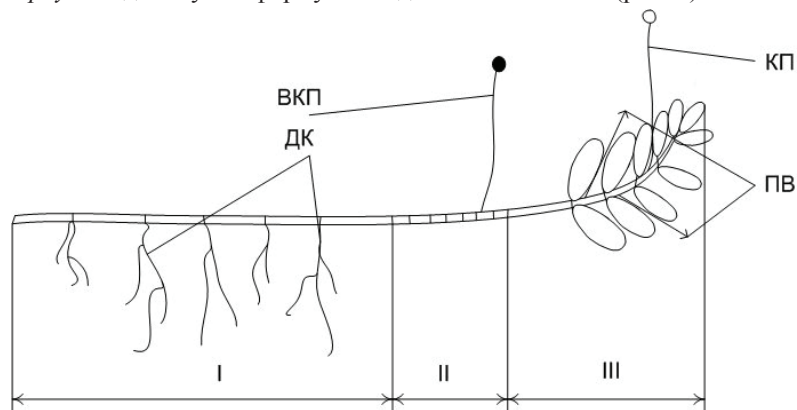


Рис. 1. Схема формування пагонової системи *Veronica aphylla* L.: ДК – додаткові корені, ВКП – відмерлий квітконосний пагін; КП – квітконосний пагін; ПВ – пагони відновлення; I, II, III – роки формування.

1 тип – відкриті суто вегетативні пагони, що здатні довго наростати моноподіально і ніколи не утворюють верхівок суцвіть.

2 тип – неуліснені генеративні пагони у вигляді квітконосів (стрілок), виключно пазушні, моноциклічні, що не мають власної зони відновлення.

Пагони відновлення першого року наростають плагіотропно і формують ділянку з 5–6 видовжених (7–12 мм завдовжки) міжвузль. Трапляються особини, у яких плагіотропна ділянка пагона відновлення складається з 15–20 метамерів, що, ймовірно, залежить від умов росту. Листкорозміщення супротивне, листки обернено-яйцеподібні, по краю зубрені, сидячі, 9–12 мм завдовжки та 5–6 мм завширшки, адаксіальна поверхня листка опушена довгими простими волосками. Наступного року пагін продовжує наростати і фор-

мує висхідну ділянку (розетку) з 6–9 сильно вкорочених (1–2 мм завдовжки) міжвузль, на якій розвиваються 1–2 пазушні ортотропні генеративні пагони (квітконоси). Генеративні пагони видовжені, безлисті, за винятком приквіткових листків. Листки, що формують розетку, мають більші лінійні параметри, аніж листки плагіотропної ділянки (12–22 мм завдовжки, 6–12 мм завширшки). У часі цвітіння в пазухах нижніх листків розетки наявні 2–3 плагіотропні пагони відновлення на різних стадіях розвитку. У цей період у них вже сформовано 2–3 видовжених міжвузля з 2–4 парами супротивних листків. Плагіотропна ділянка пагона попереднього року вкорінюється. Численні додаткові корені тонкі, довгі (до 9 см завдовжки), розгалужені, без слідів контрактильності, розвиваються винятково у вузлах. Після відцвітання пазушні генеративні пагони повністю відмирають. Плагіотропна та розеткова зони вегетативного пагона з часом опиняються під відмерлими рослинними рештками і субстратом, формуючи епігеогенне кореневище. Кореневище тонке членисте з наявними чіткими «видовженими» та «вкороченими» ділянками, часто здерев'яніле. Натомість, верхівка розетки залишається відкритою, завдяки чому на наступний рік пагін продовжує наростати. Таким чином, формується скелетний вегетативний поліциклічний пагін.

У багатьох особин ми спостерігали «поверховий» ріст пагонів: над сформованою розеткою, що складається з 5–7 вкорочених міжвузль, розвивається 1–2 видовжених міжвузля і вище утворюється нова розетка листків (рис. 2). Квітконосний пагін формується, як правило, на другій розетці. Найімовірніше, перша розетка листків сформувалася наприкінці вегетації у попередньому році та залишилася у бруньковій фазі розвитку, і на ній не встиг розвинути пазушний генеративний пагін. При цьому новоутворена брунька-розетка зберігається в асимілюючому стані під снігом і вже на наступний рік розетковий пагін продовжує наростати з утворенням наступних листків розетки. Не виключено також, що цей розвиток може пришвидшуватися і відбуватися впродовж одного вегетаційного сезону, хоча в силу кліматичних умов високогір'я часто бракує пластичних речовин, необхідних для формування квітконосного пагона впродовж короткого періоду вегетації, а тому його формування пролонговане в часі.

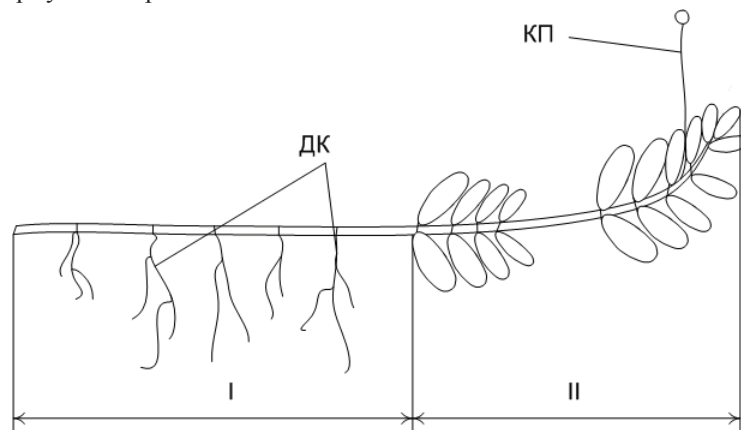


Рис. 2. Фрагмент пагона *Veronica aphylla* L. на якому формуються дві розетки: ДК – додаткові корені, КП – квітконосний пагін; I, II – роки формування.

Таким чином, у *V. aphylla* чітко простежується структурна і функціональна диференціація пагонів. Плагіотропна ділянка пагона виконує функцію розростання та захоплення нових територій. Формування розеткової ділянки пагона забезпечує можливість розвитку на ній пазушних квітконосів, які потребують багато енергії та пластичних матеріалів.



Оскільки розетка в обмеженому просторі максимально розвиває листову поверхню, це забезпечує високу біологічну продуктивність. Окрім цього, у *V. aphylla* спостерігаємо досить своєрідне поєднання довгого кореневища і розетки. Зазвичай у рослин із розетковими пагонами та схожою морфо-функціональною структурою пагонової системи формується коротке кореневище (наприклад у *Gentiana cruciata* L.) [6]. Така структурна особливість підкреслює вузьку стенотопність цього виду, оскільки формування рихлих куртин можливе у місцях, де сильно видовжене епігеогенне кореневище, здатне вкорінитися на слабо задернованих ділянках, осипах і відслоненнях. Тобто рослина заселяє достатньо екстремальні екотопи, що дає їй змогу уникнути конкуренції з боку інших видів. Ще однією ознакою, що визначає високу пристосувальну спеціалізацію біоморфи, є зимозеленість *V. aphylla*, яка підвищує асиміляційну здатність, що особливо важливо в умовах короткого вегетаційного періоду, який панує у високогір'ї.

Щодо життєвої форми *V. aphylla* за К. Раункієром, то окремі дослідники відносять її до гемікриптофітів [9, 15] інші – до хамефітів [13]. Дослідженнями нами особинам *V. aphylla* властиве здерев'яніння основ пагонів, а тому життєву форму найпевніше означити як гемікриптофіт з ознаками хамефітів. Останні якнайкраще пристосовані до найбільш несприятливих місцезростань і достатньо часто трапляються у високогір'ї [9].

Отже, *V. aphylla* – зимозелений гемікриптофіт з ознаками хамефіта, довгокореневищна трав'яна багаторічна рослина з епігеогенним кореневищем. Модель пагоноутворення у *V. aphylla* можемо охарактеризувати як моноподіальну розеткову (класична III модель за Т.І. Серебряковою), з пагонами, чітко диференційованими на два типи: поліциклічні вегетативні анізотропні та моноциклічні генеративні ортотропні. Структурні особливості формування пагонової системи *V. aphylla* демонструють вузьке пристосування до росту на незадернованих ділянках з дрібнощербенистим субстратом, оскільки вид характеризується наявністю сильно видовженого епігеогенного кореневища і формуванням розеткових поліциклічних пагонів та обмеженою здатністю до конкуренції зі супутніми видами. На нашу думку, однією з основних причин рідкисності виду є зменшення площ відповідних локалітетів унаслідок їх заростання та задернування.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Гатцук Л. Е. Геммаксилярные растения и система соподчиненных единиц их побегового тела // Бюл. МОИП. Отд. биол. 1974. Т. 79. Вып 1. С. 100–113.
2. Гатцук Л. Е. К методам описания и определения жизненных форм в сезонном климате // Бюл. МОИП. Отд. биол. 1974. Т. 79. Вып 3. С. 84–99.
3. Малиновський К., Царик Й., Кияк В., Нестерук Ю. Рідкісні, ендемічні, реліктові та погранично-ареальні види рослин Українських Карпат. Львів: Ін-т екології НАНУ, 2002. 75 с.
4. Кобів Ю., Прокопів А., Борсукевич Л., Гелеш М. Поширення, стан популяцій та характеристика оселищ рідкісних і загрожених видів рослин у північній частині Свидовця (Українські Карпати) // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2009. Вип. 49. С. 63–82.
5. Мазуренко М. Т. Биоморфологические адаптации растений Крайнего Севера. М.: Наука, 1986. 208 с.
6. Прокопів А. І. Структурна організація пагонових систем *Gentiana* L. // Modern Phytomorphol. 2012. № 1. С. 149–152.
7. Савиных Н. П. Побегообразование и взаимоотношения жизненных форм в секции *Veronica* рода *Veronica* L. // Бюл. МОИП. Отд. биол. 1979. Т. 84. Вып 3. С. 92–105.

8. Савиных Н. П. Эволюционные преобразования побеговых систем при формировании трав сезонного климата (на примере секции *Veronica* рода *Veronica* L.). // Бюл. МОИП. Отд. биол. 1981. Т. 86. Вып. 5. С. 89–98.
9. Савиных Н. П. Род вероника: морфология и эволюция жизненных форм. Киров: Изд-во ВятГГУ, 2006. 324 с.
10. Серебряков И. Г. Морфология вегетативных органов высших растений. М.: Сов. наука, 1952. 391 с.
11. Серебряков И. Г. Жизненные формы высших растений и их изучение. Полевая геоботаника. М.; Л.: Наука, 1964. Т. 3. С. 146–205.
12. Серебрякова Т. И. Об основных архитектурных моделях травянистых многолетников и модусах их преобразования // Бюл. МОИП. Отд. биол. 1977. Т. 82. Вып 5. С. 112–128.
13. Червона книга України. Рослинний світ. К.: Глобалконсалтинг, 2009. 900 с.
14. Чоник В. І. Високогірна флора Українських Карпат. К.: Наук. думка, 1976. 268 с.
15. Aeschmann D., Lauber K., Moser D. M., Theurillat J. P. Flora Alpina 2. Bern, Stuttgart, Wien: Haupt Verlag, 2004. 1188 p.
16. Albach D. C., Chase M. W. Incongruence in *Veroniceae* (*Plantaginaceae*): evidence from two plastid and a nuclear region // Mol. Phylogenet. Evol. 2004. N 32. P. 183–197.
17. Albach D. C., Martinez-Ortega M. M., Fischer M. A., Chase M. W. A new classification of the tribe *Veroniceae*: problems and a possible solution // Taxon. 2004. N 53. P. 429–452.
18. Albach D. C., Grayer R. J., Kite G. C., Jensen S. R. *Veronica*: acylated flavone glycosides as chemosystematic markers // Biochem. Syst. Ecol. 2005. N 33. P. 1167–1177.
19. APG. An ordinal classification for the families of flowering plants // Ann. Missouri Bot. Gard. 1998. Vol. 85. P. 531–553.
20. APG. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II // Bot. J. Linn. Soc. 2003. Vol. 141. P. 399–436.
21. APG III. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants // Bot. J. Linn. Soc. 2009. Vol. 161. P. 105 – 121.
22. Jensen S. R., Albach D. C., Ohno T., Grayer R. J. *Veronica*: Iridoids and cornoside as chemotaxonomic markers // Biochem. Syst. Ecol. 2005. N 33. P. 1031–1047.
23. Muñoz-Centeno L. M., Albach D. C., Sanches-Agudo J. A., Martinez-Ortega M. M. Systematic significance of seed morphology in *Veronica* (*Plantaginaceae*): a phylogenetic perspective // Ann. Bot. 2006. N 98. P. 335–350.
24. Raunkiaer K. The life forms of plants and statistical plant geography. Oxford: Clarendon Press, 1934. 632 p.
25. Taskova R. M., Albach D. C., Grayer R. J. Phylogeny of *Veronica*: a combination of molecular and chemical evidence // Plant Biology. 2004. N 6. P. 673–682.

Стаття: надійшла до редакції 26.06.13

доопрацьована 11.11.13

прийнята до друку 12.11.13

**BIOMORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF *VERONICA APHYLLA* L.****M. Helesh, A. Prokopiv**

*Ivan Franko National University of Lviv  
44, Tcheremshyna St., Lviv 79014, Ukraine  
e-mail:helesh.m@ukr.net*

The structure and morphogenesis *Veronica aphylla* L. shoot system in terms of seasonal development were investigated. The two different types of shoots – vegetative polycyclic and generative monocyclic – with different morpho-functional features were discovered. *V. aphylla* is likely to form rosette shoots combined with long rhizomes, which emphasizes its narrow adaptation for growth on special areas. The life form of *V. aphylla* (wintergreen hemicryptofite with signs of hamefite) and the *monopodial-rosette model* were determined. The *V. aphylla* ways to adapt for growth conditions were discovered and the causes of vulnerability of species were identified.

*Keywords:* *Veronica aphylla* L., biomorphology, shoot system.

**БИОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ *VERONICA APHYLLA* L.****М. Гелеш, А. Прокопів**

*Львовский национальный университет имени Ивана Франко  
ул. Черемшины, 44, Львов 79014, Украина  
e-mail:helesh.m@ukr.net*

Исследовали морфогенез и структуру побеговой системы *Veronica aphylla* L. в аспекте сезонного развития. Обнаружили два типа побегов, которые отличаются по своим морфо-функциональным особенностям: вегетативные полициклические и генеративные моноциклические. Побеговая система *V. aphylla* характеризуется формированием розеточных побегов в сочетании с длинным корневищем, которые подчеркивают узкую стенопотность вида к росту на незадернированных участках. Определили свойственную для вида жизненную форму – зимозеленый гемикриптофит с признаками хамефита и модель побегообразования моноподиальную розеточную. Обнаружили способы приспособления к условиям произрастания и определили причины уязвимости вида.

*Ключевые слова:* *Veronica aphylla* L., биоморфология, побеговая система.

## РІД *THYMUS* L. (*LABIATAE* JUSS.) У ФЛОРИ УКРАЇНСЬКИХ КАРПАТ: СИСТЕМАТИКА І ТАКСОНОМІЧНІ ПРОБЛЕМИ

**В. Начичко**

*Львівський національний університет імені Івана Франка*  
*вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна*  
*e-mail: nachichko@rambler.ru*

Наведено результати критико-таксономічного дослідження роду *Thymus* L. у флорі Українських Карпат. Представлений конспект роду, що включає одну секцію, дві підсекції, шість видів і п'ять нототаксонів. Два види: *T. pulcherrimus* Schur і *T. pulegioides* L. репрезентовані типовими підвидами. Для кожного виду наводяться номенклатурна цитата, базова література, основні синоніми, хромосомне число, типовий зразок і критичні зауваження. Запропоновано ключ для визначення видів.

*Ключові слова:* *Thymus* L., систематика, Українські Карпати.

Рід *Thymus* L. (*Labiatae* Juss.) є критичним і проблемним для систематики. На території Українських Карпат вивчення цього роду бере свій початок з моменту перших флористичних досліджень, проведених у кінці XVIII століття. З цього часу і до середини XX століття воно мало, передусім, епізодичний характер і відбувалось у контексті загального вивчення флори регіону. Відомості про різноманіття чебреців наведені у роботах багатьох дослідників, що жили і працювали в цей період [13, 23, 25, 30, 36, 37]. У 50–80-х роках XX століття дослідження роду *Thymus* в Українських Карпатах набуває систематичного характеру і пов'язане з виданням регіональних флор та визначників [1, 2, 4–7, 10, 18, 20, 32]. Результатом цього етапу досліджень було видання «Визначника рослин Українських Карпат» [2], у якому наводиться сім видів роду *Thymus*. Кінець XX – початок XXI століть ознаменовані появою підсумовуючих флористичних робіт, у яких узагальнено та доповнено результати понад 200-літніх досліджень флори Українських Карпат, в тому числі і роду *Thymus* [14–16, 34].

Однак незважаючи на тривалу історію дослідження флори Українських Карпат, на сьогодні чітко не з'ясоване різноманіття роду *Thymus* на цій території, немає уніфікованих підходів до розуміння обсягу його окремих видів у контексті нових досягнень систематики. Як наслідок, у багатьох сучасних українських флористичних, фітосозологічних і фітоценологічних роботах, що стосуються окремих регіонів Українських Карпат, видове різноманіття роду наводиться на основі застарілих уявлень [17], або ж деякі види встановлені для цієї території некоректно [21]. Зважаючи на ці передумови, а також на той факт, що з моменту останньої ревізії роду *Thymus* для території, що включала Українські Карпати [10], минуло понад 30 років, актуальним є критико-таксономічне дослідження роду *Thymus* у флорі Українських Карпат у зв'язку з подібними дослідженнями, проведеними в інших країнах Карпатського регіону [22, 26, 27].

Робота ґрунтується на матеріалах власних польових досліджень, проведених на території Українських Карпат протягом 2010–2013 років, і критичному аналізу колекцій гербаріїв *CHER*, *KW*, *KRA*, *KRAM*, *LW*, *LWS*, *LWKS*, *MSUD*, *UU*, Гербарію кафедри ботаніки Тернопільського національного педагогічного університету ім. В. Гнатюка. Нами взята за основу система роду *Thymus*, запропонована Ю. Л. Меніцьким [8, 9], проте обсяг деяких

видів трактуємо інакше, відповідно до сучасних поглядів [27, 33]. Межі території дослідження приймаємо згідно з флористичним районуванням, запропонованим у «Визначнику рослин Українських Карпат» [2].

Нижче представлено конспект видів роду з ключем для їх визначення. Для кожного виду наводимо загальноприйнятую на сьогодні латинську й українську назви з номенклатурною цитатою, основні синоніми, базову літературу, в якій вид наводиться для території дослідження, інформацію про число хромосом (за літературними джерелами [24, 28, 35]), відомості про тип і місце його зберігання, критичні зауваження.

Gen. *THYMUS* L. 1753, Sp. Pl.: 590. – *Mastichina* Mill. 1754, Gard. Dict. Abr. ed. 4, 2: [332]. – *Serpyllum* Mill. 1754, Gard. Dict. Abr. ed. 4, 3: [286]. – *Cephalotos* Adans. 1763, Fam. Pl. 2: 189. – **ЧЕБРЕЦЬ.**

**Lectotypus:** *T. vulgaris* L. [Britton & Brown, 1913, Ill. Fl. N. U.S. ed. 2, 3: 141].

#### Ключ для визначення видів

1. Стебла генеративних пагонів опушені по двох протилежних гранях, поперемінно від міжвузля до міжвузля (рис. 1, б), або опушені по всьому периметру (рис. 1, а) .....2  
+ Стебла генеративних пагонів опушені лише по ребрах граней (рис. 1, в) .....5
2. Стебла генеративних пагонів опушені по двох протилежних гранях, поперемінно від міжвузля до міжвузля .....3  
+ Стебла генеративних пагонів опушені по всьому периметру .....4
3. Багаторічні лежачі здерев'янілі (скелетні) пагони закінчуються видовженим лежачим або злегка припіднятим вегетативним пагоном (моноподіальне наростання, рис. 2, а). Листки довгочерешкові, трикутно-овальні, овальні або майже круглі, на поверхні голі або з поодинокими волосками. Жилки листків біля краю листкової пластинки товстішають і зливаються у крайову жилку, що оточує листкову пластинку по периметру (рис. 3, а). Суцвіття компактне, головкоподібне. Віночок лілово-пурпуровий.  $2n$ , 3–7 см. Цв. VI–VIII. ....  
..... *T. pulcherrimus*  
+ Багаторічні лежачі здерев'янілі (скелетні) пагони закінчуються припіднятим генеративним пагоном (симподіальне наростання, рис. 2, б). Листки короткочерешкові, довгасто-еліптичні або еліптичні, на поверхні голі. Жилки листків біля краю листкової пластинки тоншають і не зливаються у крайову жилку (рис. 3, б). Суцвіття на момент початку цвітіння головкоподібне, пізніше більш-менш витягнуте, досить часто розгалужене. Віночок малиновий.  $2n$ , 10–25 см. Цв. VI–VIII. ....  
..... *T. alternans*
- 4 (2). Листки в межах одного генеративного пагона відрізняються за будовою: листки низової та серединної формацій із чітким черешком, зазвичай округло-яйцевидні з найбільшою шириною у верхній третині листкової пластинки; листки верхівкової формації більш-менш сидячі, як правило, еліптичні з найбільшою шириною посередині листкової пластинки (рис. 4). Усі листки на поверхні голі або різною мірою опушені. Суцвіття компактне, головкоподібне або витягнуте. Віночок малиновий.  $2n$ , 10–25 см. Цв. V–VIII. ....  
..... *T. glabrescens*  
+ Листки в межах одного генеративного пагона не відрізняються за будовою, а лише за розміром, усі зі слабо вираженим черешком, еліптичні або довгасто-еліптичні з найбільшою шириною посередині листкової пластинки; на поверхні голі або різною мірою опушені. Суцвіття зазвичай витягнуте, часто розгалужене. Віночок малиновий.  $2n$ , 10–30 см. Цв. V–VIII. ....  
..... *T. pannonicus*

**5 (1).** Багаторічні лежачі здерев'янілі (скелетні) пагони закінчуються видовженим лежачим або злегка припіднятим вегетативним пагоном (моноподіальне наростання, рис. 2, *a*). Листки від овальних до майже круглих. Суцвіття компактне, головкоподібне. Віночок лілово-пурпуровий.  $\bar{L}$ , 5–10 см. Цв. VI–VIII. .... *T. alpestris*  
 + Багаторічні лежачі здерев'янілі (скелетні) пагони закінчуються припіднятим генеративним пагоном (симподіальне наростання, рис. 2, *б*). Листки від овальних до еліптичних. Суцвіття зазвичай витягнуте, колосоподібне, досить часто розгалужене. Віночок ліловий.  $\bar{L}$ , 10–30 см. Цв. VI–VIII. .... *T. pulegioides*

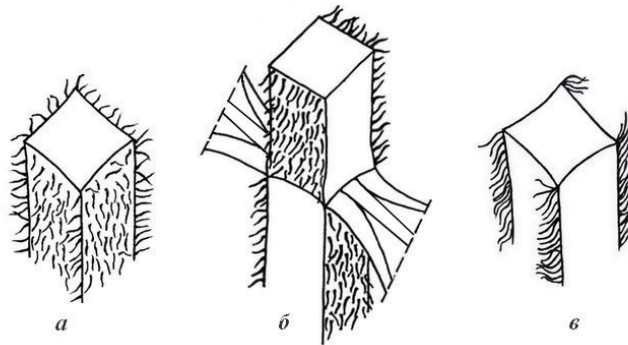


Рис. 1. Характер опушення стебла генеративного пагона у представників роду *Thymus*: *a* – по всьому периметру; *б* – по двох протилежних гранях, поперемінно від міжвузля до міжвузля; *в* – лише по ребрах граней.

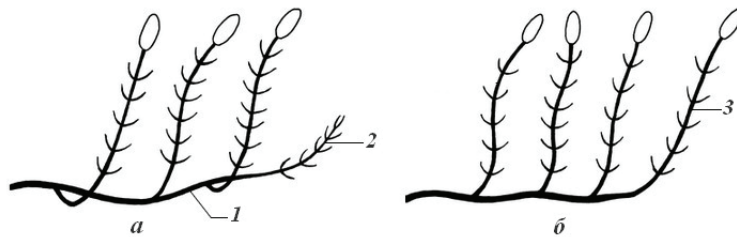


Рис. 2. Схеми моноподіального (*a*) та симподіального (*б*) типів наростання пагонових систем у представників роду *Thymus*: 1 – скелетний пагін; 2 – вегетативний пагін; 3 – генеративний пагін.

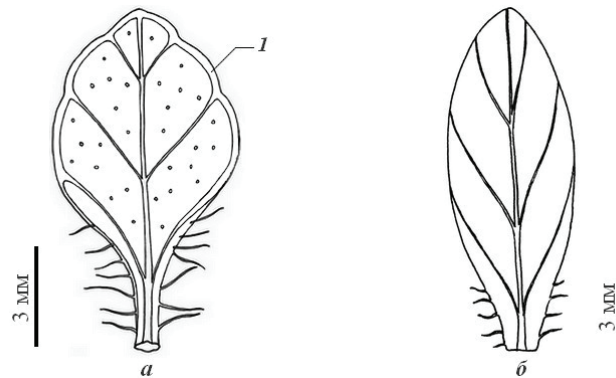


Рис. 3. Загальний вигляд листків *T. pulcherrimus* (*a*) та *T. alternans* (*б*): 1 – крайова жилка.



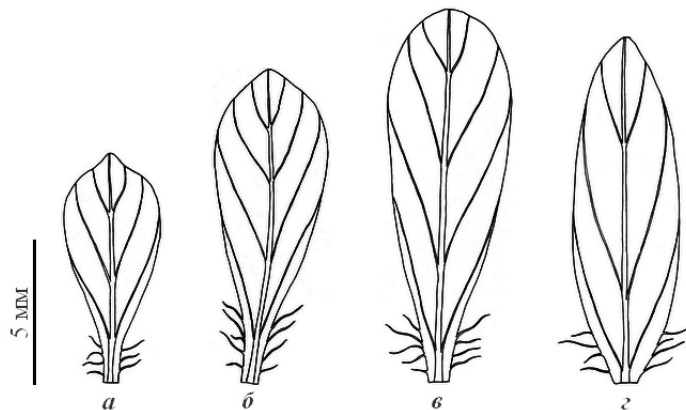


Рис. 4. Листкова серія генеративного пагона *T. glabrescens*: а – листок низової формації; б, в – листки серединної формації; з – листок верхівкової формації.

Sect. **Marginati** (A. Kern.) A. Kern. 1881, Sched. Fl. Exsicc. Austro-Hung. 1: 57 ('*Marginatae*'). – *Marginatae* A. Kern. 1874, Oesterr. Bot. Z. 24: 185, stat. indefin. – Sect. *Suberecti* Velen. 1904, Sitzungsber. Königl. Böhm. Ges. Wiss., Math.-Naturwiss. Cl. 28: 12, 13, p. p. – Sect. *Pseudorepentes* Velen. 1904, Sitzungsber. Königl. Böhm. Ges. Wiss., Math.-Naturwiss. Cl. 28: 11, 15, p. p. – Sect. *Repentes* Velen. 1904, Sitzungsber. Königl. Böhm. Ges. Wiss., Math.-Naturwiss. Cl. 28: 11, 19, p. p. – Sect. *Goniothymus* Klokov, 1954, Бот. мат. (Ленинград), 16: 293. – Sect. *Verticillati* Klokov, 1954, Бот. мат. (Ленинград), 16: 297, p. p. – Sect. *Kotschyani* Klokov, 1954, Бот. мат. (Ленинград), 16: 314, p. max. p. – Sect. *Serpyllum* (Pers.) Duby subsect. *Isolepides* (Borbás) Halácsy, emend. Jalas, 1971, Bot. J. Linn. Soc. 64, 2: 207, p. p., typo excl.

**Holotypus:** *T. marginatus* A. Kern., non Sm. ex Dickson (= *T. bihoriensis* Jalas) [A. Kern. 1874, Oesterr. Bot. Z. 24: 185].

Subsect. 1. **Marginati:** Меницкий, 1973, Бот. журн. 58, 7: 988. – Sect. *Goniothymus* Klokov subsect. *Alternantes* Klokov, 1954, Бот. мат. (Ленинград), 16: 293. – Sect. *Goniothymus* Klokov subsect. *Goniotrichi* (Borbás) Klokov, 1954, Бот. мат. (Ленинград), 16: 296, nom. inval. – Sect. *Kotschyani* Klokov, 1954, Бот. мат. (Ленинград), 16: 314, p. max. p. – Sect. *Serpyllum* (Pers.) Duby subsect. *Pseudopiperella* Jalas, 1971, Bot. J. Linn. Soc. 64, 2: 209, '*Pseudopiperellae*'. – Sect. *Serpyllum* (Pers.) Duby subsect. *Insulares* Jalas, 1971, Bot. J. Linn. Soc. 64, 2: 209. – Sect. *Serpyllum* (Pers.) Duby subsect. *Pseudomarginati* (H. Braun ex Borbás) Jalas, 1971, Bot. J. Linn. Soc. 64, 2: 210, p. p.

**Holotypus:** holotypus sectionis.

1. ***T. pulegioides*** L. 1753, Sp. Pl.: 592; Клоков, 1954, Фл. СССР, 21: 487; Pawł. 1966, Fragm. Florist. Geobot. 12: 398; id. 1967, Fragm. Florist. Geobot. 13: 30; id. 1967, Fl. Polsk. 11: 193; Jalas, 1972, Fl. Eur. 3: 182; Фодор, 1974, Фл. Закарп.: 127; Меницкий, 1978, Фл. европ. части СССР, 3: 201; Барбарич, 1987, Опред. высш. раст. Укр.: 312. – *T. pulegioides* L. subsp. *montanus* (Benth.) Ronniger, 1930, Repert. Spec. Nov. Regni Veg. Beih. 30, 2: 371; Тасенкевич, 1998, Наук. зап. ДПМ, 14: 124; Tassenkevich, 1998, Fl. Carpath.: 309. – *T. pulegioides* L. subsp. *pulegioides*: Ronniger, 1930, Repert. Spec. Nov. Regni Veg. Beih. 30, 2: 371; Pawł. 1966, Fragm. Florist. Geobot. 12: 398; id. 1967, Fl. Polsk. 11: 195. – *T. pulegioides* L. subsp. *chamaedrys* (Fr.) Guşul. in Săvul. 1961, Fl. Reipubl. Popul. Roman. 8: 319; Тасенкевич, 1998, Наук. зап. ДПМ, 14: 124; Tassenkevich, 1998, Fl. Carpath.: 309. – *T. serpyllum* auct. non L. 1753: Zaw. 1835, Enum. Pl. Galic. Bucow.: 72, p. p.; Hückel, 1865, Verh. K.K. Zool.-Bot. Ges. Wien, 15: 56, 64,

p. p.; id. 1866, Verh. K.K. Zool.-Bot. Ges. Wien, 16: 29, 31, 57, p. p.; J. A. Knapp, 1872, Pfl. Galiz.: 194, p. p.; Woł., 1893, Spraw. Komis. Fizjogr. 28: 71. – *T. ovatus* Mill. 1768, Gard. Dict. ed. 8: [1140]; Попов, 1949, Оч. растит. и фл. Карп.: 229; Термена та ін., 1992, Конспект фл. Пн. Буковини: 121; Ткачик, 2000, Фл. Прикарп.: 216. – *T. montanus* Waldst. & Kit. 1802, Descr. Icon. Pl. Rar. Hung. 1: 72, nom. illegit.; Zaw. 1835, Enum. Pl. Galic. Bucow.: 72; Zapał. 1889, Spraw. Komis. Fizjogr. 24: 272, p. p.; Woł., 1893, Spraw. Komis. Fizjogr. 28: 71; Фодор, 1974, Фл. Закарп.: 127. – *T. chamaedrys* Fr. 1814, Novit. Fl. Suec.: 35; Błocki, 1885, Oesterr. Bot. Z. 35: 36; Pacz. 1898, Spraw. Komis. Fizjogr. 33: 75. – *T. serpyllum* L. var. *glabratus* auct. non Wimm. & Grab. 1829; Hückel, 1866, Verh. K.K. Zool.-Bot. Ges. Wien, 16: 29, 57. – *T. ucrainicus* (Klokov & Des.-Shost.) Klokov, 1954, Фл. СССР, 21: 486; id. 1960, Фл. УРСР, 9: 303; id. 1965, Визн. росл. Укр.: 578; М'якушко, 1977, Визн. росл. Укр. Карп.: 256. – *T. enervius* Klokov, 1954, Бот. мат. (Ленинград), 16: 296; id. 1954, Фл. СССР, 21: 488; id. 1960, Фл. УРСР, 9: 306; id. 1965, Визн. росл. Укр.: 578; М'якушко, 1977, Визн. росл. Укр. Карп.: 256. – **Ч. блошиний**,  $2n=28$ .

Вид описаний з території Франції (за протологом: «Habitat Monspelii»).

**Lectotypus:** Herb. Linn. No. 38.5, *LINN* [Ronniger, 1944, Deutsche Heilpflanze, 10, 5: 37].

На території Українських Карпат вид представлений типовим підвидом:

– ***T. pulegioides*** L. subsp. ***pulegioides***: Ronniger, 1930, Repert. Spec. Nov. Regni Veg. Beih. 30, 2: 371 (= *T. pulegioides* L. subsp. *chamaedrys* (Fr.) Guşul. in Săvul. 1961, Fl. Reipubl. Popul. Roman. 8: 319).

**Lectotypus:** lectotypus speciei.

Л.О. Тасенкевич [14, 34] для флори Українських Карпат наводить також підвид *T. pulegioides* L. subsp. *montanus* (Benth.) Ronniger. Під ним автор розуміє представників виду *T. enervius* Klokov, назву якого часто розглядають таксономічним синонімом назви *T. pulegioides* subsp. *montanus*. Основною діагностичною ознакою *T. enervius* є наявність на листках дуже тонких бічних жилок, що занурені в товщу мезофілу і майже непомітні на абаксіальній поверхні. Для представників *T. pulegioides* subsp. *montanus*, навпаки, характерні листки із товстими, сильно випнутими на абаксіальній поверхні жилками. Досліджений нами голотип *T. enervius*, що зберігається в гербарії Інституту ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України (*KW*), належить до *T. pulegioides* subsp. *pulegioides*, а не до *T. pulegioides* subsp. *montanus*. Тому видову назву *T. enervius* слід вважати таксономічним синонімом назви *T. pulegioides* subsp. *pulegioides*, а інформацію стосовно поширення *T. pulegioides* subsp. *montanus* в Українських Карпатах – помилковою. Ареал *T. pulegioides* subsp. *montanus* охоплює Балканський півострів. Північніше трапляються переважно проміжні форми між цим і типовим підвидом [32]. Тому це ще раз підтверджує сумнівність поширення *T. pulegioides* subsp. *montanus* на досліджуваній території.

**2. *T. alpestris*** (Čelak.) Tausch ex A. Kern. 1881, Sched. Fl. Exsicc. Austro-Hung. 1: 56; Попов, 1949, Оч. растит. и фл. Карп.: 229; Клоков, 1950, Визн. росл. УРСР: 425; Pawł. 1966, Fragm. Florist. Geobot. 12: 399; id. 1967, Fragm. Florist. Geobot. 13: 33; id. 1967, Fl. Polsk. 11: 198; Jalas, 1972, Fl. Eur. 3: 182; Меницкий, 1978, Фл. европ. части СССР, 3: 201; Барбарич, 1987, Опред. высш. раст. Укр.: 312; Термена та ін., 1992, Конспект фл. Пн. Буковини: 120; Тасенкевич, 1998, Наук. зап. ДІМ, 14: 124; Tassenkevich, 1998, Fl. Carpath.: 310. – *T. montanus* auct. non Waldst. & Kit. 1802; Zapał. 1889, Spraw. Komis. Fizjogr. 24: 272, p. p. – *T. serpyllum* L. a. *orbicularis* Wimm. & Grab. 1829, Fl. Siles. 2, 1: 163; Herbich, 1859, Fl. Bucovina: 224, p. p. – *T. serpyllum* L. var. *glabratus* Wimm. & Grab. 1829, Fl. Siles. 2, 1: 163; Hückel, 1865, Verh. K.K. Zool.-Bot. Ges. Wien, 15: 56, 59, p. p. – *T. subalpestris* Klokov, 1954, Бот. мат. (Ленинград), 16: 296; id. 1954, Фл. СССР, 21: 485; id. 1960, Фл. УРСР, 9: 305; id. 1965, Визн.

росл. Укр.: 578; Фодор, 1974, Фл. Закарп.: 127; Чопик, 1976, Високогірна фл. Укр. Карп.: 111; М'якушко, 1977, Визн. росл. Укр. Карп.: 255. – **Ч. альпійський**,  $2n=28$ .

Вид описаний з території Чехії (за протологом: «Silesia. Gesenke. Kräuterreiche Triften des grossen Kessels. Schieferboden, 1300<sup>m</sup>»).

**Lectotypus:** Riesengrund des Riesengebirges, Tausch, Herb. Fl. Bohem. No. 1139, PR 143904/266 [P. Schmidt in Wisskirchen, 1997, Feddes Repert. 108: 109].

Представники виду дуже подібні на представників *T. pulegioides* і важко від них диференціюються. Єдина вагома діагностична ознака – моноподіальне наростання скелетних пагонів, – у *T. alpestris* не завжди може бути виражена чітко на всіх скелетних пагонах. Іноді верхівкова брунька цих пагонів, з якої в подальшому розвивається повзучий вегетативний пагін наступного приросту, може пошкоджуватись під дією різних чинників. Це, у свою чергу, призводить до створення ефекту симподіального наростання. Як правило, такі пошкодження можна виявити при ретельному огляді скелетних пагонів. Тому слід бути уважним при визначенні матеріалу, особливо при роботі з гербарними зразками, які зазвичай репрезентують лише невеликі та часто неповні фрагменти пагонових систем.

Іноді диференціювати *T. alpestris* і *T. pulegioides* можна за особливостями їх висотного розподілу. *T. alpestris* трапляється у субальпійському й альпійському висотних поясах, зазвичай вище 1000 м н. р. м. Натомість *T. pulegioides* рідко трапляється вище 1000 м н. р. м. Однак цей критерій не завжди є об'єктивним і обов'язково має застосовуватись у комплексі з діагностичними ознаками.

**3. *T. alternans*** Klokov, 1954, Бот. мат. (Ленинград), 16: 293; id. 1954, Фл. СССР, 21: 481; id. 1960, Фл. УРСР, 9: 302; id. 1965, Визн. росл. Укр.: 578; Pawł. 1966, Fragm. Florist. Geobot. 12: 400; id. 1967, Fl. Polsk. 11: 201; Jalas, 1972, Fl. Eur. 3: 182; Фодор, 1974, Фл. Закарп.: 127; М'якушко, 1977, Визн. росл. Укр. Карп.: 255; Меницкий, 1978, Фл. европ. части СССР, 3: 201; Барбарич, 1987, Опред. высш. раст. Укр.: 311; Термена та ін., 1992, Конспект фл. Пн. Буковини: 120; Тасенкевич, 1998, Наук. зап. ДПМ, 14: 124; Tasenkevich, 1998, Fl. Carpath.: 310; Ткачик, 2000, Фл. Прикарп.: 216. – *T. marschallianus* auct. non Willd. 1800: Фодор, 1974, Фл. Закарп.: 127, р. р. – *T. glabrescens* auct. non Willd. 1811: Попов, 1949, Оч. растит. и фл. Карп.: 229; Фодор, 1974, Фл. Закарп.: 127, р. р. – *T. serpyllum* L. f. *margittaianus* auct. non Lyka in Jav. 1925: Фодор, 1974, Фл. Закарп.: 127. – **Ч. чергововолосистий**,  $2n=56$ .

Вид описаний з території України (за протологом: «RSSUcr., dit. Transcarpatica, distr. Irshaviensis, prope p. Sucha Bronjka, mons Javorova, in declivio austro-orientali»).

**Holotypus:** RSSUcr., dit. Transcarpatica, distr. Irshaviensis, prope p. Sucha Bronjka, mons Javorova, in declivio austro-orientali, 9. 07. 1946, N. Kossetz, KW [Klokov, 1954, Бот. мат. (Ленинград), 16: 294] (у фондах KW зразок не виявлено).

Представники *T. alternans* досить подібні за габітусом на представників *T. pannonicus* та *T. pulegioides* і займають проміжне положення між ними. Ознака, яка чітко відрізняє *T. alternans* від двох останніх видів, – опушення стебла генеративного пагона по двох протилежних гранях, поперемінно від міжвузля до міжвузля, – іноді проявляється у гібридів *T. pannonicus* × *T. pulegioides*. Тому деякі дослідники [31] вважають, що в ході еволюції *T. alternans* міг виникнути шляхом гібридизації між *T. pannonicus* та *T. pulegioides*.

**4. *T. pulcherrimus*** Schur, 1859, Verh. Siebenb. Ver. Naturw. 10: 140; Pawł. 1966, Fragm. Florist. Geobot. 12: 401; id. 1967, Fl. Polsk. 11: 205; Jalas, 1972, Fl. Eur. 3: 182; Меницкий, 1978, Фл. европ. части СССР, 3: 201; Барбарич, 1987, Опред. высш. раст. Укр.: 311; Тасенкевич, 1998, Наук. зап. ДПМ, 14: 124. – *T. pulcherrimus* Schur subsp. *pulcherrimus*: P. A. Schmidt, 1973, Feddes Repert. 83: 669; Tasenkevich, 1998, Fl. Carpath.: 309. – *T. montanus* auct. non Waldst. & Kit. 1802: Zapał. 1889, Spraw. Komis. Fizjogr. 24: 272, р. р. – *T. sudeticus* auct.

non Opiz ex Borbás, 1890; Клоков, 1950, Визн. росл. УРСР: 425. – *T. circumcinctus* Klokov, 1954, Бот. мат. (Ленинград), 16: 294; id. 1954, Фл. СССР, 21: 481; id. 1960, Фл. УРСР, 9: 301; id. 1965, Визн. росл. Укр.: 578; Чопик, 1976, Високогірна фл. Укр. Карп.: 111; М'якушко, 1977, Визн. росл. Укр. Карп.: 255. – **Ч. найкрасивіший**,  $2n=56$ , 60.

Вид описаний з території Румунії (за протологом: «Rodna, seine Gebirge und Umgegend... Das Kuhhorn (Ünökö, wal. Ineo)...»).

**Lectotypus:** In monte Kuhhorn prope Rodna, Juli 1853, 6000', Dr Schur, *LW* [Меницький, 1978, Фл. европ. части СССР, 3: 201 (?)].

На території Українських Карпат вид представлений лише типовим підвидом, для якого характерне хромосомне число  $2n=60$ :

– *T. pulcherrimus* Schur subsp. *pulcherrimus*: P. A. Schmidt, 1973, Feddes Repert. 83: 669.

**Lectotypus:** lectotypus speciei.

Subsect. 2. *Verticillati* (Klokov & Des.-Shost.) Menitsky, 1973, Бот. журн. 58, 7: 991. – *Verticillati* Klokov & Des.-Shost. 1927, Тр. Сільськ.-госп. Ком. Укр., бот. секц.: 113, stat. indefin. – Sect. *Verticillati* (Klokov & Des.-Shost.) Klokov, 1954, Бот. мат. (Ленинград), 16: 297. – Sect. *Pseudorepentes* Velen. 1904, Sitzungsber. Königl. Böhm. Ges. Wiss., Math.-Naturwiss. Cl. 28: 11, 15, p. p. – Sect. *Serpyllum* (Pers.) Duby subsect. *Isolepides* (Borbás) Halácsy, emend. Jalas, 1971, Bot. J. Linn. Soc. 64, 2: 207, p. p., typo excl. – Sect. *Serpyllum* (Pers.) Duby subsect. *Pseudomarginati* (H. Braun ex Borbás) Jalas, 1971, Bot. J. Linn. Soc. 64, 2: 210, p. p., typo excl.

**Holotypus:** *T. marschallianus* Willd. (= *T. pannonicus* All.) [Меницький, 1973, Бот. журн. 58, 7: 991].

**5. *T. pannonicus*** All. 1773, Auct. Syn. Meth. Stirp. Hort. Regii Taur.: 6; Jalas, 1972, Fl. Eur. 3: 179. – *T. serpyllum* auct. non L. 1753: J. A. Knapp, 1872, Pfl. Galiz.: 194, p. p. – *T. marschallianus* auct. non Willd. 1800: Фодор, 1974, Фл. Закарп.: 127, p. p. – *T. kosteleckyanus* Opiz, 1825, Naturalientausch, 9: 104; Pawł. 1967, Fl. Polsk. 11: 177. – *T. × oblongifolius* auct. non Opiz, 1825: Термена та ін., 1992, Конспект фл. Пн. Буковини: 121, 216; Ткачик, 2000, Фл. Прикарп.: 216. – *T. podolicus* Klokov & Des.-Shost. 1936, Журн. Інст. бот. АН УРСР, 9(17): 193, p. max. p.; М'якушко, 1977, Визн. росл. Укр. Карп.: 255. – *T. amictus* Klokov, 1954, Бот. мат. (Ленинград), 16: 297; М'якушко, 1977, Визн. росл. Укр. Карп.: 255; Термена та ін., 1992, Конспект фл. Пн. Буковини: 120, 216; Ткачик, 2000, Фл. Прикарп.: 216. – **Ч. паннонський**,  $2n=28$ .

Вид описаний з території Європи (sine loco).

**Lectotypus:** [Icon] *Serpyllum pannonicum* III, Clus., 1583, Rar. Stirp. Pannon.: 627 [Thell. ex Ronniger, 1927, Ann. Soc. Cult. Comit. Castriferrei Civit. Sabariae Mus. Comit. Castriferrei, 2: 242].

Для представників *T. pannonicus* характерна значна пластичність у вегетативній сфері та наявність форм з опушеними і голими листками. У минулому ці форми неодноразово розглядались у складі різних видів: *T. marschallianus*, *T. latifolius* (Besser) Andr., *T. podolicus* (голі форми); *T. pannonicus* s. str., *T. kosteleckyanus*, *T. amictus* (опушені форми). На сьогодні опушені та голі форми розглядаються деякими авторами в ранзі різновидностей: *T. pannonicus* var. *pannonicus*: Jalas, 1974, Ann. Bot. Fenn. 11: 264 і *T. pannonicus* var. *latifolius* (Besser) Jalas, 1974, Ann. Bot. Fenn. 11: 264, відповідно [27, 33]. У роботі V. Ciocârlan [22] цим формам надається ранг підвидів, однак наведені автором номенклатурні комбінації не відповідають вимогам Міжнародного кодексу номенклатури водоростей, грибів і рослин [29].

У «Визначнику рослин Українських Карпат» [2] *T. pannonicus* під синонімічними назвами *T. podolicus* і *T. amictus* помилково наводиться для території дослідження, оскільки



ки цитується з локалітетів, які до неї не належать [11]. Проведені польові дослідження та опрацьовані гербарні зразки підтверджують спорадичне поширення *T. pannonicus* (*T. podolicus* auct. та *T. amictus* auct.) на території Прикарпаття і Закарпатської низовини.

У деяких флористичних роботах [15, 16] для території Прикарпаття наводиться *T. × oblongifolius* Opiz. У цих роботах, відповідно до номенклатурного списку С. К. Черепанова [19], назва *T. × oblongifolius* використовується як пріоритетна назва для таксону *T. podolicus*. Насправді ототожнення представників *T. podolicus* із представниками *T. × oblongifolius* є неправильним. *T. × oblongifolius* – нотовид, що становить собою гібрид між *T. pulegioides* та *T. serpyllum* L. На досліджуваній території *T. serpyllum* не представлений, хоча деякі дослідники [18; див. також 14, 34] помилково наводять його для флори регіону. З цих причин виключеним є поширення тут гібриду *T. pulegioides* × *T. serpyllum*, типового для оселищ, у яких наявні обидва батьківські види. Напівкущики *T. pannonicus* характеризуються сезонним диморфізмом [3]. У зв'язку з цим представники цього виду в другій половині літа за габітусом дуже схожі на представників *T. × oblongifolius*. Опрацювання серійного автентичного матеріалу *T. podolicus* в гербарії Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України (KW) свідчить про те, що *T. podolicus* у більшості випадків становить собою форми *T. pannonicus* (*T. marschallianus* auct.). Тому видову назву *T. podolicus* слід розглядати як таксономічний синонім *T. pannonicus* [12].

**6. *T. glabrescens*** Willd. 1811, Berlin. Baumz., ed. 2: 507; Pawł. 1967, Fragm. Florist. Geobot. 13: 22; id. 1967, Fl. Polsk. 11: 182; Jalas, 1972, Fl. Eur. 3: 179; Фодор, 1974, Фл. Закарп.: 127, р. р.; Тасенкевич, 1998, Наук. зап. ДПМ, 14: 124. – *T. glabrescens* Willd. subsp. *glabrescens*: Domin, 1935, Preslia, 13-15: 197; Tasekewich, 1998, Fl. Carpath.: 308. – *T. loevyanus* Opiz, 1825, Naturalientausch, 9: 105; Клоков, 1960, Фл. УРСР, 9: 324. – **Ч. оголений**,  $2n=56$ .

Вид описаний з території ботанічного саду в м. Берлін на основі матеріалу з Угорщини (за протологом: «Wächst in Ungarn»).

**Neotypus:** Hort. bot. Berol., HAL 14128 [P. Schmidt, 1973, Feddes Repert. 83: 667].

Представники цього виду дуже подібні за габітусом на представників *T. pannonicus*, хоча чітко відрізняються від останніх удвічі більшим хромосомним числом. Аналогічно до попереднього виду, у *T. glabrescens* наявні опушені (описувались як *T. austriacus*, *T. pilosus* Opiz) та голі (описувались як *T. glabrescens* s. str., *T. loevyanus*) форми. На сьогодні існують різні підходи до інтерпретації таксономічного рангу цих форм. Деякі автори розглядають їх у ранзі різновидностей: *T. glabrescens* var. *glabrescens*: Căp, 1990, Biologia (Bratislava), 45: 405 (голі форми) та *T. glabrescens* var. *pilosus* (Opiz) Căp, 1990, Biologia (Bratislava), 45: 405 (опушені форми) [27, 33]. У роботі V. Ciocârlan [22] цим формам надається ранг підвидів, однак наведені автором номенклатурні комбінації є суперечливими з точки зору правил ботанічної номенклатури [29].

У межах роду *Thymus* типовим є явище гібридизації. Тому в оселищах, у яких представлені два і більша кількість видів роду, як правило, наявні і їхні гібриди. За габітусом гібридні форми є проміжними між представниками батьківських видів, проявляючи морфологічні ознаки, характерні для кожного з них. Тому наявність гібридів спотворює чіткі межі між окремими видами роду *Thymus* і ускладнює їхню ідентифікацію. Встановлення гібридних форм на основі гербарних зразків зазвичай є складним і значною мірою умовним. Значно легше їх ідентифікувати у природі. У цьому випадку в одному оселищі поряд із гібридом, який має нетиповий прояв морфологічних ознак, обов'язково наявні форми батьківських видів, чітко детерміновані комплексом діагностичних ознак. Іноді представники батьківських видів можуть бути віддалені просторово на відстань, на якій забезпе-

чується ефективне перенесення пилку. В цьому випадку, зважаючи на незначні відстані поширення насіння у представників роду *Thymus*, гібрид завжди росте неподалік однієї з батьківських форм, яка є стосовно нього материнською.

На сьогодні для території Українських Карпат нами встановлені такі гібридні форми:

1. *T. alpestris* (Čelak.) Tausch ex A. Kern. × *T. pulegioides* L. – *T. × pseudoalpestris* Ronniger ex Ferd. Weber in Němec & al. 1958, Opiz u. seine Bedeut. Pflanzentaxon.: 248, nom. inval.

2. *T. alpestris* (Čelak.) Tausch ex A. Kern. × *T. pulcherrimus* Schur subsp. *pulcherrimus*.

3. *T. alternans* Klokov × *T. pulegioides* L.

4. *T. × porcii* Borbás, 1890, Math. Term. Közlem. 24: 46, 92 (pro *T. marschallianus* Willd. × *T. montanus* Waldst. & Kit.) = *T. pannonicus* All. × *T. pulegioides* L.

5. *T. pulcherrimus* Schur subsp. *pulcherrimus* × *T. pulegioides* L.

Не виключеним є поширення на досліджуваній території також гібридів *T. × sparsipilus* Borbás, 1890, Math. Term. Közlem. 24: 46, 94 (pro *T. lanuginosus* Mill. × *T. marschallianus* Willd.) = *T. glabrescens* Willd. × *T. pannonicus* All. та *T. × radoi* Borbás, 1887, Geogr. Enum. Pl. Comit. Castriferrei: 215 (pro *T. collinus* M. Bieb. × *T. subcitratus* Schreb.) = *T. glabrescens* Willd. × *T. pulegioides* L. Представників першого з цих нотовидів важко відрізнити від представників *T. glabrescens* і *T. pannonicus*. Рослини ж *T. × radoi* не мають чітких морфологічних відмінностей від гібриду *T. × porcii*. Тому ефективне визначення форм *T. × sparsipilus* і *T. × radoi* можливе лише при порівнянні їхніх морфологічних і цитологічних (кількість хромосом) ознак.

Таким чином, таксономічне різноманіття роду *Thymus* у флорі Українських Карпат на сьогодні представлене однією секцією, двома підсекціями, шістьма видами та п'ятьма нототаксонами. Два види: *T. pulcherrimus* Schur та *T. pulegioides* L. репрезентовані типовими підвидами.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Барбарич А. И. Род 35. Тимьян (Чебрець) – *Thymus* L. // Определитель высших растений Украины / отв. ред. Ю.Н. Прокудин. К.: Наук. думка, 1987. С. 311–312.
2. Визначник рослин Українських Карпат / відпов. ред. В.І. Чопик. К.: Наук. думка, 1977. 434 с.
3. Гогина Е. Е. Изменчивость и формообразование в роде Тимьян. М.: Наука, 1990. 208 с.
4. Клоков М. В. 32. Чебрець. *Thymus* L. // Визначник рослин УРСР / за ред. М.В. Клокова. Київ; Харків: Держсільгоспвидав, 1950. С. 425–429.
5. Клоков М. В. Род 1299. Тимьян – *Thymus* L. // Флора СССР. Т. 21. М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1954. С. 470–591.
6. Клоков М. В. Рід 748. Чебрець – *Thymus* L. // Флора УРСР. Т. 9. К.: Вид-во АН УРСР, 1960. С. 294–348.
7. Клоков М. В. 35. Чебрець. – *Thymus* L. // Визначник рослин України / за ред. Д.К. Зерова. К.: Урожай, 1965. С. 577–581.
8. Меницкий Ю. Л. Надвидовые таксоны рода *Thymus* L. (*Labiatae*). I // Бот. журнал. 1973. Т. 58. № 6. С. 794–805.
9. Меницкий Ю. Л. Надвидовые таксоны рода *Thymus* L. (*Labiatae*). II // Бот. журнал. 1973. Т. 58. № 7. С. 988–994.
10. Меницкий Ю. Л. Род 35. Тимьян – *Thymus* L. // Флора Европейской части СССР. Т. 3. Л.: Наука, 1978. С. 191–204.



11. Начичко В. О. Огляд видів роду *Thymus* L. (*Lamiaceae* Lindl.) Українських Карпат // Актуальні проблеми дослідження довкілля: зб. наук. праць (за матер. IV Всеукр. наук. конф. з міжнар. участю для молод. учених, 19–21 травня 2011 р., м. Суми). Суми, 2011. С. 101–105.
12. Начичко В. О. Рід *Thymus* L. (*Labiatae* Juss.) у флорі Волино-Поділля // Наук. вісн. Чернів. ун-ту. Біологія (Біол. системи). 2011. Т. 3. Вип. 3. С. 291–297.
13. Попов М. Г. Очерк растительности и флоры Карпат. М.: Изд-во МОИП, 1949. 303 с.
14. Тасенкевич Л. О. Природна флора української частини Східних Карпат: таксономічний склад // Наук. записки ДПМ. 1998. Т. 14. С. 109–141.
15. Термена Б. К., Стефаник В. І., Серпокрилова Л. С. та ін. Конспект флори Північної Буковини (судинні рослини). Чернівці, 1992. 227 с.
16. Ткачик В. П. Флора Прикарпаття. Львів: НТШ, 2000. 254 с.
17. Тях Ю. Ю., Зиман С. М., Дербак М. Ю. Рослинний покрив національного природного парку «Синевир» (Українські Карпати). Ужгород: Ліра, 2011. 160 с.
18. Фодор С. С. Флора Закарпаття. Львів: Вища школа, 1974. 208 с.
19. Черепанов С. К. Сосудистые растения СССР. Л.: Наука, 1981. 510 с.
20. Чоник В. І. Високогірна флора Українських Карпат. К.: Наук. думка, 1976. 269 с.
21. Чорней І. І., Буджак В. В., Якушенко Д. М. та ін. Національний природний парк «Вишницький». Рослинний світ. К.: Фітосоціоцентр, 2005. 248 с.
22. Ciocârlan V. 28. *Thymus* L. – Cîmbru, Cîmbrișor // Flora ilustrată a României: Pteridophyta et Spermatophyta. București: Ceres, 2009. P. 662–667.
23. Herbig F. Flora der Bucovina. Leipzig, 1859. 460 S.
24. Jalas J. Chromosome studies in *Thymus*. I. Somatic chromosome numbers with special reference to the Fennoscandian forms // Hereditas. 1948. Vol. 34. P. 414–434.
25. Knapp J. A. Die bisher bekannten Pflanzen Galiziens und der Bukowina. Wien, 1872. 520 S.
26. Mártonfi P. Nomenclatural survey of the genus *Thymus* sect. *Serpyllum* from Carpathians and Pannonia // Thaiszia – J. Bot. 1997. Vol. 7. P. 111–181.
27. Mártonfi P. Tabul'kový kl'úč, taxonomické a nomenklatorické poznámky k rodu *Thymus* L. v karpatsko-panónskej oblasti // Bull. Slov. Bot. Spoločn. 1998. Vol. 20. S. 58–64.
28. Mártonfi P., Mártonfióva L. *Thymus* chromosome numbers from Carpathians and Pannonia // Thaiszia – J. Bot. 1996. Vol. 6. P. 25–38.
29. McNeill J., Barrie F. R., Buck W. R. et al. International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Melbourne Code), adopted by the Eighteenth International Botanical Congress Melbourne, Australia, July 2011. Königstein: Koeltz Scientific Books, 2012. 238 p.
30. Paczoski J. Szkic flory i spis roślin zebranych we wschodniej Galicyi, na Bukowinie i w Komitacie marmaroskim na Węgrzech // Spraw. Komis. Fizjogr. 1898. T. 33. S. 1–106.
31. Pawłowski B. Observationes ad *Thymos* polonicos et nonnullus ucrainicos pertinentes // Fragm. Florist. Geobot. 1966. Ann. 12. Pars 4. P. 387–412.
32. Pawłowski B. *Thymus* L., Mazierzanka // Flora Polska. T. 11. Warszawa, Krakow: PWN, 1967. S. 167–210.
33. Štěpánek J., Tomšovic P. 29. *Thymus* L. – mateřidouška // Květena České Republiky. Vol. 6. Praha: Academia, 2000. S. 656–669.
34. Tassenkevich L. Flora of the Carpathians. Checklist of the native vascular plant species. Lviv, 1998. 623 p.
35. Trela-Sawicka Z. Badania cytologiczne nad rodzajem *Thymus* L. – Cytological investigations in the genus *Thymus* L. // Acta Biol. Cracov. Ser. Bot. 1968. Vol. 11. P. 59–69.

36. Zapalowicz H. Roslinna szata gor Pokucko-Marmaroskich // Spraw. Komis. Fizjogr. 1889. T. 24. S. 1–390.
37. Zawadzki A. Enumeratio plantarum Galiciae & Bucowinae, oder die in Galizien und der Bukowina wildwachsenden Pflanzen. Breslau, 1835. 200 S.

Стаття: надійшла до редакції 30.09.13

доопрацьована 15.11.13

прийнята до друку 19.11.13

## THE GENUS *THYMUS* L. (*LABIATAE* JUSS.) IN THE UKRAINIAN CARPATHIANS' FLORA: SYSTEMATICS AND TAXONOMIC PROBLEMS

V. Nachychko

Ivan Franko National University of Lviv  
4, Hrushevskiyi St., Lviv 79005, Ukraine  
e-mail: nachichko@rambler.ru

The paper contains the results of a critical and taxonomic revision of the genus *Thymus* L. in the Ukrainian Carpathians' flora. The list of *Thymus* taxa known on this territory is presented. It includes one section, two subsections, six species and five nothotaxa. Two species: *T. pulcherrimus* Schur and *T. pulegioides* L. are represented by typical subspecies. For each species the nomenclatural citation, basic literature, main synonyms, chromosome number, type specimen and critical notes are given. The identification key to species of *Thymus* is proposed.

*Keywords:* *Thymus* L., systematics, the Ukrainian Carpathians.

## РОД *THYMUS* L. (*LABIATAE* JUSS.) ВО ФЛОРЕ УКРАИНСКИХ КАРПАТ: СИСТЕМАТИКА И ТАКСОНОМИЧЕСКИЕ ПРОБЛЕМЫ

В. Начычко

Львовский национальный университет имени Ивана Франко  
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина  
e-mail: nachichko@rambler.ru

Приведены результаты критико-таксономического исследования рода *Thymus* L. во флоре Украинских Карпат. Представлен конспект рода, включающий одну секцию, две подсекции, шесть видов и пять нототаксонов. Два вида: *T. pulcherrimus* Schur и *T. pulegioides* L. репрезентированы типовыми подвидами. Для каждого вида приводятся номенклатурная цитата, базовая литература, основные синонимы, хромосомное число, типовой образец и критические примечания. Предложен ключ для определения видов.

*Ключевые слова:* *Thymus* L., систематика, Украинские Карпаты.

ГЕНЕТИКА

УДК: 577.21:631.526.32:635.657

**ГЕНЕТИЧНА СТРУКТУРА КОЛЕКЦІЇ СОРТІВ НУТУ ЗА  
МОРФОЛОГІЧНИМИ ТА МОЛЕКУЛЯРНИМИ МАРКЕРАМИ**

**Г. Акініна, В. Попов**

*Інститут рослинництва імені В.Я. Юр'єва  
пр. Московський, 142, Харків 61060, Україна  
e-mail: gakinina@gmail.com*

Оцінена генетична структура колекції сортів нуту з Азії, Америки та Європи за поліморфізмом 15 морфологічних ознак і 13 мікросателітних локусів. Показаний подібний рівень різноманіття сортів нуту за морфологічними ознаками та мікросателітними локусами, оцінений за індексом різноманіття Шеннона. Візначено рідкісні ознаки, характерні для дослідженої вибірки сортів нуту. Виділені ознаки, які є диференціюючими в сортах нуту. Обговорюються особливості групування сортів у кластери.

*Ключові слова:* нут, мікросателіти, морфологічні ознаки, індекс різноманіття Шеннона, генетична структура.

Мінливість зразків генетичних колекцій нуту описують за морфологічними ознаками [13, 14], поліморфізмом запасних білків [7] та ізоферментів [4], а також різними типами ДНК-маркерів, таких як RAPD [9], RFLP [12], AFLP [16], ISSR [5, 9], SSR [8, 10, 11, 15]. Проте більшість зазначених маркерних систем мають незначну мінливість у сортах культурного нуту. Разом з тим, SSR (мікросателітні) маркери виявляли значний поліморфізм у сортах нуту [8, 15]. Саме цими маркерами найбільш насичені сучасні геномні карти нуту [17]. Секвенування генома культурного нуту показало, що ДНК цього виду містить 81 845 мікросателітних повторів, до 48 298 є можливість підібрати специфічні праймери та використовувати їх як маркери [18]. Таким чином, SSR маркери є корисним ресурсом для вивчення мінливості сортозразків культурного нуту, пошуку та картування генів-кандидатів агрономічно важливих ознак, маркерної селекції тощо.

При цьому наукові дані з вивчення генетичної структури сортів нуту з колекції Національного центру генетичних ресурсів рослин України (НЦГРРУ) за молекулярними маркерами в літературі відсутні.

У зв'язку з цим метою даної роботи стало вивчення генетичної структури колекції сортів нуту з різних країн світу за поліморфізмом морфологічних ознак і мікросателітних локусів.

**Матеріали та методи**

Об'єктами дослідження були сорти нуту з Європи (Україна, Росія, Молдова, Іспанія, Італія, Угорщина, Чехія), Азії (Індія, Іран, Узбекистан) і Америки (США, Канада), отримані в НЦГРРУ (м. Харків). Всього 118 зразків. Репрезентативні вибірки сортів нуту з кожної країни становили 9–12 зразків. Сорти нуту з Італії, Угорщини, Чехії внаслідок їх нечисленності в колекції були об'єднані в загальну групу сортів – інші європейські країни (ІСК).

Оцінку генетичної структури колекції сортів нуту проводили за 15 морфологічними ознаками, які включали забарвлення стебла, ознаки листка (забарвлення, розмір листочків, форма листочків), квітки (розмір, забарвлення), зрілого боба (забарвлення, форма, довжина, ширина) та насіння (форма, особливості поверхні, забарвлення, маса 1000 насінин), форму рослини, а також за 13 мікросателітними локусами, що були описані іншими авторами як поліморфні (CaSTMS 10, CaSTMS 14, CaSTMS 25, NCPGR 21, NCPGR41, NCPGR 50, NCPGR51, NCPGR52, NCPGR55, NCPGR57, NCPGR81, NCPGR90, NCPGR94) [8, 11].

Опис морфологічних ознак досліджуваних сортів нуту був люб'язно наданий авторам старшим науковим співробітником Національного центру генетичних ресурсів рослин України (м. Харків) О. М. Безуглою.

Виділення ДНК, проведення полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) та електрофорез продуктів ампліфікації описано в попередніх роботах [1–3].

Частоти морфологічних ознак і мікросателітних локусів розраховували у програмі Excel за допомогою надбудови Microsatellite Tools for Excel (<http://animalgenomics.ucd.ie/sdeparc/ms-toolkit>).

Класифікацію сортів нуту здійснювали за допомогою кількісного кластерного аналізу в програмі Structure 2.3.4 ([http://pritch.bsd.uchicago.edu/structure\\_software/release\\_versions/v2.3.4/html/structure.html](http://pritch.bsd.uchicago.edu/structure_software/release_versions/v2.3.4/html/structure.html)). Достовірну кількість кластерів визначали за допомогою математичного алгоритму, запропонованого Evanno et al., 2005 [6].

### Результати і їхнє обговорення

**Поліморфізм морфологічних ознак у сортах нуту.** Всі вивчені морфологічні ознаки були поліморфні в сортах нуту. Кількість градацій прояву кожної ознаки варіювала від 2 (забарвлення листків і зрілих бобів) до 11 (забарвлення насіння). Середня кількість градацій для однієї ознаки становила  $3,8 \pm 2,18$ .

Максимальний індекс різноманіття Шеннона ( $H'$ ) в сортах нуту фіксували за ознакою забарвлення насіння ( $H'=1,75$ ). За цією ознакою сорти нуту з більшості вивчених країн відрізнялись найвищим рівнем мінливості. Значним рівнем поліморфізму в загальній вибірці сортів нуту відрізнялися також ознаки маса 1000 насінин і форма рослин ( $H'=1,19$  і  $1,15$  відповідно). У вибірках сортів з Молдови, Іспанії та США маса 1000 насінин була найбільш поліморфною ознакою.

Саме ознаки насіння визначають приналежність рослин нуту до двох різновидностей – *desi* та *kabuli* [13]. Показано, що найвищий рівень мінливості в колекції сортів нуту спостерігався саме за забарвленням насіння [14]. Серед 10 найбільш важливих диференціюючих морфологічних і агрономічних дескрипторів у колекції сортів нуту визначені забарвлення, характер поверхні та маса 1000 насінин [13].

Найменш мінливими в сортах нуту виявились ознаки забарвлення стебла, форма і забарвлення зрілого боба ( $H'=0,52$ ,  $0,52$ ,  $0,54$  відповідно).

Загальний рівень поліморфізму сортів нуту за морфологічними ознаками за індексом Шеннона склав 0,86. При цьому найбільш поліморфними виявились групи сортів нуту ІЄК і США ( $H'=0,87$  і  $0,78$  відповідно). Значним рівнем поліморфізму, близьким до сортів нуту зі США, характеризувалися також сорти з Ірану і Канади ( $H'=0,76$  в обох вибірках). Слід зазначити, що різноманіття сортів нуту в групі ІЄК, очевидно, обумовлювалося об'єднанням зразків із різних країн. Найменш поліморфними групами були зразки нуту з Молдови та Іспанії ( $H'=0,46$  і  $0,51$  відповідно).

У загальній вибірці більшість сортів нуту характеризувалася наявністю антоціанового забарвлення стебла, крупних листків сизо-зеленого кольору і яйцеподібної форми. За ознаками квітки і насіння більшість вивчених сортів нуту були представлені формами з білими квітками середнього розміру і переважно крупним округлим насінням жовто-рожевого і жовтого кольору зі слабо-горбкуватою поверхнею. Саме такі ознаки характерні для сортів нуту різновидності *kabuli*. *Desi* різновидність представлена у вивченій колекції нуту лише 8 сортами: Кубанський 199 (Росія), Без назви (Чехія, UD0500028), V 1545N 211-13, V 70 N 213-13 V, Negras N 214-13 (Іспанія), Без назви (UD0500001) і Іранський 918 (Іран), NEC 2302 (США).

За розмірами бобів і формою куща в дослідженій вибірці сортів нуту переважали форми з господарсько-важливими фенотиповими проявами цих ознак. Так, більшість вивчених сортів нуту характеризувалися наявністю довгих і широких бобів, а також стоячою формою куща. До рідкісних ознак у вивченій вибірці сортів нуту можна віднести вузький біб – (P 502 – Індія), а також сіре та червоно-фіолетове забарвлення насіння, яке було характерне для сортів Іранський 918 і Black chick Peasoharychgolite (Іран) відповідно.

**Поліморфізм мікросателітних локусів у сортах нуту.** Під час ампліфікації 13 мікросателітних локусів у сортах нуту виявлено 68 алельних варіантів. Два мікросателітних локуси (CaSTMS25 і NCPGR41) з 13 були мономорфними, інші виявляли поліморфізм. Максимальна кількість алельних варіантів – 8, спостерігалася за локусами CaSTMS 10, NCPGR 81, NCPGR 90, мінімальна – за локусами NCPGR 51 (2) і NCPGR 55 (3). Середня кількість алельних варіантів на один локус становила  $5,15 \pm 2,58$ .

Найбільш поліморфними в загальній вибірці сортів нуту виявилися локуси CaSTMS 10, NCPGR 90, і NCPGR 81 ( $H=1,74, 1,53, 1,52$  відповідно). За локусом NCPGR 81 найвищий рівень поліморфності відзначений у сортах нуту з України, Росії, Молдови, Іспанії, групі сортів ІЄК; за локусом NCPGR 90 – у сортах з Індії, Ірану, Узбекистану; за локусом CaSTMS 10 – у сортах із Канади і США.

Мікросателітний локус NCPGR 55 був мономорфним у всіх досліджених вибірках сортів, крім США та Ірану ( $H=0,72$  та  $0,29$ ).

За різноманіттям мікросателітних локусів найвищим рівнем поліморфізму відрізнялися сорти нуту з Ірану ( $H=0,90 \pm 0,54$ ) і США ( $H=0,75 \pm 0,50$ ), найменш поліморфними були сорти з Іспанії ( $H=0,43 \pm 0,40$ ) і Канади ( $H=0,43 \pm 0,39$ ).

Більшість алельних варіантів вивчених мікросателітних локусів зустрічалися в загальній вибірці сортів нуту з частотою більше 20% (часті алелі) і 1–20% (загальні алелі). Також виявлені рідкісні алельні варіанти – 250 пн. за локусом CaSTMS10 (Лінія 154, США); 135 пн. (NEC 2288, Іран) та 180 пн. (Юбилейный, Росія) за локусом NCPGR 21; 215 пн. (КС 215087, Іран) за локусом NCPGR52; 195 пн. за локусом NCPGR55 (NEC 2298, США).

Незважаючи на те, що нут є облігатним самозапилювачем [13, 14], серед досліджених зразків були виявлено 8 гетерогенних сортів, у яких ампліфікувалося по два ДНК-продукти в одному локусі під час аналізу ДНК суміші насіння. У таких зразках був проведений понасінний аналіз, для кожного сорту проаналізовано 19 насінин. У результаті понасінного аналізу у сортів L 550 і С 118 з Індії ідентифіковано по 2 алельних варіанти (230 і 215) за локусом NCPGR 50. В обох сортах знайдені гетерозиготні індивіди, загальна частота гетерозигот в індійських зразках за локусом NCPGR 50 становила 0,066. За локусом NCPGR 90 гетерогенність ідентифікована у двох сортах з Індії, JG 1257 і NEC 2318, а також у двох сортах з Канади, 425-12 і 418-59. В сорті NEC 2318 (Індія) виявлені два алельних варіанти 200 і 155 пн, причому алельний варіант 155 пн зустрічався лише у одного індивіда. В сорті JG 1257 локус NCPGR 90 представлений двома алельними варіантами, 210 і 174 пн, за якими зустрічалися гомо- і гетерозиготні зразки. Загальний рівень гетерозиготності за локусом NCPGR 90 у сортах нуту з Індії становив 0,053. Для обох сортів з Канади 425-12 і 418-59 за локусом NCPGR 90 характерні алельні варіанти 200 і 155 пн, які були також представлені моно- і гетерозиготними зразками з частотою останніх 0,214. За локусом NCPGR 94 гетерогенність була виявлена у двох зразках нуту з Іспанії, Без назви (UD0500134) і Без назви (UD0500135). У цих сортах були ідентифіковані два алельних варіанти, 160 і 178 пн, які були представлені у вищеназваних сортах в гомо- і гетерозиготному стані. Частота гетерозигот за локусом NCPGR 94 у сортах із Іспанії становила 0,043. Рівень гетерозиготності в загальній вибірці сортів нуту за всіма мікросателітними локусами становив 0,006.

#### **Класифікація сортів нуту за морфологічними та молекулярними маркерами**

Для систематизації колекції сортів нуту за морфологічними та молекулярними маркерами проводили кількісний кластерний аналіз у програмі Structure 2.3.4. Достовірну кількість кластерів для досліджуваної матриці сортів нуту визначали за допомогою математичного алгоритму, запропонованого Evanno et al., 2005 [6]. Для цього сорти нуту послідовно групували в 2–15 кластерів з 20-кратною повторністю. На графіку, що відображає співвідношення кількості кластерів (K) від значення ( $\Delta K$ ) за найбільшим піком визначали достовірну кількість кластерів. Для дослідженої вибірки сортів нуту достовірною кількістю кластерів становила чотири (рис. 1). У першому кластері переважали сорти нуту з групи ІЄК, України та Росії, у другому – зразки з Узбекистану, Канади, США, Ірану. Переважну більшість представників третього кластеру утворювали європейські сорти нуту з Молдови, України, Росії,



Іспанії, четвертого кластеру – зразки з Індії, Ірану, США (табл. 1). Подібні закономірності групування сортів нуту були відзначені нами в попередніх роботах під час вивчення дивергенції популяцій сортів нуту з різних країн за допомогою філогенетичного та факторного аналізів [1, 2]. Так, сорти нуту з СНД та Європи, як правило, завжди утворювали спільний кластер, у той час як азійські й американські сорти об'єднувалися в інші групи.

Таблиця 1

Найменування локуса	Найменування кластера			
	1	2	3	4
CaSTMS10	204, 210, 220, 230, 240	180, 204, 215, 220, 230	204, 210, 220, 230, 240, 250	180, 204, 215, 220, 230, 240
CaSTMS14	120, 135, 140, 150	100, 110, 120, 130, 135	100, 110, 120, 135, 140, 150	100, 110, 120, 130, 135
CaSTMS25	178	178	178	178
NCPGR 21	155, 160	135, 145, 150, 155, 160	155, 160, 180	145, 150, 155, 160
NCPGR 41	264	264	264	264
NCPGR 50	215, 220, 230, 240	190, 215, 220, 230, 240	203, 210	190, 215, 220, 230, 240
NCPGR51	203	203, 210	230, 245, 260	203, 210
NCPGR52	245, 260	200, 225, 230, 245, 260	204	200, 215, 225, 230, 245, 260
NCPGR55	204	195, 204, 215	210, 221, 225, 230	204, 215
NCPGR57	210, 221	210, 221, 230, 240	180, 190, 200, 215, 222, 230	210, 221, 230, 240, 250
NCPGR81	180, 190, 200, 215, 230	200, 215, 222, 230, 240, 250	155, 174, 186, 194, 200, 210	190, 200, 215, 222, 230, 240, 250
NCPGR90	155, 200, 210	143, 174, 186, 194, 200, 210	155, 174, 188, 184, 200, 210	143, 155, 174, 186, 210, 240
NCPGR94	160, 178, 195	170, 178, 188, 195, 200	160, 178, 188, 195	170, 178, 188, 195, 200

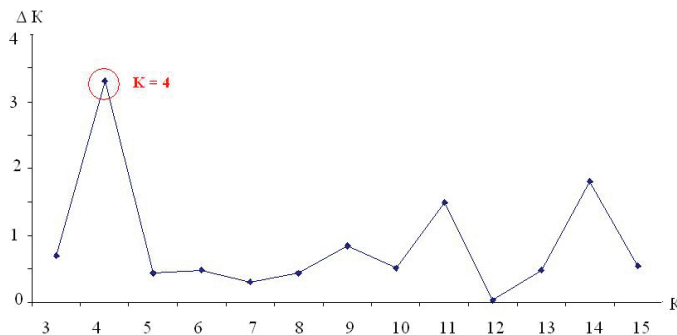


Рис. 1. Розрахунок кількості достовірних кластерів за алгоритмом, запропонованим Evanno et al., 2005 [6]: K – кількість кластерів,  $\Delta K$  – статистичний коефіцієнт, який відображає співвідношення змінення логарифму ймовірності даних між послідовними значеннями K.

До першого кластера (рис. 2) увійшло 14 сортозразків нуту. Серед них по чотири сорти з України та Росії, п'ять зразків із групи сортів ІСК та один сорт із Канади. За морфологічними ознаками квітки та насіння, які були визначені як диференціюючі в дослідженій вибірці сортів нуту, для переважної більшості зразків були характерні бузково-рожеві квітки, округло-кутасте слабкогорбкувате темнозабарвлене насіння (червоно-коричневе, червоно-фіолетове, рожеве, горіхове).

Алельні варіанти мікросателітних локусів, характерні для представників кожного з чотирьох кластерів, наведені в табл. 2.

Слід зазначити, що деякі представники першого кластера за комплексом вивчених ознак тяжіли до інших кластерів. Так, зразки 11 (Пегас, Україна) та 104 (418-59, Канада) тяжіли до сортів нуту четвертого кластера на 12,7 в 37,9% відповідно, а у зразках 55 (УСВ 1, ІСК), 24 (Завольський, Росія), 1 (Луганець, Україна), Без назви (49, ІСК), Александрит (5, Україна) спостерігалась відповідність представникам третього кластера від 15,5 до 32,9%, в середньому на 23%.

Другий кластер (рис. 2) представлений 31 зразком нуту: по сім сортів з Канади та Узбекистану, по п'ять зразків з Ірану та США, чотири зразки з Індії, два – з Молдови, один – з України. Для цієї групи зразків були характерні представники з білими квітками й округлим слабкогорбкуватим насінням світлих кольорів (жовто-рожеве, жовте, рудувате).



Таблиця 2

Процент відповідності популяцій сортів нуту з різних країн до певного кластера, Q, %

Найменування групи сортів нуту	Процент відповідності групи сортів нуту до певного кластера, Q, %			
	1	2	3	4
Україна (1)	<b>30,10</b>	10,10	<b>57,60</b>	2,30
Росія (2)	<b>30,10</b>	2,30	<b>58,60</b>	9,10
Молдова (3)	0,90	16,80	<b>81,60</b>	0,70
Іспанія (4)	5,50	3,60	<b>59,10</b>	31,90
ІСК (5)	<b>34,80</b>	1,80	49,90	13,50
Індія (6)	3,60	38,50	2,80	<b>55,10</b>
Іран (7)	2,00	<b>43,30</b>	2,00	<b>52,70</b>
Узбекистан (8)	0,50	<b>60,60</b>	6,00	32,90
Канада (9)	18,10	<b>47,40</b>	5,10	29,50
США (10)	3,20	39,20	8,50	<b>49,10</b>

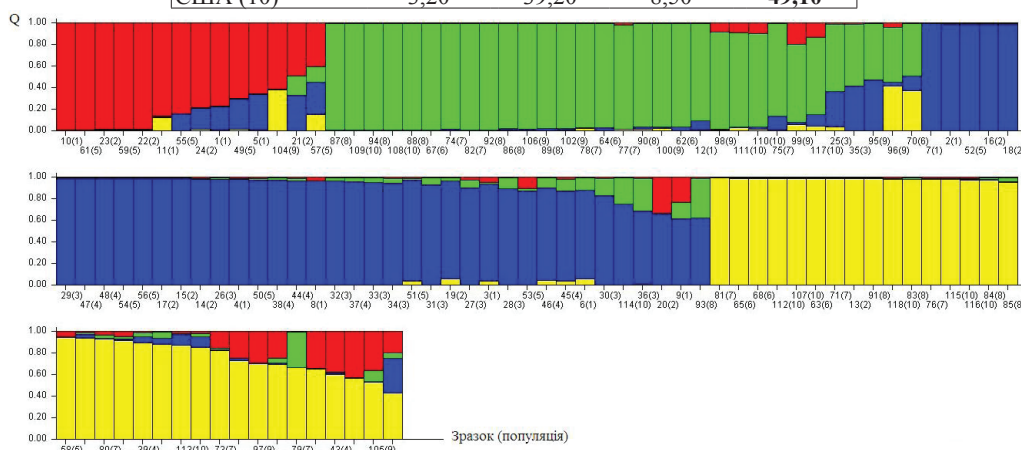


Рис. 2. Результати кластеризації сортів нуту з різних країн за морфологічними ознаками та мікросателітними локусами. Кожний стовпчик на діаграмі відповідає певному сортозразку нуту. В дужках указана популяція сортів, до якої належить зразок: 1 – Україна, 2 – Росія, 3 – Молдова, 4 – Іспанія, 5 – ІСК, 6 – Індія, 7 – Іран, 8 – Узбекистан, 9 – Канада, 10 – США. Червоні стовпчики – 1 кластер, зелені стовпчики – другий, сині – третій, жовті – четвертий. Q – коефіцієнт, що відображає кількісну приналежність кожного зразку до певного кластеру.

Сорти Костюжанський 26, СЭБ 119 (25 та 35, Молдова) та Sanford (95, Канада) займали проміжне положення між другим і третім кластером. Подібність до представників третього кластера в цих зразках становила 33,4, 41,1, 46,9% відповідно. Зразки CDC Marengo (96, Канада) та EC 26428 (70, Індія) тяжіли до представників четвертого кластера на 42,1 та 37,2% відповідно.

Третій кластер сортів, найбільш численний, об'єднував 40 сортозразків нуту, серед яких – десять зразків із Молдови, по сім зразків з України, Росії, Іспанії, шість зразків з групи сортів ІСК, один – з Узбекистану та один – зі США. Сорти нуту цього кластера характеризувалися білим забарвленням квітки, округлим і округло-кутастим насінням зі слабогорбкуватою поверхнею переважно жовто-рожевого кольору. Зразки Лінія 154 (114, США), Кишинівський 1 (36, Молдова), Узбекистанський 32 (93, Узбекистан) на 24,3, 30,2 та 36,8% відповідали за вивченими ознаками представникам другого кластера. Сорти Краснокутський 9 (20, Росія) та Дніпровський 5 (9, Україна) на 33, 0 та 23,5% відповідно були подібними до зразків першого кластера.

Четвертий кластер утворювали 33 зразки нуту, серед яких сім зразків були з Ірану, шість – зі США, п'ять сортів – з Іспанії, по чотири сорти з Узбекистану й Канади, два – з групи сортів ІСК та один зразок із Росії. Слід зазначити, що четвертий кластер сортів нуту відрізнявся найвищим рівнем поліморфізму за вивченими морфологічними ознаками

і мікросателітними локусами порівняно з іншими виділеними групами сортів. Для представників цього кластера характерні рідкісні морфологічні ознаки й алейні варіанти мікросателітних локусів (табл. 2). Очевидно, значний рівень поліморфізму вивчених ознак у цій групі сортів обумовлюється наявністю в ній значної кількості азійських сортів. Як відомо, генетичним центром походження нуту є Передньоазійський, а саме в центрах походження концентрується максимальний рівень поліморфізму рослин [15]. В цілому, для сортів четвертого кластера були характерні фенотипи з рожевим і бузково-рожевим забарвленням квіток, кутастим насінням із горбкуватою поверхнею. Як відомо, такі ознаки насіння характерні для *desi* різновидності нуту, що широко культивується в азійських країнах унаслідок своєї підвищеної стійкості до біотичних і абіотичних факторів середовища. За забарвленням насіння спостерігався значний поліморфізм, виявлено 8 градацій цієї ознаки. Також значною мінливістю відрізнялась у цій групі сортів форма рослин. Зустрічалися представники зі сланкою, прямостоячою, компактною та розкидистою формою куща. В цій групі сортів відзначені також нечасті алейні варіанти мікросателітних локусів, що не зустрічались у представників інших кластерів (табл. 2).

Таким чином, у результаті досліджень оцінена генетична структура колекції сортів нуту за морфологічними ознаками та мікросателітними локусами. Виявлено, що загальна досліджена вибірка сортів нуту має подібний рівень мінливості за цими критеріями. Відзначені зразки з нечастими морфологічними ознаками й алейними варіантами мікросателітних локусів. У результаті кластеризації сортів нуту охарактеризовані особливості групування сортів, кількісно оцінена відповідність кожного зразка нуту певному кластеру. Отримані дані доповняють інформацію про зразки генетичної колекції нуту НЦГРРУ та можуть використовуватися для подальшої наукової роботи для маркування певних генотипів, пошуку генів-кандидатів агрономічних ознак тощо.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Акініна Г. Е. Изучение изменчивости микросателлитных локусов сортов нута из разных стран методами молекулярного дисперсионного (AMOVA) и Q-факторного анализов // Вестн. Харьков. ун-та им. В. Н. Каразина. 2011. Вып. 13 (947). С. 63–69.
2. Акініна Г. Е., Попов В. Н. Дивергенция сортов нута селекции разных стран мира по морфологическим признакам и молекулярным маркерам // Фактори експериментальної еволюції організмів: зб. наук. пр. / НАН України, НААН України [та ін.]; редкол.: В. А. Кунах (голов. ред.). К.: Логос, 2011. Т. 10. С. 168–172.
3. Акініна Г. Е., Попов В. Н. Полиморфизм микросателлитных локусов в сортах нута европейского происхождения // Цитология и генетика. 2012. № 1. С. 27–36.
4. Ahmad F., Gaur P. M., Slinkard A. E. Isozyme polymorphism and phylogenetic interpretations in the genus *Cicer* L. // Theor Appl Genet. 1992. Vol. 83. P. 620–627.
5. Bhagyawant S. S., Srivastava N. Genetic fingerprinting of chickpea (*Cicer arietinum* L.) germplasm using ISSR markers and their relationships // African J. Biotechnol. 2008. Vol. 7 (24). P. 4428–4431.
6. Evanno G., Regnaut S., Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study // Molecular Ecology. 2005. Vol. 14 (8). P. 2611–2620.
7. Ghaffoor A., Gulbaaz F. N., Afzal N. M. et al. Inter-relationship between SDS-PAGE markers and agronomic traits in chickpea (*Cicer arietinum* L.) // Pakistan J. Botany. 2003. Vol. 35. N 4. P. 613–624.
8. Huttel B., Winter P., Weising K. et al. Sequence-tagged microsatellite site markers for chickpea (*Cicer arietinum* L.) // Genome. 1999. Vol. 42. P. 210–217.
9. Iruela M., Rubio J., Cubero J. I. et al. Phylogenetic analysis in the genus *Cicer* and cultivated chickpea using RAPD and ISSR markers // Theor. Appl. Genet. 2002. Vol. 104. P. 643–651.
10. Jomová K., Benková M., Kraic J. Enrichment of Chickpea Genetic Resources Collection Monitored by Microsatellites // Czech J. Genet. Plant Breed. 2009. Vol. 45. N 1. P. 11–17.
11. Sethy N., Edwards B., Bhatia S. Development of microsatellite markers and analysis of intraspecific genetic variability in chickpea (*Cicer arietinum* L.) // Theor. Appl. Genet. 2006.

- Vol. 112. P.1416–1428.
12. Udupa S. M, Sharma A, Sharma R. P, Pai R. A Narrow genetic variability in *Cicer arietinum* L. as revealed by RFLP analysis // J. Plant Biochem. Biotech. 1993. Vol. 2. P. 83–86.
  13. Upadhyaya H. Geographical patterns of variation for morphological and agronomic characteristics in the chickpea germplasm collection // Euphytica. 2003. Vol. 132. P. 343–352.
  14. Upadhyaya H, Ortiz R., Bramel P., Singh S. Phenotypic diversity for morphological and agronomic characteristics in chickpea core collection // Euphytica. 2002. Vol. 123. P. 333–342.
  15. Upadhyaya H., Dwivedi S., Baum M. et al. Genetic structure, diversity, and allelic richness in composite collection and reference set in chickpea (*Cicer arietinum* L.) // BMC Plant Biology. 2008. Vol. 8. P.106.
  16. Nguyen T. T. , Taylor P. W. J. , Redden R. J. , Ford R. Genetic diversity estimates in Cicer using AFLP analysis // Plant Breeding. 2004. Vol. 123. P. 173–179.
  17. Varshney R. K., Glaszmann J. C., Leung H., Ribaut J. M. More genomic resources for less-studied crops // Trends Biotechnol. 2010. Vol. 28 (9). P. 452–460.
  18. Varshney R. K., Song C., Saxena R. K. et al. Draft genome sequence of chickpea (*Cicer arietinum*) provides a resource for trait improvement // Nature Biotechnol. 2013. Vol. 31. P. 240–246.

Стаття: надійшла до редакції 31.05.13

доопрацьована 08.11.13

прийнята до друку 08.11.13

## GENETIC STRUCTURE OF COLLECTION OF CHICKPEA VARIETIES BY MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR MARKERS

G. Akinina, V. Popov

*Plant Production Institute nd.a. V.Ya. Yuriev  
142, Moskovskiy Ave., Kharkiv 61060, Ukraine*

The genetic structure of collection of chickpea varieties from Asia, America and Europe by polymorphism of 15 morphological traits and 13 microsatellites loci is evaluated. The similar diversity level of chickpea varieties by morphological traits and microsatellites loci is shown, that is estimated by *Shannon's diversity index*. The rare traits that are typical for studied sample of chickpea varieties are observed. The traits that are differentiating in chickpea varieties are assigned. The features of grouping of varieties in clusters are discussed.

*Keywords:* chickpea, microsatellites, morphological traits, Shannon's diversity index, genetic structure.

## ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА КОЛЛЕКЦИИ СОРТОВ НУТА ПО МОРФОЛОГИЧЕСКИМ И МОЛЕКУЛЯРНЫМ МАРКЕРАМ

Г. Акинина, В. Попов

*Институт растениеводства имени В.Я. Юрьева  
пр. Московский, 142, Харьков 61060, Украина  
e-mail: gakinina@gmail.com*

Оценена генетическая структура коллекции сортов нута из Азии, Америки и Европы по полиморфизму 15 морфологических признаков и 13 микросателлитных локусов. Показан сходный уровень разнообразия сортов нута по морфологическим признакам и микросателлитным локусам, оцененный по индексу разнообразия Шеннона. Отмечены редкие признаки, характерные для исследованной выборки сортов нута. Выделены признаки, которые являются дифференцирующими в сортах нута. Обсуждаются особенности группирования сортов в кластеры.

*Ключевые слова:* нут, микросателлиты, морфологические признаки, индекс разнообразия Шеннона, генетическая структура.

## РЕГІОНАЛЬНИЙ МОНІТОРИНГ ПРИРОДЖЕНИХ ВАД РОЗВИТКУ В ХЕРСОНСЬКІЙ ОБЛАСТІ

О. Лановенко

*Херсонський державний університет  
вул. 40 років Жовтня, 27, Херсон 73000, Україна  
e-mail: elenalanovenko@mail.ru*

В умовах скорочення постійного населення Херсонської області та зниження рівня народжуваності відбулося зростання популяційної частоти природжених вад розвитку (ПВР) у когорті новонароджених (з 24,2‰ у 2000 р. до 35,1‰ у 2011 р.). Зростання поширеності ПВР відзначене як у районах області (з 22,7‰ до 29,9‰), так і в обласному центрі (з 23,2‰ до 46,1‰). У структурі ізольованих вад найбільшу питому вагу мають вади серцево-судинної (28,5%), кістково-м'язової (26,05%), сечостатевої систем (15,25%). Серед "модельних" вад розвитку найпоширенішими виявилися гіпоспадія (частота 1,9‰), полідактилія (1,3‰), синдром Дауна (1,1‰). У Херсонській області популяційна частота щілини губи та/або піднебіння, полідактилії, синдрому Дауна була суттєво вищою порівняно з відповідними даними реєстрів EUROCAT по Україні та в країнах Європи.

*Ключові слова:* популяція, природжені вади розвитку, моніторинг, "модельні" вади.

Кризова демографічна ситуація, що склалася в Україні, призвела до суттєвого скорочення кількості населення. Зокрема, внаслідок від'ємного приросту за період 1992–2010 рр. втрачено понад 12% населення (з 52,056 млн до 45,778 млн) [3]. Подібна ситуація склалася і на Херсонщині: тільки за період з 2002 по 2011 рр. внаслідок природного та міграційного скорочення область втратила більше 8% постійного населення (в Україні цей показник за той самий період становив 5,81%) [9].

На популяційному рівні негативні демографічні процеси сприяють зниженню генетичної гетерогенності, скороченню репродуктивного та генетично ефективного об'єму популяцій, що порушує структуру генофонду, тобто тієї сукупної спадкової інформації, яка передається від батьків нащадкам і визначає їх біологічно важливі властивості: розміри та пропорції тіла, тривалість життя, продуктивність, стійкість до захворювань і несприятливих факторів середовища [1]. В Україні науковці відзначають поширення непліддя у шлюбах, зниження фертильності, зростання патології у жінок репродуктивного віку, ускладнень при пологах, пренатальної і постнатальної смертності немовлят [3]. У працях Є. К. Гінтера зі співробітниками показаний взаємозв'язок низки популяційно-генетичних параметрів (інбридинг, шлюбна асортативність тощо) зі ступенем обтяженості спадковою патологією [7, 13].

Показники частоти і структури природжених вад є не тільки індикаторами якості оточуючого середовища [4], але й одними з небагатьох критеріїв, які описують генетичну структуру популяцій [2, 11]. Об'єктивною реальністю є існування міжпопуляційних відмінностей у генетичному складі угруповань населення внаслідок різниці у статевовіковій і національній структурі, шлюбних відносинах, міграційних процесах. Отже, людські популяції мають тільки їм притаманну генетичну структуру і можуть відрізнитися за значеннями показників генетичного здоров'я [10]. Зазначене диктує необхідність аналізу

особливостей частоти і структури природженої та спадкової патології в регіональному аспекті.

Природжені вади розвитку – гетерогенна група патологічних станів, яка включає ізольовані, системні та множинні аномалії органів і систем генетичної, середовищної та мультифакторіальної етіології. Більшість ПВР мають мультифакторіальну етіологію, що означає одночасну дію генетичної схильності й зовнішніх впливів [4, 5, 8]. Серед усіх ПВР значно меншим коливанням частоти підлягають нозологічні форми, які мають чітко фіксований фенотип і добре діагностуються при народженні – “грубі” (синоніми: модельні, сторожові) ПВР, рекомендовані до обов’язкового обліку реєстром EUROCAT. Вони використовуються як для суто генетичних досліджень, так і для дослідження взаємодії генетичних факторів і факторів середовища при виникненні вроджених аномалій [15].

Оцінка мутагенних і тератогенних властивостей довкілля за частотами модельних вад розвитку у новонароджених і перинатально померлих дітей є найбільш суттєвою компонентою генетичного моніторингу [14].

Відсутність інформації про частоту і структуру ВІР у Херсонській області диктує необхідність дослідження у цьому напрямі, результати якого дають змогу не тільки прогнозувати очікувані рівні ВІР, але й оцінити вплив різних факторів на динаміку цих показників.

Мета дослідження – проаналізувати динаміку поширеності та структуру природжених вад розвитку у когорті новонароджених Херсонської області за 12-річний період (2000–2011 рр.), порівняти динаміку популяційної частоти найпоширеніших “модельних” вад у регіоні з даними міжнародного європейського реєстру EUROCAT за останні 5 років (2007–2011 рр.).

#### Матеріали та методи

Проведений моніторинг поширеності та структури природжених вад розвитку (ПВР) новонароджених, а також динаміки частоти “сторожових” фенотипів у групі новонароджених дітей за 12-річний період (2000–2011 рр.).

Частоту різних форм ПВР розраховували за кілька років, залежно від кількості народжень у регіоні, за формулою:

$$p = n : N_1,$$

де  $p$  – частота ознаки;  $n$  – кількість дітей із вадами розвитку за одиницю часу;  $N_1$  – загальна кількість спостережень (кількість народжень за одиницю часу).

При розрахунку популяційної частоти ПВР для міста або району Херсонської області використані матеріали обласного медико-статистичного реєстру про загальну кількість новонароджених, народжених живими та мертвонароджених дітей.

У результаті проаналізовано 3993 випадки вад розвитку у когорті новонароджених міста Херсона та Херсонської області.

Проведений статистичний аналіз загальної популяційної частоти ПВР, частоти найпоширеніших “модельних” вад у когорті новонароджених дітей (щілина губи і/або піднебіння, синдром Дауна, редуційні вади кінцівок, полідактилія, атрезія стравоходу, атрезія анусу, гіпоспадія), розрахунок довірчих інтервалів і достовірності відмінностей за роками досліджень [12].

#### Результати і їхнє обговорення

За період дослідження з 2000 р. по 2011 р. включно в області зареєстровано 132 326 пологів. Усього виявлено 3993 випадки народження дітей із різними вадами розвитку (3,0%), з яких 783 віднесені до групи “модельних” ПВР (табл. 1). Аналіз динаміки частоти



вроджених аномалій розвитку показав значні коливання середньорічних значень: максимальна сумарна частота ПВР (38,6 на 1000 новонароджених) і “модельних” вад (7,7‰) була зареєстрована у 2007 р., мінімальна – у 2003 р. (відповідно 20,5 та 4,0‰).

Аналіз динаміки частоти ПВР за період дослідження показав статистично значимі зміни (табл. 1). Загальна частота ПВР за період 2000–2011 рр. мала тенденцію до зростання: кореляційний аналіз виявив збільшення її параметрів у Херсонській області ( $r=0,65$ ;  $p<0,05$ ).

Динаміка частоти вад розвитку серед живонароджених у різні роки мала хвилеподібний характер. Середня частота ПВР за цей період становила  $30,17 \pm 0,03\%$  (діапазон коливань 20,2–38,6‰) і виявилася суттєво вищою за середньоукраїнські показники ( $24,46 \pm 0,07\%$ ) [3]. Але частота “сторожових” фенотипів не зазнавала значних змін (середня частота  $5,9 \pm 0,02\%$ ) і була суттєво вищою лише у 2006–2008 рр. (6,7–7,7‰). Подібна тенденція відзначена Р. В. Богатирьовою, О. В. Линчак, О. І. Тимченко [3]: зниження частоти ПВР, починаючи з 2002 р. включно, не відзначалося по жодній нозології, яка належить до “сторожових” ПВР (множинні вади, щілина губи і/або піднебіння, спинномозкова кила, синдром Дауна, редукційні вади кінцівок, полідактилія та синдактилія), які безпомилково діагностуються та реєструються.

Таблиця 1

Кількість випадків і частота ПВР у когорті новонароджених дітей Херсонської області (2000–2011 рр.)

Рік	Число народжень	Кількість усіх ПВР		У т.ч. кількість випадків “модельних” ПВР	
		абс.	на 1000 народжень	абс.	на 1000 народжень
2000	10 542	257	24,2	62	5,9
2001	9 961	243	24,4	47	4,7
2002	10 003	280	28,0	63	6,3
2003	10 521	216	20,5	43	4,0
2004	9 923	200	20,2	54	5,4
2005	9 951	307	30,8	55	5,5
2006	11 349	397	35,0	75	6,6
2007	11 495	444	38,6	89	7,7
2008	12 292	456	37,1	92	7,5
2009	12 179	384	31,5	82	6,7
2010	12 206	391	32,0	62	5,1
2011	11 904	418	35,1	59	5,0
Разом за 12 років	132 326	3 993	30,17	783	5,9

Середньопопуляційна частота усіх вад розвитку за період 2007–2011 рр. у Херсонській області (348,6 на 10 000 новонароджених) була суттєво вищою за аналогічні показники реєстрів EUROCAT в Україні та в країнах Європи (відповідно 219,31 та 207,84).

Для порівняння динаміки поширеності ПВР у міській і сільській місцевості нами розрахована частота вад розвитку народжених живими малюків у районах міста й області за період проведення дослідження. У популяціях Херсонської області спостерігається поступове зростання частоти ПВР новонароджених з 22,7‰ до 29,9‰ (у районах області) та з 23,2‰ до 46,1‰ (в обласному центрі). Встановлено, що частота ПВР у місті Херсоні суттєво перевищувала цей показник у сільських районах і становила  $35,2 \pm 0,79$  на 1000 народжень (відповідно в сільській місцевості –  $24,1 \pm 1,27$  на 1000 народжень). Отже, у Херсоні сумарна частота вад розвитку є суттєво вищою, ніж у районах області ( $\chi^2=30,1$ ).



Окрім вивчення динаміки частоти ПВР, у районах області був досліджений нозологічний спектр вад за основними системами органів. У структурі вад переважаючу питому вагу займають ізольовані поодинокі ПВР (97,7%) і лише 2,3% є множинними, включаючи хромосомні аномалії. Нами встановлено, що у структурі ізольованих вад розвитку найбільшу питому вагу займають вади серцево-судинної (28,5%), кістково-м'язової (26,05%), сечостатевої систем (15,25%). Щелепно-лицеві аномалії (переважно вовча паща, заяча губа) розділяють четверте місце (4,25%) разом із хромосомними аномаліями (4,25%), далі йдуть вади органів травлення (3,75%), нервової системи (3,0%). Частка множинних вад розвитку в загальній структурі ПВР становить 2,25 % (рис. 1).

Аналіз динаміки вад розвитку засвідчив, що серед усіх нозологічних груп порівняно швидко та статистично достовірно за роки дослідження відбулося зростання частоти вад системи кровообігу (з 23,7‰ за період 2001–2006 рр. до 33,3‰ за період 2007–2012 рр.) (табл. 2). Вивчення причин такої динаміки є предметом окремого дослідження. Зниження середньої частоти характерне для щелепно-лицевих (з 4,3‰ до 4,2‰) та кістково-суглобних вад (з 30,2‰ до 21,9‰), вад шлунково-кишкового тракту (з 3,9‰ до 3,6‰), вад нервової системи (з 3,6‰ до 2,4‰).

Таблиця 2

Порівняльна динаміка частоти ПВР у Херсонській області

Форми ПВР	Роки	
	2001–2006	2007–2012
	Частота (на 1000)	
Щелепно-лицеві	4,3	4,2
Кістково-суглобні	30,2	21,9*
Множинні ПВР	2,1	2,4
Системи кровообігу	23,7	33,3*
Шлунково-кишкового тракту	3,9	3,6
Сечостатевих органів	15,5	15,0
Хромосомні аномалії	4,2	4,3
Центральної нервової системи	3,6	2,4

**Примітка.** \* –  $p < 0,05$  (відносно середніх величин).

При аналізі наукових публікацій із даної тематики виявлені значні коливання частот ПВР, одержаних різними авторами. Це пов'язано, передусім, з різними методами обліку та реєстром, що використовується. Але значно меншим коливанням підлягають форми ПВР, які мають чітко фіксований фенотип і добре діагностуються при народженні. До них належать множинні вади розвитку та “модельні” ПВР (полідактилія, щілина губи та піднебіння й інші), а також синдром Дауна [6].

За даними табл. 3, показники сумарної частоти представлених нозологічних форм модельних ПВР за роки дослідження варіювали у межах 4,7–7,7 на 1000 народжень. Суттєво відрізнялася за роками і сумарна частота окремих вад. Найпоширенішою виявилася гіпоспадія (частота 1,9‰), полідактилія (1,3‰), синдром Дауна (1,1‰). Дуже низька поширеність у популяціях Херсонської області аненцефалії (0,03‰) та вад розвитку центральної нервової системи.

Нами проаналізована динаміка частоти «сторожових» фенотипів. В аналіз включені найпоширеніші в регіоні вади окремих систем органів: щілина губи та (або) піднебіння (аномалії щелепно-лицевого апарату), атрезія стравоходу, атрезія анусу (вади травної системи), редуційні вади кінцівок (РВК) та полідактилія (вади розвитку кістково-суглобного апарату), гіпоспадія (вади статевої системи), синдром Дауна (множинні вади) (табл. 3).

Таблиця 3

Динаміка частоти найпоширеніших модельних вад розвитку серед народжених живими в Херсонській області (на 1000)

Нозологічна форма	Роки дослідження												сумарна частота за 12 років
	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	
Щілина губи	0,95	0,9	1,4	0,01	0,8	1,1	0,7	1,8	0,7	0,9	0,6	0,7	0,9
Атрезія стравоходу	0,1	0,1	0,2	–	0,2	–	0,1	0,3	0,5	0,2	0,2	0,3	0,2
Атрезія анусу	0,4	0,2	0,4	0,5	–	0,3	0,4	0,3	0,3	0,2	0,08	0,08	0,25
Гіпоспадія	2,0	1,6	2,1	0,7	2,4	1,6	2,3	2,2	2,8	2,2	1,4	1,9	1,9
Полідактилія	1,2	0,8	0,9	1,1	1,3	1,4	1,9	1,4	1,6	1,2	1,5	1,1	1,3
PBK	0,3	0,2	0,5	0,2	0,2	0,3	0,1	0,2	0,3	0,4	0,2	0,3	0,26
СД	0,8	0,9	0,8	1,5	0,5	0,7	1,1	1,6	1,3	1,5	1,1	0,8	1,1
Разом	4,75	4,7	6,3	4,0	5,4	5,4	6,6	7,8	7,5	6,6	5,1	5,18	5,91

Нами виявлено, що за жодною нозологією, представленою в табл. 3, не відбувалося зниження частоти за роками та зміни рангового місця поширеності у популяціях, що свідчить про стабільність підтримання певного рівня мутаційного процесу.

Порівняльний аналіз популяційної частоти «модельних» вад у Херсонській області з аналогічними нозологічними формами європейських реєстрів [15] представлений у табл. 4.

Таблиця 4

Порівняльний аналіз популяційної частоти найпоширеніших у регіоні «модельних» вроджених вад новонароджених у Херсонській області з даними реєстрів EUROCAT (2007–2011 рр.) (на 10 000 народжень)

Нозологічна форма	Абсолютна кількість випадків у нашому дослідженні	Частота у нашому дослідженні	Частота за даними EUROCAT [15]	
			в Україні	в європейських країнах
Щілина губи та/або піднебіння	56	9,40*	7,29	7,85
Атрезія стравоходу	12	2,0	1,89	2,24
Атрезія анусу	15	2,50	2,28	2,51
Полідактилія	91	15,20*	13,66	8,26
Редукційні вади кінцівок	14	2,40*	4,55	3,44
Гіпоспадія	130	21,8	21,60	17,55
Синдром Дауна	79	13,20*	11,90	9,96

**Примітка.** \*  $p < 0,05$ .

За даними табл. 4, за окремими вадами (переважно спадкової етіології) констатуються статистично достовірні відмінності. Зокрема, популяційна частота щілини губи та/або піднебіння, полідактилії, синдрому Дауна була суттєво вищою в Херсонській області порівняно з відповідними даними реєстрів EUROCAT в Україні та в країнах Європи ( $\chi^2=48,7$ ). Причини виявленої закономірності потребують окремого дослідження.

Таким чином, в умовах скорочення постійного населення Херсонської області та зниження рівня народжуваності відбулося зростання популяційної частоти природжених вад розвитку (ПВР) у когорті новонароджених (з 24,2% у 2000 р. до 35,1% у 2011 р.). Причому поширеність «модельних» вад за цей період не зазнала значних змін (середня частота  $5,9 \pm 0,02\%$ ). Зростання поширеності ПВР відзначена як у районах області (з 22,7% до 29,9%), так і в обласному центрі (з 23,2% до 46,1%). У структурі ізольованих вад розвитку найпоширенішими виявилися вади серцево-судинної (28,5%), кістково-м'язової

(26,05%), сечостатевої систем (15,25%). Серед усіх нозологічних груп порівняно швидко і статистично достовірно відбулося зростання частоти вад системи кровообігу (з 23,7% за період 2001–2006 рр. до 33,3% за період 2007–2012 рр.). У структурі “модельних” вад найпоширенішою виявилася гіпоспадія (частота 1,9%), полідактилія (1,3%), синдром Дауна (1,1%). Популяційна частота вад розвитку спадкової етіології (щілини губи та/або піднебіння, полідактилії, синдрому Дауна) була суттєво вищою в Херсонській області (9,4–15,2 на 10 000 новонароджених) порівняно з відповідними даними реєстрів EUROCAT по Україні (7,29 – 13,66 на 10 000) та у країнах Європи (7,85–9,96 на 10 000).

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Алтухов Ю. П.* Концепция адаптивной нормы популяций и проблема аутбридинга в популяциях // *Вестн. АМН СССР*. 1984. № 7. С. 16–21.
2. *Амелина С. С.* Эпидемиология моногенной наследственной патологии и врожденных пороков развития у населения Ростовской области: автореф. дис. ... д-ра мед. наук: 03.00.15. М., 2006. 43 с.
3. *Богатирьова Р. В., Линчак О. В., Тимченко О. І.* Генетико-демографічні процеси серед населення України // *Журнал НАМН України*. 2012. Т. 18. № 1. С. 81–91.
4. *Боконбаева С. Д., Алдашева Н. М., Лобзова А. В., Джанабилова Г. А.* Врожденные пороки развития как индикатор качества состояния окружающей среды // *Вестн. КРСУ*. 2008. Т. 8. № 4. С. 105–110.
5. *Бочков Н. П., Чеботарев А. Н.* Наследственность человека и мутагены внешней среды. М., 1989. С. 213–231.
6. *Гинзбург Б. Г.* Динамика врожденных пороков развития до и после аварии на Чернобыльской АЭС: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 03.00.15. М., 1999. 24 с.
7. *Гинтер Е. К., Петрин А. Н.* Роль инбридинга и его структуры в отягощенности популяций человека наследственной патологией // *Профилактика наследственных болезней*. М., 1987. С. 88–102.
8. *Демикова Н. С.* Мониторинг врожденных пороков развития и его значение в изучении их эпидемиологии // *Педиатрия*. 2003. № 4. С. 13–14.
9. Лановенко О. Г. Динаміка чисельності населення півдня України як один із параметрів зміни генетико-демографічної структури популяцій // *Природничий альманах. Біол. науки*. 2012. Вип. 17. С. 156–165.
10. *Максіян О. І., Линчак О. І., Тимченко О. І.* Формування тягаря вродженої і спадкової патології серед новонароджених Чернівецької області // *Гігієна населених місць*. 2011. № 57. С. 411–417.
11. *Петрин А. Н.* Наследственные болезни в популяциях с различной генетической структурой: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. М., 1992. 37 с.
12. *Рокицкий П. Ф.* Биологическая статистика. Минск: Вышэйша школа, 1973. 320 с.
13. *Чурносков М. И.* Генетико-демографическая структура и распространенность мультифакториальных признаков в популяции Курской области: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. М., 1997. 40 с.
14. *Фоменко Н. М.* Природжена та спадково детермінована патологія у населення Прикарпатського регіону: клініко-генетичні характеристики, профілактика: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 03.00.15. К., 2002. 20 с.
15. EUROCAT. European Surveillance of Congenital Anomalies: Statistical Monitoring Introduction: 2007-2011 years. WEB: <http://www.eurocat-network.eu/default.aspx>.

Стаття: надійшла до редакції 31.05.13

доопрацьована 16.09.13

прийнята до друку 24.09.13

## REGIONAL MONITORING OF CONGENITAL MALFORMATIONS IN THE KHERSON REGION

**O. Lanovenko**

*Kherson State University  
27, 40 October St., Kherson 73000, Ukraine  
e-mail: elenalanovenko@mail.ru*

In conditions of continuous reduction of the population of Kherson region and the decline in fertility has witnessed the growth of population frequency of congenital malformations in a cohort of births (from 24.2‰ in 2000 to 35.1‰ in 2011 years). The rising prevalence of congenital malformations noted both in districts of the region (from 22.7‰ to 29,9‰) and in the regional centre (from 23.2‰ to 46,1‰). In the structure of the isolated malformations the largest share belongs congenital heart defects (28,5%), musculoskeletal (26,05%), urogenital systems (15,25%). Among the “model” malformations of the most common were hypospadias (frequency 1,9‰), the polydactyly (1,3‰), the down syndrome (1,1‰). In the Kherson region population frequency of cleft lip with or without palate, polydactyly, down syndrome was significantly higher compared with the corresponding data EUROCAT registries in Ukraine and countries of Europe.

*Keywords:* population, congenital malformations, monitoring, “model” malformations.

## РЕГИОНАЛЬНЫЙ МОНИТОРИНГ ВРОЖДЕННЫХ ПОРОКОВ РАЗВИТИЯ В ХЕРСОНСКОЙ ОБЛАСТИ

**Е. Лановенко**

*Херсонский государственный университет  
ул. 40 лет Октября, 27, Херсон 73000, Украина  
e-mail: elenalanovenko@mail.ru*

В условиях постоянного сокращения населения Херсонской области и снижения уровня рождаемости произошел рост популяционной частоты врожденных пороков развития (ВПР) в когорте новорожденных (с 24,2‰ в 2000 г. до 35,1‰ в 2011 г.). Рост распространенности ВПР отмечен как в районах области (с 22,7‰ до 29,9‰), так и в областном центре (с 23,2‰ до 46,1‰). В структуре изолированных пороков наибольший удельный вес имеют пороки сердечно-сосудистой (28,5%), костно-мышечной (26,05%), мочеполовой систем (15,25%). Среди “модельных” пороков развития самыми распространенными оказались гипоспадия (частота 1,9‰), полидактилия (1,3‰), синдром Дауна (1,1‰). В Херсонской области популяционная частота расщелины губы и/или неба, полидактилии, синдрома Дауна была существенно выше по сравнению с соответствующими данными регистров EUROCAT по Украине и странам Европы.

*Ключевые слова:* популяция, врожденные пороки развития, мониторинг, “модельные” пороки.

**YTRA-LIKE REGULATORY GENE *SSFG\_05654* AFFECTS MORPHOGENESIS AND ANTIBIOTIC RESISTANCE OF *STREPTOMYCES GHANAENSIS* ATCC14672**

**O. Tsypik<sup>1</sup>, Y. Dacyuk<sup>1</sup>, K. Flardh<sup>2</sup>, V. Fedorenko<sup>1</sup>, B. Ostash<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>*Ivan Franko National University of Lviv  
4, Hrushevskiyi St., Lviv 79005, Ukraine  
e-mail: bohdanostash@gmail.com*

<sup>2</sup>*Lund University  
Lund 22362, Sweden*

Gene *SSFG\_05654* encodes a transcriptional regulator of YtrA subfamily within the genome of moenomycin producer *Streptomyces ghanaensis* ATCC14672. The gene was replaced with apramycin resistance cassette. The resulting mutant *S. ghanaensis* 05654::Am was slightly delayed in aerial hyphae formation and spore pigment production when growing on oatmeal agar medium. On tryptic soy agar the mutant grew poorly and showed Bld-like phenotype. Antibiotic resistance assay revealed that *S. ghanaensis* 05654::Am is more sensitive to  $\beta$ -lactam antibiotics such as penicillin and ampicillin. *SSFG\_05654* disruption had no effect on the level of moenomycin production.

*Keywords:* *Streptomyces ghanaensis*, HTH transcriptional factors, morphogenesis, moenomycin.

Transcriptional factors containing helix-turn-helix DNA recognition element fall into many different families. GntR family is one of the most abundant and widely distributed in bacterial genomes. It comprises about 8500 proteins regulating versatile biological processes such as cell development, primary and secondary metabolism, plasmid transfer, motility and virulence [8, 21]. In general, they consist of conserved N-terminal DNA-binding domain (D-b) and C-terminal effector-binding/oligomerization (E-b/O) domain. E-b/O domain is very variable and, based on its secondary structure, all GntRs are divided into seven subfamilies – FadR, HutC, MocR, DevA, PlmA, AraR and YtrA [17, 23].

The YtrA subfamily remains little studied among bacteria [4, 17]. The founding member of the subfamily, YtrA from *B. subtilis*, was suggested to be involved in acetoin utilization by repressing its ABC transporters [25]. However, subsequent studies indicated that YtrA was not induced by acetoin and acetoin catabolism is determined by *acoABCL* operon [19]. Recent study revealed that YtrA regulator is required for induction of antibiotic stress response. YtrA recognizes and binds to inverted repeats upstream of *ytrA* and *ywoB* operons repressing their transcription until ligand, lipoglycopeptide antibiotic ramoplanin, binds YtrA and releases *ywoB* from repression [19]. Few YtrA-like proteins were annotated in genomes of *M. tuberculosis* (Rv1152), *M. smegmatis* (MSMEG\_5174) and *M. marinum* (MMAR\_4301) but their function is yet unknown [23, 24, 10].

To date, only one regulator of YtrA subfamily was investigated in streptomycetes. LndYR influences sporulation and landomycin E production by *Streptomyces globisporus*. It is situated near landomycin biosynthesis genes cluster and its targets are ABC transporter genes *lndW-lndW2*. The other as-yet-unidentified LndYR targets are probably involved in morphological differentiation of the strain [14].

In course of our *in silico* analysis of *Streptomyces coelicolor* YtrA-like sequences we identified one, SCO1728, which appeared to be universally conserved in *Streptomyces*, as well as

other actinobacteria, including *Mycobacterium*. This conservation indirectly points to essential function of the protein. However, *sco1728* knockout had no significant effects on *S. coelicolor* growth, antibiotic resistance profile, morphogenesis and secondary metabolism [22]. We therefore decided to investigate whether the knockout of *sco1728* ortholog in another streptomycete, would display any recognizable phenotype. We have chosen *Streptomyces ghanaensis* ATCC14672 [2, 3, 15, 16] for this purpose, because it encodes ortholog of *Sco1728*, *SSFG\_05654*, and the latter has a genome context different from that observed for *sco1728* or its orthologs from the other well studied streptomycetes (see Results for more details). Therefore, our aim was to disrupt *ssfg\_05654* and characterize the resulting *S. ghanaensis* mutant which would provide new insights into function of *sco1728* orthologous group.

### Materials and methods

In this work a wild type moenomycin producer *S. ghanaensis* ATCC 14672 was used. *Bacillus cereus* ATCC 19637 was used as a moenomycin-sensitive test culture in antibiotic disc diffusion assays of moenomycin production by ATCC14672. *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  [20] was used for routine subcloning. *E. coli* ET12567 harboring conjugative plasmid pUZ8002 [11] was used to perform intergeneric conjugation from *E. coli* to ATCC14672. *E. coli* BW25113 [6] harboring plasmid pIJ790 was used to carry out RedET-mediated gene replacement [6]. Solid oatmeal (40g/l oat flour, 20g/l agar) and soy-mannitol media [11] were used for strains maintenance, *Streptomyces* spore suspension harvesting, and plating *E. coli* – *Streptomyces* matings [1]. *B. cereus* and *E. coli* strains were grown in liquid or agar LB medium supplemented with appropriate antibiotic (if needed) at either 28 and 37°C, respectively. For visual and microscopic lawn examination, strains were grown on oatmeal, soy-flour and TSB media. Plasmids pKC0702 [11] and pIJ774 [6] were used for *ssfg\_05654* expression and amplification of *aac(3)IV* cassette for recombineering experiments, respectively.

Genomic DNA from *Streptomyces* and plasmid DNA from *E. coli* were isolated using standard protocols [11, 20]. Restriction enzymes and molecular biology reagents were used according to recommendation of suppliers (NEB, MBI Fermentas). Genome sequence of *S. ghanaensis* ATCC14672 and sequence of *SSFG\_05654* protein is accessible through NCBI website.

Moenomycin production by *S. ghanaensis* strains was studied after five days of cultivation in liquid TSB medium as described by Makitrynskyy et al. [12]. Antibiotic resistance was analysed by using the disc diffusion method.

For scanning electron microscopy (SEM), small pieces of 7-day-old sporulating lawn were cut off the oatmeal agar plate samples, vacuum-dried and directly analyzed on a Jeol JSM-T220A scanning microscope.

Orthologs prediction was carried out via reciprocal BLASTP analyses. Analysis of genomic context of *ssfg\_05654* was based on gene annotation provided by NCBI Genome server. Phylogenetic analysis of *SSFG\_05654* homologs was carried out using maximum-likelihood algorithm at [www.phylogeny.fr](http://www.phylogeny.fr).

### Results and discussion

Gene *ssfg\_05654* encodes a small putative protein of 128 amino acids with predicted molecular weight 13.43 kDa. Reciprocal Blast searches identified a number of orthologs in sequenced streptomycete genomes. Phylogenetic tree (Fig. 1) is composed of the proteins showing the highest level of identity to *SSFG\_05654*: *SCO1728 S. coelicolor* (87%), *STVIR\_6947 S. viridochromogenes* (85%), *SHJG\_3180 S. hygrosopicus subsp. jinggangensis* 5008 (85%), *SSEG\_05154 S. sviveus* ATCC 29083 (84%), *SZN\_24780 S. zinciresistens* K42 (86%), *SAV\_6565*



*S. avermitilis* MA-4680 (84%), SCAB\_72381 *S. scabiei* 87.22 (82%).

Chromosomal segment containing *ssfg\_05654* is highly syntenous across streptomycete genomes. The genes adjacent to *ssfg\_05654* are annotated as the ones encoding acetyltransferase (*ssfg\_05653*), cellulose-binding protein (*ssfg\_05650*), lipase (*ssfg\_05649*), protease (*ssfg\_05647*). The listed proteins are most likely used by the strain to provide nutrients for growth. Genes *ssfg\_05657* and *SSFG\_05658* encode succinoglycan biosynthesis protein and glycosyltransferase, respectively, probably responsible for exopolysaccharide production. Although similar gene arrangement is common for many *Streptomyces*, we revealed, using extensive BLAST searches, that *S. coelicolor* genome does not encode orthologs of SSFG\_05657 and 05658. We also noted, that, unlike most YtrA subfamily regulatory genes, *ssfg\_05654* is not part of an operon including ABC transporter gene.

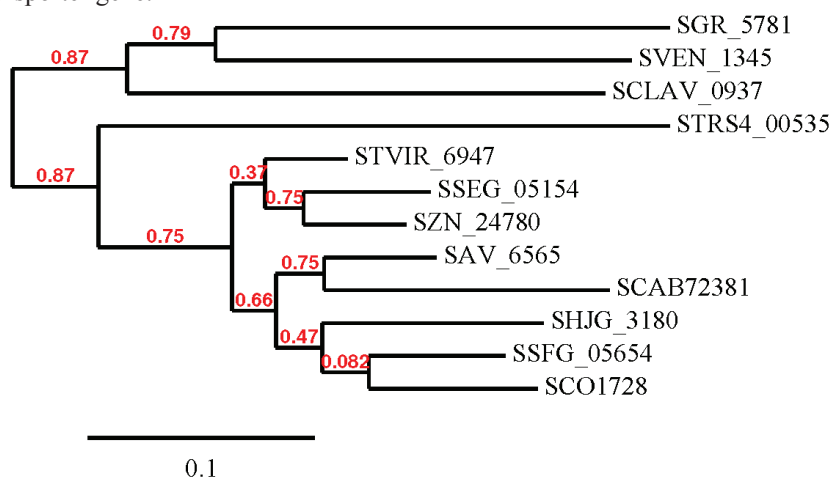


Fig. 1. Unrooted maximum-likelihood phylogram showing the relationships between SSFG\_05654 and its nearest relatives from *Streptomyces* genus. Confidence aLRT values are shown on the nodes. The tree was built with the help of phylogeny.fr v.2 server [5]. Protein abbreviation – see the text. The scale bar indicates number of amino acids substitution per position.

The *ssfg\_05654* in *S. ghanaensis* chromosome has been replaced with apramycin resistance cassette derived from pIJ774 [6]. For this purpose, the *ssfg\_05654* sequence with 1500 bp flanking regions was amplified from chromosome with primer pair SSFG\_05654for (AAATCTAGAAACTCGTCCTCGTCCAGCCG) and SSFG\_05654rev (AAAGGATCCT-GACCAAGGGGTACGCGGTG). The amplicon was digested with endonucleases BamHI and XbaI and cloned into respective sites in pKC0702 yielding pKCSSFG\_05654. The plasmid was verified by restriction mapping. To generate construct with replaced gene, RedET technology has been implicated [6]. Apramycin resistance cassette was amplified from pIJ774 using following primer pair SSFG\_05654Am\_for (GTGCGGGACAATCGGGCCGTGACCTTGAAGATC-CATATGATATCTCTAGATACCG) and SSFG\_05654Am\_rev (CTACTCCCCGTAGACCG-CCCGCAGGGCGTCCCGCACGGC AAAAAAGCTGGAGCTC). The amplicons were introduced through electroporation into BW25113 (pIJ790) strain harboring pKCSSFG\_05654. The resulting gene disruption construct pKCSSFG\_05654::aac(3)IV was conjugally transferred from *E. coli* ET12567 (pUZ8002, pKCSSFG\_05654::aac(3)IV) into *S. ghanaensis*.

Transconjugants were selected for resistance to hygromycin (50 µg/ml). To promote single and double cross-over between the plasmid and respective region of the ATCC14672 genome,

the initial transconjugants were incubated at 40°C for 3 days in TSB and then plated onto oatmeal agar containing apramycin. Apramycin-resistant colonies were screened for hygromycin sensitivity, an indicative of loss of vector sequences. The expected colonies were identified and *ssfg\_05654* replacement with *aac(3)IV-oriT* cassette was verified via PCR (data not shown).

After five days of growth on oatmeal medium strain *S. ghanaensis* SSFG\_05654::Am looks like the wild type. It was able to form aerial hyphae with subsequent spore formation but showed a slightly delayed production of a green spore pigment. However, scanning electron microscopy did not reveal differences between mature spore of both strains (shape, size and amount was same, Fig. 2A) when growing on oatmeal agar. At the same time, growth of the wild type and *ssfg\_05654* mutant strains on TSB-agar plates is markedly different. *S. ghanaensis* SSFG\_05654::Am exhibited the so called “*bald*” (Bld) phenotype [7–9, 11] – it did not form aerial mycelium and spores (Fig. 2B). Scanning electron microscopy showed that the mutant produced sparse hyphae and aerial mycelium (Fig. 2F). There are a few GntR regulators known to be involved in streptomycete morphogenesis regulation, although clear mechanism of action is yet to be investigated. For instance, the *devA* mutant of *S. coelicolor* produces rare aerial hyphae that further develop aberrant spore chains [9]. The *agl3R* mutant shows Whi-phenotype (impaired spore pigmentation). This gene acts to repress its own transcription as well as immediately adjacent ABC transporters for carbohydrate uptake [7]. YtrA-like regulator LndYR affects spore formation and antibiotic production in *S. globisporus* 1912 [14]. Thus, GntR regulators appear to be connected with developmental processes in streptomycetes.

A plasmid for complementation has been constructed to verify that the observed phenotype is not caused by unanticipated polar effects or genome rearrangements. The entire *ssfg\_05654* sequence with its own promoter was amplified from chromosomal DNA using following primers: SSFG\_for (AAATCTAGATGTGTCCGGGATGCACGTAC) and SSFG\_rev (AAAGGATCCGGGCTGTACCTGTAGCCGTA). The PCR product was digested with endonucleases BamHI and XbaI and ligated with respective sites of pIJ82 to yield pIJSSFG\_05654. A plasmid pIJSSFG\_05654 was conjugally transferred into *S. ghanaensis* giving transconjugants *S. ghanaensis* pIJSSFG\_05654. The complemented strain had growth rate and morphological features identical to that of the wild type (Fig. 2G, H).

In *B. subtilis* YtrA protein was shown to regulate cell envelope stress responses to cell wall antibiotics [19]. Thus, we decided to check the susceptibility of *S. ghanaensis* SSFG\_05654::Am to different antibiotics, including  $\beta$ -lactams and glycopeptides, since the latter target peptidoglycan synthesis. An antibiotic disk diffusion assay was carried out. We tested inhibitors of transcription (rifampicin), translation (streptomycin, kanamycin, gentamycin, erythromycin, lincomycin), peptidoglycan precursor biosynthesis (fosfomycin), membrane disruptors (polymixin, bacitracin), binders of cell wall precursors (teicoplanin, ristocetin) and  $\beta$ -lactams that target peptidoglycan transpeptidases (benzylpenicillin, cefalotin, cephalixin, carbenicillin, ampicillin). The results were recorded after 1 and 3 days of growth of the strains on TSB agar plates in presence of antibiotic discs. We revealed that the antibiotic resistance profile of the wild type and mutant strains was identical for all groups of antibiotics being tested except for  $\beta$ -lactams. Namely, after 24 h of incubation *S. ghanaensis* SSFG\_05654::Am displayed significant susceptibility to benzylpenicillin, ampicillin and cephalixin (diameters of growth inhibition zones were 25±1, 23±1, and 18±1 mm, respectively) in comparison to the wild type (no growth inhibition zone at all). On third day of growth the inhibition zone around the aforementioned antibiotic discs was decreased (on average, from 25–18 mm to 15–10 mm), although the growth within it was not abundant. We confirmed increased sensitivity of

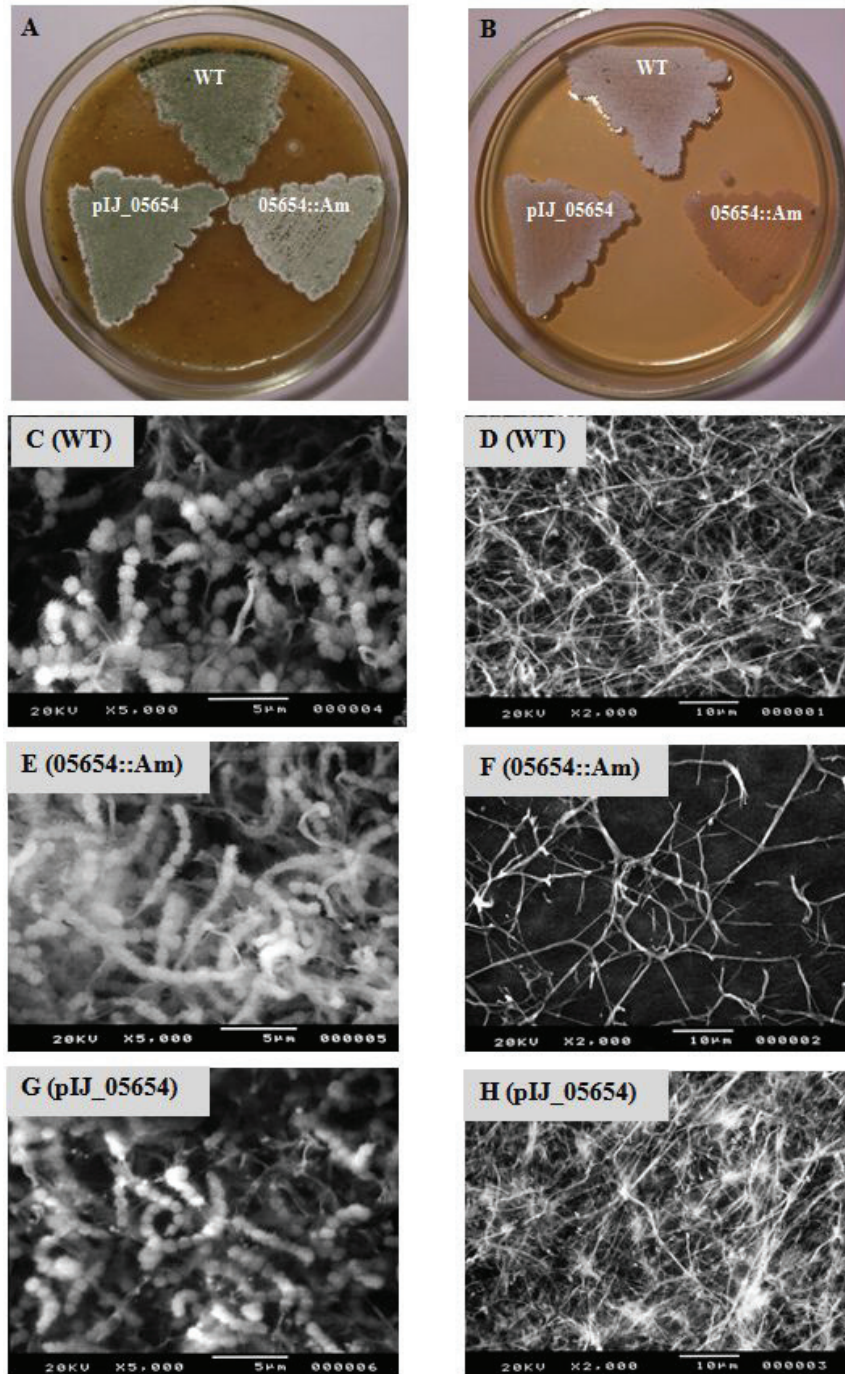


Fig. 2. Lawns of *S. ghanaensis* strains on oatmeal (A) and TSB (B) plates, and SEM images of the latter (C-H). Labels: WT – ATCC14672; SSFG\_05654::Am – knockout strain; pIJ\_05654 – complementation of the mutant. C and D, E and F, G and H represent the same lawn under  $\times 5K$  and  $\times 2K$  magnification, respectively.

SSFG\_05654::Am to benzylpenicillin through analysis of strain's survival on TSB plates with increasing concentrations of this antibiotic (Fig. 3). Indeed, while the wild type displayed roughly 2 and 0.4% survival rate at 30 and 100 mcg/ml of benzylpenicillin, respectively, the mutant showed 0.07% survival at 30 mcg/ml, and no survival at 100 mcg/ml. Since we plated around  $3 \times 10^6$  cfu of the mutant on 100 mcg/ml antibiotic plates, this implies that survival rate at this concentrations will not exceed 0.00003%. Hence, at 100 mcg/ml of benzylpenicillin, the resistance of the mutant strain to the antibiotic is at least four orders of magnitude lower than that of initial strain. At the moment we can only speculate that SSFG\_05654 regulates synthesis of exopolysaccharide layer of cell wall. Thus,  $\beta$ -lactam antibiotics can easier target peptidoglycan synthesis if mutant strain *S. ghanaensis* SSFG\_05654::Am does not produce any additional extracellular polysaccharides.

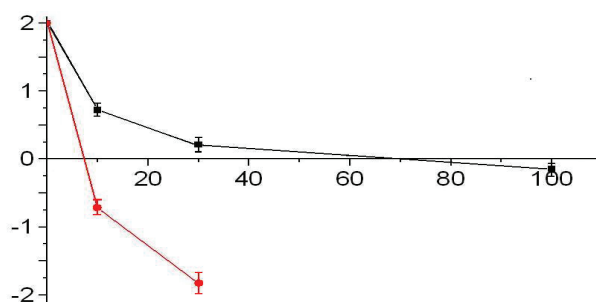


Fig. 3. Growth of *S. ghanaensis* wild type (A) and *S. ghanaensis* SSFG\_05654::Am (B) in presence of increasing amounts of benzylpenicillin. X-axis – antibiotic concentrations (mcg/ml); Y-axis –  $-\lg$  % of survival. Error bars represent standard error.

We checked whether *ssfg\_05654* knockout had effect on biosynthesis of moenomycin, the only secondary metabolite known to be produced by *S. ghanaensis* [13]. The wild type and mutant strains were grown in TSB, and equal amounts of the mycelia were used to extract the antibiotic. The bioassay revealed no significant difference in the levels of moenomycins present in the extracts. Hence, SSFG\_065654 is not connected to secondary metabolism of *S. ghananensis*, at least under our experimental conditions.

In conclusion, this study has revealed that YtrA subfamily SSFG\_065654 of *S. ghanaensis* ATCC14672 is a pleiotropic regulator implicated in morphological differentiation and antibiotic resistance under certain growth condition. The protein is needed for mycelium formation while growing on TSB medium but not on oatmeal medium. YtrA-like regulators are metabolite/condition-responsive proteins that modify genes expression in response to certain environmental challenges. It seems that SSFG\_065654 responds to nutrient status of the cells, because the mutant phenotype was observed on TSB agar, containing aminoacid-rich soy hydrolyzate, but not on oligotrophic, polysaccharide-based oatmeal medium. The mutant strain is more sensitive to  $\beta$ -lactam antibiotics that could occur due to absent or impaired synthesis of exopolysaccharide layer, likely controlled by the genes *ssfg\_05657*, *05658* in the vicinity of the *ssfg\_05654* gene. Failure to produce this layer (or its diminished amount) may provide easier access to transpeptidases, targets of  $\beta$ -lactams on the surface of the cell. Alternatively, SSFG\_05654 can be involved in regulation of antibiotic stress response, like it has been recently described for *B. subtilis* YtrA protein. Finally, our work provides a cautionary tale about the challenges in ascribing a function to the group of orthologous genes on the basis of study a single gene and *in silico* analysis. The proteins encoded by *ssfg\_05654* and *sco1728* are clearly very similar and phylogenetically close to each other (see Fig. 1), and yet their effects on respective host bacteria are very different.



**Acknowledgments.** *Work of the first author was supported by Visby fellowship from Swedish Institute. Work at the Prof. V. Fedorenko lab was supported by the grant Bg-98F from the Ministry of Education and Science of Ukraine.*

## REFERENCES

1. Климичин Д., Громико О., Федоренко В. Використання міжродової кон'югації *Escherichia coli* – *Streptomyces* для перенесення рекомбінантних ДНК в штам *Streptomyces nogalater* ІМЕТ 43360 // Цитологія і генетика. 2007. Т. 41. С. 263–267.
2. Рабик М., Мутенко Г., Остап Б., Федоренко В. Роль гена *absA2<sub>gh</sub>* у регуляції біосинтезу моеноміцину А у *Streptomyces ghanaensis* ATCC 14672 // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2012. Вип. 59. С. 100–107.
3. Рабик М., Остап Б., Волкер С., Федоренко В. Виявлення і вивчення регуляторних генів *nsdAgh* і *atrAgh* в штамі *Streptomyces ghanaensis* ATCC 14672 // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2010. Вип. 53. С. 41–48.
4. An S.Q., Lu G.T., Su H.Z. et al. Systematic mutagenesis of all predicted gntR genes in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* reveals a GntR family transcriptional regulator controlling hypersensitive response and virulence // Mol. Plant. Microbe Interact. 2011. Vol. 24. N 9. P. 1027–1039.
5. Dereeper A., Guignon V., Blanc G., Audic S. et al. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist // Nucleic Acids Res. 2008. Vol. 36. P. 465–469.
6. Gust B., Chandra G., Jakimowicz D. et al. Lambda red-mediated genetic manipulation of antibiotic-producing *Streptomyces* // Adv. Appl. Microbiol. 2004. Vol. 5. P. 107–128.
7. Hillerich B., Westpheling J. A new GntR family transcriptional regulator in *Streptomyces coelicolor* is required for morphogenesis and antibiotic production and controls transcription of an ABC transporter in response to carbon source // J. Bacteriol. 2006. Vol. 188. P. 7477–7487.
8. Hoskisson P. A., Rigali S. Chapter 1: Variation in form and function the helix-turn-helix regulators of the GntR superfamily // Adv. Appl. Microbiol. 2009. Vol. 69. P. 1–22.
9. Hoskisson P. A., Rigali S., Fowler K. et al. DevA, a GntR-like transcriptional regulator required for development in *Streptomyces coelicolor* // J. Bacteriol. 2006. Vol. 188. P. 5014–5023.
10. Ji L., Xie J. GntR family regulators of the pathogen of fish tuberculosis *Mycobacterium marinum* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2011. Vol. 410. P. 780–785.
11. Kieser T., Bibb M. J., Buttner M. J. et al. Practical *Streptomyces* Genetics. Norwich: John Innes Foundation. 2000. 634 p.
12. Makitrynsky R., Rebets Y., Ostash B. et al. Genetic factors that influence moenomycin production in streptomycetes // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2010. Vol. 37. P. 559–566.
13. Ostash B., Doud E.H., Lin C. et al. Complete characterization of the seventeen step moenomycin biosynthetic pathway // Biochem. 2009. Vol. 48. P. 8830–8841.
14. Ostash B., Rebets Y., Myronovskyy M. et al. Identification and characterization of the *Streptomyces globisporus* 1912 regulatory gene *lndYR* that affects sporulation and antibiotic production // Microbiology. 2011. Vol. 157. P. 1240–1249.
15. Ostash B., Saghatelian A., Walker S. A streamlined metabolic pathway for the biosynthesis of moenomycin A // Chem. Biol. 2007. Vol. 14. P. 257–267.
16. Rabyk M., Ostash B., Rebets Y. et al. *Streptomyces ghanaensis* pleiotropic regulatory gene *wblA(gh)* influences morphogenesis and moenomycin production // Biotechnol. Lett. 2011. Vol. 33(12). P. 2481–2486.
17. Rigali S., Derouaux A., Giannotta F., Dusart J. Subdivision of the helix-turn-helix GntR family of bacterial regulators in the FadR, HutC, MocR, and YtrA subfamilies // J. Biol. Chem. 2002. Vol. 277. P. 12507–12515.

18. Röttig A., Steinbüchel A. Acyltransferases in bacteria // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2013. Vol. 77. P. 277–321.
19. Salzberg L. I., Luo Y., Hachmann A. B. et al. The *Bacillus subtilis* GntR family repressor YtrA responds to cell wall antibiotics // *J. Bacteriol.* 2011. Vol. 193. P. 5793–5801.
20. Sambrook J., Russell D. W. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory. 2001. 450 p.
21. Sezonov G., Possoz C., Friedmann A. et al. KorSA from the *Streptomyces* integrative element pSAM2 is a central transcriptional repressor: target genes and binding sites // *J. Bacteriol.* 2000. Vol. 182. P. 1243–1250.
22. Tsyplik O., Zaburannyi N., Ostash B., Fedorenko V. Structure-based characterization of GntR superfamily regulators of *Streptomyces coelicolor* A3(2) // VIII Parnas Conference, Warsaw, Poland, August 27–31 August 2011: Abstracts – Warsaw, 2011. P. 03.2.
23. Vindal V., Ranjan S., Ranjan A. *In silico* analysis and characterization of GntR family of regulators from *Mycobacterium tuberculosis* // *Tuberculosis.* 2007. Vol. 87. P. 242–247.
24. Vindal V., Suma K., Ranjan A. GntR family of regulators in *Mycobacterium smegmatis*: a sequence and structure based characterization // *BMC Genomics.* 2007. V. 8. P. 289.
25. Yoshida K.I., Fujita Y., Ehrlich S.D. An operon for a putative ATP-binding cassette transport system involved in acetoin utilization of *Bacillus subtilis* // *J. Bacteriol.* 2000. Vol. 182. P. 5454–5461.

Стаття: надійшла до редакції 31.05.13

прийнята до друку 08.07.13

### YTRА-ПОДІБНИЙ РЕГУЛЯТОРНИЙ ГЕН *SSFG\_05654* ВПЛИВАЄ НА МОРФОГЕНЕЗ І СТІЙКІСТЬ ДО АНТИБІОТИКІВ У *STREPTOMYCES GHANAENSIS* ATCC14672

О. Ципік,<sup>1</sup> Ю. Дацюк,<sup>1</sup> К. Флярд,<sup>2</sup> В. Федоренко,<sup>1</sup> Б. Осташ<sup>\*1</sup>

<sup>1</sup>Львівський національний університет імені Івана Франка  
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна  
e-mail: bohdanostash@gmail.com

<sup>2</sup>Лундський університет  
Лунд 22362, Швеція

Ген *ssfg\_05654* продуцента моеноміцину *Streptomyces ghanaensis* ATCC14672 кодує транскрипційний регулятор підродини YtrA. Отримано мутантний штам *S. ghanaensis* 05654::Am, у котрому ген *ssfg\_05654* заміщено на касету стійкості до апраміцину. Порівняно з вихідним штамом під час росту цього мутанта на вівсяному середовищі спостерігається затримка формування повітряного міцелію та синтезу спорового пігменту. Водночас на триптон-соєвому середовищі мутант виявляє Bld-подібний фенотип, утворюючи лише поодинокі гіфи повітряного міцелію. Штам *S. ghanaensis* 05654::Am більш чутливий до β-лактамних антибіотиків пеніциліну й ампіциліну, ніж дикий тип. Нокаут гена *ssfg\_05654* не впливає на рівень синтезу моеноміцину.

**Ключові слова:** *Streptomyces ghanaensis*, транскрипційні фактори НТН, морфологічна диференціація, моеноміцин.



**УТРА-ПОДОБНЫЙ РЕГУЛЯТОРНЫЙ ГЕН *ssfg\_05654* ВЛИЯЕТ НА  
МОРФОГЕНЕЗ И УСТОЙЧИВОСТЬ К АНТИБИОТИКАМ  
*STREPTOMYCES GHANAENSIS* ATCC14672**

**О. Цыпик,<sup>1</sup> Ю. Дацюк,<sup>1</sup> К. Флярд,<sup>2</sup> В. Федоренко,<sup>1</sup> Б. Осташ\*<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Львовский национальный университет имени Ивана Франко  
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина  
e-mail: bohdanostash@gmail.com

<sup>2</sup>Лундский университет  
Лунд 22362, Швеция

Ген *ssfg\_05654* продуцента моеномицина *Streptomyces ghanaensis* ATCC14672 кодирует транскрипционный регулятор подсемейства YtrA. Получен мутант *S. ghanaensis* 05654::Am, у которого *ssfg\_05654* замещен генной кассетой устойчивости к апрамицину. По сравнению с исходным штаммом, при росте этого мутанта на овсяной среде наблюдается задержка формирования воздушного мицелия и синтеза спорового пигмента. В то же время на триптон-соевой среде мутант проявляет Bld-подобный фенотип, образуя лишь одиночные гифы воздушного мицелия. Штамм *S. ghanaensis* 05654::Am более чувствителен к β-лактамным антибиотикам пенициллину и ампициллину, чем дикий тип. Нокаут гена *ssfg\_05654* не влияет на уровень синтеза моеномицина.

*Ключевые слова:* *Streptomyces ghanaensis*, транскрипционные факторы НТН, морфологическая дифференциация, моеномицин.

## ПОРІВНЯЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ХАРЧОВИХ АРОМАТИЗАТОРІВ РІЗНИХ ВИРОБНИКІВ ЩОДО МУТАГЕННОЇ АКТИВНОСТІ

І. Боднар\*, О. Ільков, С. Горбулінська, Л. Боднар

Львівський національний університет імені Івана Франка  
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна  
e-mail: bodivas@gmail.com

Досліджено мутагенну активність зразків натурально-ідентичних харчових ароматизаторів «Шоколад» фірм «Etol» та «Akras» і «Темний шоколад» фірми «Givaudan». Ароматизатор «Шоколад» фірми «Etol» в ана-телофазному тесті на *Allium cepa* проявив токсичний ефект, спричинив появу хромосомних аберацій різних типів – хромосомних і хроматидних фрагментів, дицентриків, а також показав збільшення кількості незапліднених яєць та збільшення вдвічі частоти домінантних летальних мутацій порівняно з контролем у *Drosophila melanogaster*. Мутагенний ефект ароматизатора «Шоколад» фірми «Akras» виявлений лише для дози, збільшеної у 10 разів від добової; виявлено найвищі показники частоти домінантних летальних мутацій і збільшення кількості незапліднених яєць у *D. melanogaster*. Ароматизатор «Темний шоколад» фірми «Givaudan» проявив найменший мутагенний ефект на двох тест-системах, порівняно з ароматизаторами інших фірм, які описані вище.

*Ключові слова:* ароматизатори продуктів харчування, домінантні летальні мутації, ана-телофазний аналіз, хромосомні аберації.

На сьогоднішній день відомо більш ніж 3000 найменувань харчових ароматизаторів, які масово використовуються у виготовленні продуктів харчування, є різними за хімічним складом, серед них трапляються сполуки з мутагенними або канцерогенними властивостями. Актуальним є створення і впровадження в харчову промисловість нових безпечних для людини харчових добавок та розробка інформативних систем їх оцінки і сучасне тестування [8, 12]. Більшість харчових добавок не мають харчової цінності і в кращому випадку є біологічно інертними для організму, а в гіршому – виявляють біологічну активність. Багато з них виявилися сильними канцерогенами [2, 4, 7].

Дедалі ширше застосовують у харчовій промисловості ароматизатори. Харчові ароматизатори – це допоміжні речовини у виробництві фармацевтичних препаратів і продуктів харчування, які використовують у технологічному процесі для поліпшення запаху та смаку готової продукції [1, 5]. До складу ароматизаторів можуть входити, окрім хімічних сполук або їх сумішей, виділених із натуральної сировини, і такі хімічно синтезовані речовини, як: галова кислота, пропіленгліколь, бензойна кислота, нітрит натрію, аскорбінова кислота й інші [13]. Для більшості з цих речовин наявні дані про мутагенну активність, яка встановлена на різних тест-об'єктах [3, 5, 14]. Метою даної роботи було дослідити мутагенну активність ароматизаторів «Шоколад» різних виробників і виявити більш безпечні для використання в харчовій промисловості.

### Матеріали та методи

Матеріалами для досліджень слугували розчини харчових ідентично-натуральних ароматизаторів: «Шоколад» фірми «Etol» (Словенія), «Шоколад» фірми «Akras» (Австрія) і «Темний шоколад» фірми «Givaudan» (Швейцарія). Продукція цих фірм широко використовується у Європі та в Україні, зокрема.

Відомо, що деякими складовими ароматизатора «Шоколад» фірми «Etol» є такі хімічні речовини: масляна кислота, діацетил, дигідрокумарин, гаммаокталактон, етилбутират. Склад ароматизатора «Шоколад» фірмою «Акрас» не розголошується. Фірма «Givaudan» також не розголошує склад своєї продукції, проте відомо, що дане виробництво засноване на використанні виключно натуральної сировини. Дослідні концентрації зразків обчислювали таким чином: рекомендовану технологічну дозу, яка розрахована на 1 кг продукції, зменшували вдвічі (враховуючи, що за день людина може спожити не більше півкілограма готової продукції) і множили на середню масу людини (70 кг). Така концентрація нами названа добовою. Досліджували також дозу, збільшену в 10 разів від добової [1].

Для аналізу мутагенного ефекту використовували такі методи: метод доміантних летальних мутацій (ДЛМ) на *Drosophila melanogaster* і ана-телофазний аналіз на меристемних клітинах корінців *Allium cepa*.

Суть методу ДЛМ полягає у порівнянні частоти виникнення доміантних летальних мутацій у контролі та під дією досліджуваних речовин. Доміантні летальні мутації – це збірна група різноманітних пошкоджень генетичного матеріалу, до якої належать анеуплоїдія за аутосомами, асиметричні транслокації, великі делеції, втрата цілих хромосом [6]. Частота виникнення доміантних леталей залежить від стадії сперматогенезу. Для постановки однієї серії експерименту в поживне середовище вносили розчини досліджуваних ароматизаторів певної концентрації; личинки активно жилися, заляльковувалися, із них відбирали самців, яких схрещували з інтактними віргінними самками. У свіжих яйцекладках підраховували кількість відкладених яєць, а потім після 48 год термостатування ( $t=24^{\circ}\text{C}$ ) – кількість яєць, що не розвивалися. Серед нерозвинутих розрізняли незапліднені (прозорі), яйця з ранньою (матові) та пізньою (з кольоровим відтінком) ембріональною загибеллю. Частоту доміантних леталей визначали за співвідношенням кількості яєць із ДЛМ до кількості запліднених яєць у відсотках [6].

Суть ана-телофазного методу на меристемних клітинах корінців *Allium cepa* полягає у виявленні хромосомних аберацій при пророщуванні насінин на досліджуваних субстратах. Контролем слугувала дистильована вода. Пророщували насіння при температурі  $22^{\circ}\text{C}$ . Відсутність проростання насіння протягом 3 діб вважали проявом токсичної дії досліджуваного зразка. Фіксацію проводили у вечірній час (18–20 год), коли кількість мітотичних поділів максимальна, і повторювали свіжою сумішшю через 3–4 год. Загальна тривалість фіксації – 24 год. Для фіксації використовували фіксатор Кларка. На тривале збереження переносили у 70% спирт. Зафіксовані корінці використовували для виготовлення препаратів, фарбування проводили розчином ацетоорсеїну [9]. Аналіз проводили за допомогою мікроскопа Olympus XS-5520 (збільшення 10x90). Клітини аналізували на стадії анафази, коли відстань між ділянками хромосом на полюсах більша від розмірів самих хромосом, а також на стадії ранньої телофази – на початку утворення фрагмопласту [10, 11]. Основними типами аберацій, які виявляли ана-телофазним методом, були делеції і транслокації.

### Результати і їхнє обговорення

Проведено дослідження добових і збільшених у 10 разів доз харчових ароматизаторів трьох фірм виробників на індукування хромосомних аберацій у меристемних клітинах корінців *A. cepa* (табл. 1, рис. 1).

Ароматизатор «Шоколад» фірми «Акрас» спричиняв зростання рівня хромосомних аберацій, індукував переважно хромосомні та хроматидні розриви. У контролі частота виникнення мутацій становила  $1,69\pm 0,68\%$ . При пророщенні насіння на розчині харчового ароматизатора «Шоколад», що відповідає добовій дозі, відсоток аберацій становив  $1,18\pm 0,52\%$ , а при добовій дозі, збільшеній у 10 разів, –  $2,42\pm 0,72\%$  (табл. 1).

Максимальна досліджувана доза харчового ароматизатора «Шоколад» фірми «Etol» проявила гострий токсичний ефект на проростання насінин цибулі. Інші концентрації тестованої речовини спричиняли появу хромосомних аберацій різних типів: хромосомних і хроматидних фрагментів, мостів. Відсоток аномалій становив  $3,37 \pm 0,89\%$  для добової дози, що більш ніж удвічі вище за показники контролю (табл. 1).

Ароматизатор «Темний шоколад» фірми «Givaudan» проявив менший мутагенний ефект, порівняно з ароматизаторами, які описані вище. Добова доза даного ароматизатора токсичного ефекту не спричиняла, що ж стосується дози, більшої у 10 разів від добової, то проявилася слабка мутагенна дія порівняно з контролем. Хімічні компоненти даного ароматизатора індукували переважно поодинокі розриви хромосом.

Таблиця 1

Індукування хромосомних аберацій ароматизаторами «Шоколад» різних фірм в ана-телофазному тесті на *A. cerea*

Зразок	Досліджувана концентрація, г/кг	Всього ана-телофаз	Кількість аномальних ана-телофаз					Частота, $M \pm m$	t	p
			I	II	[	]	інші			
«Шоколад»	0,08	425	4	4	–	1	–	$1,18 \pm 0,52$	0,59	$P > 0,05$
«Акгас»	0,8	455	6	3	2	–	–	$2,42 \pm 0,72$	0,74	$P > 0,05$
«Шоколад»	0,04	415	3	5	3	2	1	$3,37 \pm 0,89$	1,50	$P > 0,05$
«Etol»	0,4	–	–	–	–	–	–	–	–	–
«Темний шоколад»	0,02	388	3	2	–	1	1	$1,80 \pm 0,68$	0,11	$P > 0,05$
«Givaudan»	0,2	395	5	2	1	–	1	$2,28 \pm 0,75$	0,58	$P > 0,05$
Контроль		355	3	2	1	–	–	$1,69 \pm 0,68$		

**Примітка.** I – одинарний фрагмент; II – подвійний фрагмент; [ – одинарний (хроматидний) міст; ] – подвійний (хромосомний) міст. \*Доза 0,4 г/кг виявилася токсичною для *A. cerea*.

На наступному етапі роботи ми проаналізували індукування домінуючих летальних мутацій у *Drosophila melanogaster* за дії різних концентрацій ароматизаторів трьох фірм-виробників (табл. 2). При дослідженні харчового ароматизатора «Шоколад» фірми «Акгас» виявили найвищі показники ДЛМ. Відсоток яєць із ранніми ДЛМ при дослідженні добової дози ароматизатора «Шоколад» становив  $6,87 \pm 0,56$ , дози, збільшеної у 10 разів, –  $7,39 \pm 1,76$ , що на 2–3% вище за показники контролю ( $4,18 \pm 0,40$ ). Відсоток незапліднених яєць при добовій дозі становив  $5,78 \pm 0,29$ , при збільшеній у 10 разів –  $6,07 \pm 0,72$ , що удвічі вище від контрольних даних ( $3,18 \pm 1,58$ ).

Результати, отримані при дослідженні ароматизатора «Шоколад» фірми «Etol», також показали збільшення частоти домінуючих летальних мутацій, порівнюючи з контролем. При дослідженні добової дози спостерігали збільшення незапліднених яєць більш, ніж удвічі ( $7,07 \pm 1,68$ ), порівняно з контрольними показниками ( $3,18 \pm 1,58$ ). Доза збільшена в 10 разів від добової індукувала збільшення відсотка яєць із ранніми ДЛМ ( $6,30 \pm 0,85$ ) порівняно з контролем ( $4,18 \pm 0,40$ ). Загальна частота ДЛМ для добової дози та збільшеної в 10 разів дози становила відповідно  $7,01 \pm 1,52\%$  та  $7,13 \pm 0,83\%$ , що приблизно на 2% вище від показників контролю.

За дії ароматизатора «Темний шоколад» фірми «Givaudan» не спостерігали значного підвищення рівня виникнення ранніх і пізніх домінуючих летальних мутацій у дрозофіли, однак відсоток незапліднених яєць трохи перевищував контрольні показники. Частота ДЛМ для всіх досліджуваних випадків незначно перевищувала спонтанний рівень ( $6,85 \pm 0,77\%$  і  $6,91 \pm 0,64\%$  для добової дози та збільшеної в 10 разів відповідно).

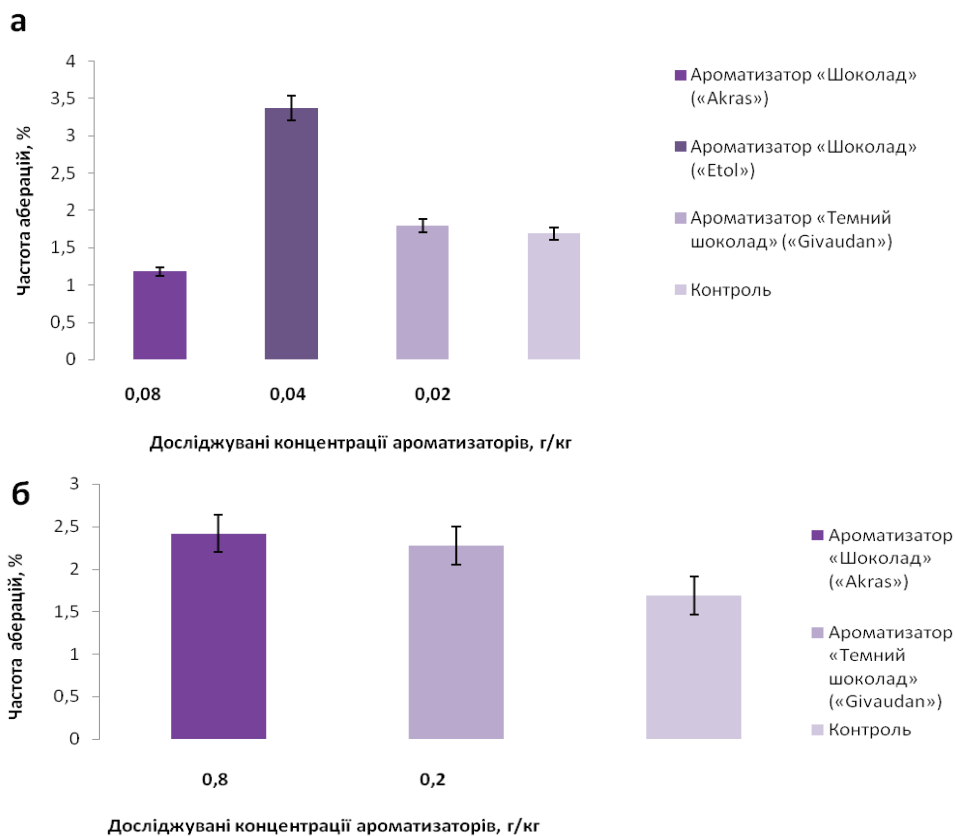


Рис. 1. Частота виникнення мутацій, індукованих харчовими ароматизаторами «Шоколад» фірм «Аkras» та «Etol» і «Темний шоколад» фірми «Givaudan» в ана-телофазному тесті на *A. cerea*: а – добова доза; б – доза, збільшена в 10 разів від добової.

Таблиця 2

Індукування домінуючих летальних мутацій у *Drosophila melanogaster* ароматизаторами «Шоколад» різних фірм-виробників

Зразок	Досліджу-вана концен-трація, г/кг	Кількість відкладених яєць	Відсоток незапліднених яєць, %	Відсоток яєць із ранніми ДЛМ, %	Відсоток яєць із пізніми ДЛМ, %	Частота ДЛМ, %	t	p
«Аkras»	0,08	1242	5,78±0,29	6,87±0,56	0,65±0,25	8,19±0,83	2,67	P<0,05
«Шоколад»	0,8	1293	6,07±0,72	7,39±1,76	1,35±0,29	9,11±1,52	2,34	P<0,05
«Etol»	0,04	1229	7,07±1,68	5,37±2,38	1,13±0,29	7,01±1,52	2,59	P<0,05
«Шоколад»	0,4	1158	5,52±0,25	6,30±0,85	0,43±0,25	7,13±0,83	3,65	P<0,05
«Givaudan»	0,02	1247	4,72±0,54	5,81±0,87	0,35±0,65	6,85±0,77	2,63	P<0,05
«Темний шоколад»	0,2	1231	6,75±0,76	4,21±0,88	1,05±0,42	6,91±0,64	2,44	P<0,05
Контроль		1267	3,18±1,58	4,18±0,40	1,26±0,57	5,58±0,80		

Таким чином, нами були отримані результати і проведений аналіз щодо індукування хромосомних аберацій у меристемних клітинах *A. cerea* та домінуючих летальних мутацій на *D. melanogaster* ароматизаторами «Шоколад» різних фірм-виробників. При дослі-

дженні впливу ароматизаторів на індукування хромосомних аберацій на рослинній тест-системі саме ароматизатор «Шоколад» фірми «Etol» показав найвищий рівень мутагенної активності, збільшення частоти делецій і транслокацій на 2% порівняно з контролем. Із літературних даних відомо, що масляна кислота, діацетил, диметилгіоксаль, етилбутират є алкільними сполуками та можуть викликати мутації як на рівні генів, так і на рівні хромосом. Алкільюючі агенти здатні вибірково взаємодіяти з атомами нітрогену (найчастіше в молекулі гуаніну), що може викликати збільшення кількості помилок за комплементарного сполучення азотистих основ. Такі передмутаційні зміни можуть призвести до виникнення мутацій типу заміни пар основ. Якщо сполука містить багато алкільних груп, що стосується і складових ароматизатора «Шоколад», то вона може спричинити появу поперечних зшивок ланцюгів ДНК, що в подальшому в процесі реплікації призводить до розривів ниток ДНК. За хімічною структурою дигідрокумарин в основі має бензолні кільця, тому теоретично може інтеркалювати між азотистими основами, що в подальшому спричинить мутацію типу зсуву рамки зчитування. На жаль, залишається невідомою кількісна характеристика складових ароматизатора «Шоколад» фірми «Etol». Крім переліку хімічних сполук, немає жодних даних про їх кількість в одиниці ароматизатора, що надзвичайно важливо при вивченні хімічного мутагенезу. Відкритим залишається також питання біо-трансформації хімічних сполук, що є складовими ароматизаторів. Відомо, що ксенобіотики, які потрапляють в організм людини, окислюються оксидазами зі змішаними функціями шляхом епоксидування подвійних зв'язків, гідроксилуванням, деалкілюванням та ін., у зв'язку з чим можуть виникати активні метаболіти з ще більш вираженою мутагенною чи канцерогенною активністю.

За дії ароматизатора «Шоколад» фірми «Akras» зафіксовано найвищі показники індукування домінантних летальних мутацій у *D. melanogaster* ( $9,11 \pm 1,52$ ). Оскільки в досліді ароматизаторами харчувалися тільки самці (самки перебували на звичайному поживному середовищі), скоріше за все, хімічні складові даного ароматизатора мають здатність впливати на проходження сперматогенезу: або блокувати утворення нормальних статевих клітин на певних етапах гаметогенезу, в тому числі сперматозоїдів, або ж змінювати їхню здатність до запліднення. Ароматизатор фірми «Etol» також індукував збільшення кількості яєць із ранніми домінантними летальними мутаціями, проте у відсотковому співвідношенні ці показники були меншими і становили для добової дози  $5,37 \pm 2,38\%$ , а при збільшеній у 10 разів дозі –  $6,30 \pm 0,85\%$  (контроль –  $4,18 \pm 0,40\%$ ). Для ароматизатора «Темний шоколад» фірми «Givaudan» процентне співвідношення частоти домінантних летальних мутацій достовірно не відрізнялося від контролю.

Виходячи з порівняльної характеристики генотоксичної активності різних доз ароматизаторів «Шоколад» трьох фірм потужних європейських виробників, ми виявили, що найбільш безпечним щодо мутагенного навантаження на геном людини є використання ароматизаторів швейцарської фірми «Givaudan», яка для виготовлення своєї продукції використовує переважно натуральну сировину. Проте, з токсикологічної точки зору, харчові добавки навіть природного походження не можна вважати абсолютно нешкідливими для здоров'я людей, адже більшість відомих на сьогодні токсичних речовин мають саме природне походження.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Булдаков А. С. Пищевые добавки: справочник. СПб.: Северо-Запад, 1996. С. 240–241.
2. Григорьева Р. З. Безопасность продовольственного сырья и продуктов питания: учеб. пособие. Кемерово: Терра, 2004. С. 86–88.



3. Дурнев А. Д., Середенин С. Б. Мутагены (скрининг и фармакологическая профилактика воздействий). М.: Медицина, 1998. 328 с.
4. Дурнев А. Д., Орещенко А. В., Саривили Н. Г. Продукты питания и индуцированный мутагенез: обзор // Хранение и переработка сельхозсырья. 1995. № 5. С. 21–23.
5. Дурнев А. Д. Мутагены и антимутагены в продуктах питания // Генетика. 1997. Т. 33. № 2. С. 165–176.
6. Медведев Н. Н. Практическая генетика. М.: Наука, 1968. 294 с.
7. Нейман И. М. Канцерогены и пищевые продукты. М.: Медицина, 1972. 152 с.
8. Орещенко А. В., Беристель И. Ф. О пищевых добавках в продуктах питания // Пищевая промышленность. М.: Просвещение, 1996. С. 4–6.
9. Прохорова И. М., Ковалева М. И., Фомичева А. Н. Оценка митотоксического и мутагенного действия факторов окружающей среды: метод. указания. Ярославль: Яросл. гос. ун-т, 2003. 32 с.
10. Рожнов Г. И., Проинова В. А., Лиманцев А. В. и др. Разработка альтернативных методов оценки токсичности химических веществ на основе биотестирования // Токсикол. вестн. 1995. № 6. С. 27–29.
11. Смирнов В. Г. Цитогенетика. М.: Высшая школа, 1991. 247 с.
12. Смоляр В. І. Токсичні ефекти харчових добавок // Проблеми харчування. 2005. № 1. С. 10–15.
13. Скурихин И.М., Нечаев А. П. Все о пище с точки зрения химика: справ. издание. М.: Высшая школа, 1991. 288 с.
14. Стрижельчик Н. Г., Бариляк И. Р. Мутагенные и антимутагенные свойства пищевых добавок. Харьков: ХНУ им. Каразина, 2009. 152 с.

Стаття: надійшла до редакції 30.09.13

доопрацьована 04.11.13

прийнята до друку 05.11.13

## COMPARATIVE DESCRIPTION OF FOOD FLAVOURS OF DIFFERENT PRODUCERS IN RELATION TO MUTAGENE ACTIVITY

I. Bodnar, O. Ilkov, S. Gorbulinska, L. Bodnar

*Ivan Franko National University of Lviv  
4, Hrushevskiyi St., Lviv 79005, Ukraine  
e-mail: bodivas@gmail.com*

Mutagenic activity of the samples of natural-identical food flavors “Chocolate” produced by companies «Etol» and «Akras» and “Dark Chocolate” by company «Givaudan» were investigated. Flavour “Chocolate” by company «Etol» in *Allium cepa*-test showed toxic effects, caused the appearance of various types chromosomal aberrations chromatid and chromosomal fragments and showed an increase in the number of unfertilized eggs and doubling the frequency of dominant lethal mutations compared with the control in *Drosophila melanogaster*. Mutagenic effect of flavor «Chocolate» by company «Akras» found only in the dose increased in 10 times of daily, revealed the highest frequency of lethal mutations and increase the number of unfertilized eggs. Flavour «Dark Chocolate» by company «Givaudan» showed the lowest mutagenic effect on both test systems, compared with flavorings other companies wich described above.

*Keywords:* food flavorings, dominant lethal mutation, anaphase-telophase genotoxicity assay, chromosomal aberration.

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПИЩЕВЫХ АРОМАТИЗАТОРОВ РАЗНЫХ ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ ОТНОСИТЕЛЬНО МУТАГЕННОЙ АКТИВНОСТИ

И. Боднар, О. Ільков, С. Горбулинская, Л. Боднар

*Львовский национальный университет имени Ивана Франко  
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина  
e-mail: bodivas@gmail.com*

Исследована мутагенная активность образцов натурально-идентичных пищевых ароматизаторов «Шоколад» фирм «Etol» и «Акрас» и «Темный шоколад» фирмы «Givaudan». Ароматизатор «Шоколад» фирмы «Etol» в ана-телофазном тесте на *Allium cepa* проявил токсический эффект, вызывал появление хромосомных aberrаций разных типов – хромосомных и хроматидных фрагментов, дицентриков, а также показал увеличение количества неоплодотворенных яиц и увеличение в два раза частоты доминантных летальных мутаций по сравнению с контролем на *Drosophila melanogaster*. Самые высокие показатели частоты доминантных летальных мутаций, а также увеличение количества неоплодотворенных яиц проявил ароматизатор «Шоколад» фирмы «Акрас» в дозе, в 10 раз превышающей суточную. Ароматизатор «Темный шоколад» фирмы «Givaudan» проявил самый низкий мутагенный эффект на двух тест-системах, по сравнению с ароматизаторами других фирм, описанных выше.

*Ключевые слова:* ароматизаторы продуктов питания, доминантные летальные мутации, ана-телофазный анализ, хромосомные aberrации.

ДЕЛЕЦІЯ ГЕНА *MET4* ЗНИЖУЄ ТОЛЕРАНТНІСТЬ ДО ІОНІВ КАДМІЮ  
ТА ЇХ АКУМУЛЯЦІЮ У КЛІТИНАХ ДРІЖДЖІВ *HANSENULA POLYMORPHA*  
І *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

О. Блаженко

Інститут біології IV – Мікробіологія і генетика – RWTH Аахен  
Воррінгервег, 1, Аахен D-52056, Німеччина  
e-mail: Oleksandra.Blazhenko@googlemail.com

Досліджено участь центрального регуляторного гена метаболізму сірки *MET4* у внутрішньоклітинній акумуляції іонів кадмію та у забезпеченні толерантності до іонів кадмію. Показано, що делеція гена *MET4 Hansenula polymorpha* підвищує чутливість мутанта  $\Delta met4$  до іонів кадмію, тоді як надекспресія даного гена у трансформанта *mcMET4* підвищує його резистентність до кадмію. Дослідження акумуляції іонів кадмію виявило, що трансформант *mcGSH2 H. polymorpha* з надекспресією гена першого етапу біосинтезу глутатіону й обидва мутанти  $\Delta met4$  дріжджів *H. polymorpha* та *Saccharomyces cerevisiae* проявляли знижену глюкозозалежну адсорбцію іонів кадмію порівняно з відповідними штамми дикого типу. Висловлено припущення, що ген *MET4* залучений у дозріванні клітинного Cd-GSH комплексу, який, у свою чергу, регулює поглинання іонів кадмію.

Ключові слова: *MET4*, кадмій, *Hansenula polymorpha*, *Saccharomyces cerevisiae*.

Приблизно 13 000 тонн кадмію виробляється щорічно у світі для нікель-кадмієвих батарей, пігментів, хімічних стабілізаторів, покриття і сплавів металів [21]. Він є побічним продуктом видобування і виплавки цинку та свинцю. У минулому столітті різко зросла емісія кадмію, однією з причин чого є кадмійвмісні продукти, які рідко рециркулюють і часто викидаються з домашнім сміттям [15]. Незважаючи на те, що кадмій не потрібен для нормального метаболізму клітини, він дуже швидко поглинається коренями рослин, а це призводить до його акумуляції у продуктах харчування з потенційною загрозою здоров'ю людини [9]. Цигарковий дим також є джерелом поширення кадмію [18]. Щоб подолати токсичні ефекти кадмію, живі організми повинні суворо обмежувати надходження іонів кадмію в клітину або виробити механізми контролю його внутрішньоклітинного рівня. Ключовим механізмом детоксикації кадмію у дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* є хелатування іонів кадмію за участю глутатіону з утворенням комплексів Cd-GSH, які надалі транспортуються у вакуолю за допомогою транспортерів ABC типу Ycf1 та Vpt1 [17, 16] або назовні клітини за участю білка Yor1 [12]. Наявність комплексу Cd-GSH у цитозолі контролює поглинання кадмію у клітину [13]. Відповідно, чим вища концентрація комплексу в цитоплазмі, тим нижча абсорбція кадмію, і навпаки. Вважають, що ізоформа Gtt2 глутатіон-S-трансферази залучена у формуванні комплексу Cd-GSH у дріжджів *S. cerevisiae* [1], тоді як  $\gamma$ -глутамілтрансфераза й амінопептидаза Lar4 залучені у його вакуолярній деградації [2, 3]. Значні кількості глутатіону, необхідні для забезпечення толерантності до кадмію у дріжджів *S. cerevisiae*, досягаються за рахунок зниження утилізації сірки для синтезу білків, посиленого відтоку сірки в глутатіоновий шлях, неосинтезу ферментів сіркового шляху та зниження деградації глутатіону [7, 22]. Ключову роль у відповіді на кадмієвий стрес відіграє глобальний регулятор сіркового метаболізму білок Met4 *S. cerevisiae*. Активність даного транскрипційного фактора регулюється убіквітинуванням і залежить від сіркового статусу клітини. Однак дія іонів кадмію пошкоджує як залежне, так і неза-

лежне від деградації Met4 убіквітинування, шляхом дисоціації Met30 з кору SCF комплексу [6, 24], що, у свою чергу, призводить до індукції експресії генів асиміляції сульфату, сірко-вмісних амінокислот і біосинтезу глутатіону. Толерантність до іонів кадмію у *S. cerevisiae* також підтримується транскрипційним фактором Yap1, який позитивно регулює експресію гена *YCF1*, а також генів *GSH1* і *GLR1*, що кодують g-глутамілцистеїнсинтетазу ( $\gamma$ GCS) і глутатіонредуктазу, відповідно [23]. Подібно до білка Met4 *S. cerevisiae*, Zip1 є основним фактором, необхідним для транскрипційної відповіді дріжджів *Schizosaccharomyces pombe* на кадмієвий стрес. Клітини мутанта *zip1 S. pombe* виявляють надмірну чутливість до кадмію, подібно до кадмій-чутливих мутантів  $\Delta$ met4 *S. cerevisiae* [6, 14, 24]. У відповідь на дію іонів кадмію *S. pombe* продукує суттєво підвищені рівні неорганічного сульфідру для іммобілізації клітинного кадмію у формі нанокристалів CdS, хелатованих глутатіоном і/або фітохелатинами [5]. Показано, що всі три компоненти, GSH, полімерні похідні глутатіону, фітохелатини та неорганічний сульфід ( $S^{2-}$ ) є важливими для високої толерантності до кадмію у *S. pombe*, оскільки мутанти, які потребували хоча б одного з трьох компонентів, виявляли значно підвищену чутливість до іонів кадмію, порівняно з диким типом [4, 10, 19].

У наших попередніх дослідженнях було показано, що мутанти *Agsh2 Hansenula polymorpha* з пошкодженням першого етапу біосинтезу глутатіону характеризувалися підвищенням акумуляції іонів кадмію, в той час як мутанти *Agsh1/met1* і *Aggt1 H. polymorpha* з пошкодженням асиміляції сульфату і деградації глутатіону відповідно, втрачали здатність до внутрішньоклітинної акумуляції іонів кадмію [8].

Метою даної роботи було дослідити участь центрального регуляторного гена метаболізму сірки *MET4* у внутрішньоклітинній акумуляції іонів кадмію у дріжджів *H. polymorpha* та *S. cerevisiae* та у забезпеченні толерантності до іонів кадмію у дріжджів *H. polymorpha*.

#### Матеріали та методи

Штами дріжджів *H. polymorpha* та *S. cerevisiae*, використані у даній роботі, представлені у табл. 1 і походять з колекції проф. Н. А. Kang (Корейський Дослідний Інститут Біологічних наук і Біотехнології, м. Даеджон, Корея). Клітини дріжджів вирощували за температури 28°C у багатому середовищі YPD (1% дріжджовий екстракт, 2% пептон, 2% глюкоза) та мінеральному середовищі YNB (0,67% дріжджова азотиста основа, 0,5%  $(NH_4)_2SO_4$  і 1-2% глюкоза). Згідно з ауксотрофними потребами штамів, до 1 л ростового середовища було додано 79 мг урацилу, 150 мг гістидину та 80 мг триптофану. Агаризовані середовища містили 2% агар. Вміст іонів кадмію визначали на полуміневному атомному абсорбційному спектрофотометрі (Perkin-Elmer 1100B) при 228 нм, як попередньо описано в роботі [8]. Акумуляцію іонів кадмію вираховували як різницю сорбції іонів кадмію клітинами, інкубованими з глюкозою (клітини забезпечені енергією) і без джерела вуглецю (клітини не забезпечені енергією), на мг сухої ваги.

Таблиця 1

Штами дріжджів *H. polymorpha* (*Hp*) та *S. cerevisiae* (*Sc*), використані у цій роботі

Позначення	Генотип
Штами дикого типу ( <i>WT</i> )	
<i>HpWT</i>	DL-1 <i>Aura3, leu2::HpLEU2</i> (pGLG61)
<i>ScWT</i>	L3262-Y <i>MATa, ura3-52, 112 his4-34, leu2::ScLEU2</i> (YEр351)
Мутантні штами	
<i>HpΔmet4</i>	DL-1 <i>Aura3, leu2, Δmet4::LEU2</i>
<i>ScΔmet4</i>	L3262-4 <i>MATa, ura3-52, leu2-3, 112 his4-34, Δmet4::ScLEU2</i>
Мультикопійні трансформанти	
<i>HpmcMET4</i>	DL-1 <i>Aura3, leu2::mcMET4::HpLEU2</i> (pGLG61- <i>HpMET4</i> )
<i>HpmcGSH2</i>	DL-1 <i>Aura3, Atrp1::URA3, leu2::mcGSH2<sub>CBS</sub>::HpLEU2</i> (pGLG61- <i>HpGSH2</i> )

### Результати і їхнє обговорення

Попередньо нами було показано, що акумуляція іонів кадмію у дріжджів *H. polymorpha* залежить від метаболізму внутрішньо- та зовнішньоклітинних джерел енергії, в тому числі глюкози [8]. Вміст іонів кадмію у дріжджів *H. polymorpha* визначали в клітинах, інкубованих у середовищі без або з глюкозою. Відомо, що у *S. cerevisiae* поглинання іонів кадмію в клітину регулюється наявністю комплексу Cd-GSH в цитоплазмі, який запобігає наакумуляції металу [13]. Очевидно, подібна регуляція акумуляції іонів кадмію Cd-GSH комплексом спостерігається й у дріжджів *H. polymorpha*, оскільки GSH-дефіцитні мутанти *Agsh2* з пошкодженням першого ферменту біосинтезу глутатіону  $\gamma$ GCS характеризувалися наакумуляцією іонів кадмію в клітини [8]. У цій роботі показано, що трансформант *mcGSH2 H. polymorpha*, що містив додаткові копії гена *GSH2*, який кодує  $\gamma$ GCS, демонстрував сильно знижену акумуляцію іонів кадмію, порівняно зі штамом дикого типу (табл. 2). Наявність додаткових копій гена *GSH2* у даного трансформанта зумовлює суттєве підвищення рівнів внутрішньоклітинного глутатіону, порівняно зі штамом дикого типу [20]. Відтак сильне зниження акумуляції іонів кадмію у мультикопійного трансформанта *mcGSH2* може бути наслідком зростання концентрації Cd-GSH комплексу в клітині.

Таблиця 2

Акумуляція іонів кадмію штамми дикого типу та рекомбінантними штамми дріжджів *H. polymorpha* і *S. cerevisiae* залежно від присутності глюкози

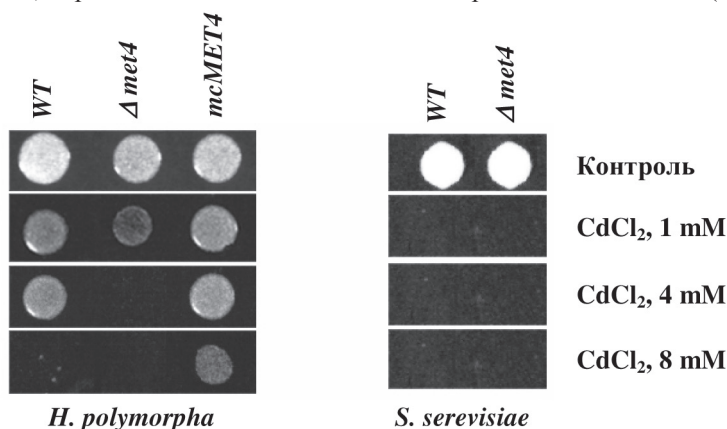
Штами	Cd <sup>2+</sup> , мкг мг сухої ваги <sup>-1</sup>		
	Cd <sub>glc</sub>	Cd <sub>w/o glc</sub>	Cd <sub>glc</sub> - Cd <sub>w/o glc</sub>
<i>HpWT</i>	0,32	0,15	<b>0,17</b>
<i>HpΔmet4</i>	0,22	0,13	<b>0,09</b>
<i>HpmcMET4</i>	0,39	0,27	<b>0,12</b>
<i>HpmcGSH2</i>	0,26	0,42	<b>-0,16</b>
<i>ScWT</i>	0,56	0,2	<b>0,36</b>
<i>ScΔmet4</i>	0,29	0,31	<b>-0,02</b>

**Примітки.** Cd<sub>glc</sub> – акумуляція іонів кадмію в середовищі з глюкозою (2%); Cd<sub>w/o glc</sub> – без глюкози.

Дослідження акумуляції кадмію у дріжджів *H. polymorpha* та *S. cerevisiae* із делецією транскрипційного регулятора шляху асиміляції сірки, білка Met4, показало, що обидва мутанти характеризувалися зниженням глюкозозалежної адсорбції іонів кадмію, порівняно з відповідними штамми дикого типу (див. табл. 2). Дані результати добре узгоджуються з попередньо отриманими даними для мутанта *Agsh1/met1 H. polymorpha* з пошкодженням шляху асиміляції сульфату, який також проявляв знижену акумуляцію іонів кадмію [8]. Оскільки у дріжджів *S. pombe* і *C. glabrata* комплекс Cd-GSH може включати S<sup>2-</sup> іони, утворюючи CdS-GSH нанокристали, що посилює детоксикаційний ефект [5, 11], висловлено припущення, що ген *MET4*, подібно до гена *GSH1/MET1*, залучений у дозріванні клітинного Cd-GSH комплексу і в цей спосіб також регулює поглинання іонів кадмію. Водночас, надекспресія гена *MET4 H. polymorpha* призводила лише до часткового відновлення акумуляції іонів кадмію трансформантом *mcMET4* (табл. 2), що можна пояснити підвищеним внутрішньоклітинним рівнем глутатіону у даного трансформанта [20] і відповідно зростанням концентрації Cd-GSH комплексу в клітині.

Також було досліджено толерантність рекомбінантних штамів дріжджів *H. polymorpha* з делецією та надекспресією гена *MET4* до іонів кадмію. Показано, що мутант *Δmet4 H. polymorpha*, подібно до мутанта *Δmet4 S. cerevisiae* [6], більш чутливий до іонів кадмію, порівняно зі штамом дикого типу (рис. 1). Поряд із цим штам *H. polymorpha*, що

містив додаткові копії гена *MET4*, проявляв підвищену резистентність до іонів кадмію, порівняно з відповідним мутантом  $\Delta met4$  і штамом дикого типу (див. рис. 1). Ці дані свідчать про чітку залежність між механізмами резистентності до іонів кадмію та функціональною активністю гена *MET4* дріжджів *H. polymorpha*. Також варто зазначити, що як штам дикого типу, так і мутант  $\Delta met4$  дріжджів *H. polymorpha* проявляли значно вищу толерантність до іонів кадмію, порівняно з відповідними штамми дріжджів *S. cerevisiae* (див. рисунок).



Чутливість штамів *H. polymorpha* та *S. cerevisiae* дикого типу (*WT*) й мутантів  $\Delta met4$  і мультикопійного трансформанта *mcMET4* до різних концентрацій іонів кадмію (0–8 mM) у середовищі YNB за наявності 0,1 mM метіоніну і 0,1 mM глутатіону. Клітини дріжджів були вирощені у YPD середовищі протягом ночі, відмиті водою та доведені до OD<sub>590</sub> 0,3 перед нанесенням 4 мкл суспензії клітин на чашки. Ріст оцінювали на четвертий день інкубації за температури 28°C.

Таким чином, у результаті проведених досліджень показано, що ген *MET4* залучений у підтриманні резистентності до іонів кадмію у дріжджів *H. polymorpha*. З'ясовано, що мультикопійні трансформанти дріжджів *H. polymorpha* з надекспресією генів *GSH2* та *MET4*, а також мутанти  $\Delta met4$  дріжджів *H. polymorpha* та *S. cerevisiae* характеризувалися зниженою акумуляцією іонів кадмію порівняно з відповідними штамми дикого типу. Висловлено припущення, що ген *MET4* залучений у дозріванні клітинного Cd-GSH комплексу.

Автор висловлює подяку Dr. M. Zimmermann за технічну підтримку та за надану можливість проводити дослідження на базі Інституту біології IV- Мікробіологія і генетика - університету RWTH Аахен, а також проф. H.A. Kang і к.б.н. В.М. Убийвовк за надані штами дріжджів. Дана робота була виконана за підтримки NATO Collaborative Linkage Grant LST.CLG 979872.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Adamis P. D. B., Gomes D. S., Pinto M. L. C. C. et al. Role of glutathione transferases in cadmium stress // *Toxicol. Lett.* 2004. Vol. 154. P. 81–88.
2. Adamis P. D. B., Panek A. D., Eleutherio E. C. A. Vacuolar compartmentation of the cadmium-glutathione complex protects *Saccharomyces cerevisiae* from mutagenesis // *Toxicol. Lett.* 2007. Vol. 173. P. 1–7.
3. Adamis P. D., Mannarino S. C., Riger C. J. et al. Lap4, a vacuolar aminopeptidase I, is involved in cadmium-glutathione metabolism // *Biometals.* 2009. Vol. 22. N 2. P. 243–249.
4. Al-Lahham A., Rohde V., Heim P. et al. Biosynthesis of phytochelatin in the fission yeast. Phytochelatin synthesis: A second role for the glutathione synthetase gene of *Schizosaccharomyces pombe* // *Yeast.* 1999. Vol. 15. P. 385–396.



5. Bae W., Chen X. Proteomic Study for the Cellular Responses to Cd<sup>2+</sup> in *Schizosaccharomyces pombe* Through Amino Acid-coded Mass Tagging and Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry // Mol. Cell. Proteomics. 2004. Vol. 3. P. 596–607.
6. Barbey R., Baudouin-Cornu P., Lee T. A. et al. Inducible dissociation of SCF<sup>Met30</sup> ubiquitin ligase mediates a rapid transcriptional response to cadmium // EMBO J. 2005. Vol. 24. P. 521–532.
7. Baudouin-Cornu P., Lagniel G., Kumar C. et al. Glutathione Degradation Is a Key Determinant of Glutathione // J. Biol. Chem. 2012. Vol. 287. N 7. P. 4552–4561.
8. Blazhenko O. V., Zimmermann M., Kang H. A. et al. Accumulation of cadmium ions in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* // Biometals. 2006. Vol. 19. N 6. P. 593–599.
9. Clemens S. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants // Biochimie. 2006. Vol. 88. P. 1707–1719.
10. Coblenz A., Wolf K. The role of glutathione biosynthesis in heavy metal resistance in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* // FEMS Microbiol. Rev. 1994. Vol. 14. P. 303–308.
11. Dameron C. T., Reese R. N., Mehra R. K. et al. Biosynthesis of cadmium sulphide quantum semiconductor crystallites // Nature. 1989. Vol. 338. P. 596–597.
12. Diffels J. F., Seret M.-L., Goffeau A. et al. Heavy metal transporters in Hemiascomycete yeasts // Biochimie. 2006. Vol. 88. P. 1639–1649.
13. Gomes D. S., Fragoso L. C., Riger C. J. et al. Regulation of cadmium uptake by *Saccharomyces cerevisiae* // Biochim. Biophys. Acta. 2002. V. 1573. P. 21–25.
14. Harrison C., Katayama S., Dhut S. et al. SCF(Pof1)-ubiquitin and its target Zip1 transcription factor mediate cadmium response in fission yeast // EMBO J. 2005. Vol. 24. P. 599–610.
15. Jarup L. Hazards of heavy metal contamination // Br. Med. Bull. 2003. Vol. 68. P. 167–182.
16. Klein M., Mamnun Y. M., Eggmann T. et al. The ATP-binding cassette (ABC) transporter Bpt1p mediates vacuolar sequestration of glutathione conjugates in yeast // FEBS Letters. 2002. Vol. 520. P. 63–67.
17. Li Z. S., Lu Y. P., Zhen R. G. et al. A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1 -catalyzed transport of bis(glutathionato)cadmium // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997. Vol. 90. P. 42–47.
18. Satarug S., Moore M. R. Adverse health effects of chronic exposure to low-level cadmium in foodstuffs and cigarette smoke // Environ. Health Perspect. 2004. Vol. 112. P. 1099–1103.
19. Speiser D. M., Ortiz D. F., Kreppel L. et al. Purine biosynthetic genes are required for cadmium tolerance in *Schizosaccharomyces pombe* // Mol. Cell. Biol. 1992. Vol. 12. P. 5301–5310.
20. Ubiyvovk V. M., Ananin V. M., Malyshev A. Y. et al. Optimization of glutathione production in batch and fed-batch cultures by the wild-type and recombinant strains of the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* DL-1 // BMC Biotechnol. 2011. Vol. 11 N 8. doi: 10.1186/1472-6750-11-8.
21. Valko M., Morris H., Cronin M. T. Metals, toxicity and oxidative stress // Curr Med Chem. 2005. Vol. 12. N 10. P. 1161–1208.
22. Vido K., Spector D., Lagniel G. et al. A proteome analysis of the cadmium response in *Saccharomyces cerevisiae* // J. Biol. Chem. 2001. Vol. 276. P. 8469–8474.
23. Wemmie J. A., Szczycka M. S., Thiele D. J., Moye-Rowley W. S. Cadmium tolerance mediated by the yeast AP-1 protein requires the presence of an ATP-binding cassette transporter-encoding gene, YCF1 // J. Biol. Chem. 1994. Vol. 269. N 51. P. 32592–32597.
24. Yen J. L., Su N.-Y., Kaiser P. The Yeast Ubiquitin Ligase SCF<sup>Met30</sup> Regulates Heavy Metal Response // Mol. Biol. Cell. 2005. Vol. 16. P. 1872–1882.

**DELETION OF *MET4* GENE DECREASES TOLERANCE TO CADMIUM IONS  
AND THEIR ACCUMULATION IN YEAST CELLS OF *HANSENULA POLYMORPHA*  
AND *SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

**O. Blazhenko**

*Institute of Biology IV – Microbiology and Genetics RWTH Aachen  
1, Worringerweg, Aachen D-52056, Germany  
e-mail: Oleksandra.Blazhenko@googlemail.com*

The participation of the central regulatory gene of sulfur metabolism, *MET4*, in intracellular cadmium ion accumulation and in maintenance of cadmium ion tolerance was examined. It was shown that deletion of *Hansenula polymorpha MET4* gene increased sensitivity of  $\Delta met4$  mutant to cadmium ions, while overexpression of this gene in *mcMET4* transformant increased its resistance to cadmium. Cadmium ion accumulation study revealed that *H. polymorpha mcGSH2* transformant, with overexpressed gene of the first step of glutathione biosynthesis, and both  $\Delta met4$  mutants of yeasts *H. polymorpha* and *Saccharomyces cerevisiae* exhibited decreased glucose-dependent absorption of cadmium ions, compared to the correspondent wild type strains. It was hypothesized that *MET4* gene is involved in maturation of cellular Cd-GSH complex, which in turn regulates cadmium ion uptake.

*Keywords: MET4, cadmium, Hansenula polymorpha, Saccharomyces cerevisiae.*

**ДЕЛЕЦИЯ ГЕНА *MET4* СНИЖАЕТ ТОЛЕРАНТНОСТЬ К ИОНАМ КАДМИЯ  
И ИХ АККУМУЛЯЦИЮ В КЛЕТКАХ ДРОЖЖЕЙ *HANSENULA POLYMORPHA*  
И *SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

**А. Блаженко**

*Институт биологии IV – Микробиология и генетика – RWTH Аахен  
Воррингервег, 1, Аахен D-52056, Германия  
e-mail: Oleksandra.Blazhenko@googlemail.com*

Исследовано участие центрального регуляторного гена метаболизма серы *MET4* во внутриклеточной аккумуляции ионов кадмия и в обеспечении толерантности к ионам кадмия. Показано, что делеция гена *MET4 Hansenula polymorpha* повышает чувствительность мутанта  $\Delta met4$  к ионам кадмия, тогда как сверхэкспрессия этого гена у трансформанта *mcMET4* повышает его резистентность к кадмию. Исследование аккумуляции ионов кадмия обнаружило, что трансформант *mcGSH2 H. polymorpha*, со сверхэкспрессией гена первого этапа биосинтеза глутатиона, и оба мутанта  $\Delta met4$  дрожжей *H. polymorpha* и *Saccharomyces cerevisiae* проявляли пониженную глюкозозависимую адсорбцию ионов кадмия, по сравнению с соответствующими штаммами дикого типа. Высказано предположение, что ген *MET4* вовлечен в созревание клеточного Cd-GSH комплекса, который, в свою очередь, регулирует поглощение ионов кадмия.

*Ключевые слова: MET4, кадмий, Hansenula polymorpha, Saccharomyces cerevisiae.*

## ПРОГНОСТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ АНЕУПЛОЇДІЇ ТА ПОЛІПЛОЇДІЇ У КОЛОРЕКТАЛЬНОМУ КАНЦЕРОГЕНЕЗИ

М. Лозинська<sup>1</sup>, Р. Лозинський<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ДУ «Інститут спадкової патології НАМН України»  
вул. М. Лисенка, 31-а, Львів 79000, Україна  
e-mail: maria\_lozynska@ukr.net

<sup>2</sup>ДУ «Інститут патології крові та трансфузійної медицини НАМН України»  
вул. Генерала Чупринки, 45, Львів 79044, Україна

Проведено вивчення каріотипу зразків новоутворень товстої кишки, отриманих від 58 пацієнтів, мешканців західних областей України. Найбільш типовою хромосомною аномалією у гіперпластичних поліпах, а також у аденомах була анеуплоїдія 13, 7, 20 хромосом. Перетворення тубулярних у тубулярно-ворсинчасті й ворсинчасті аденоми супроводжувалося збільшенням кількості хромосомних аномалій і розширенням їх спектра. Більшість аденокарцином мали полісомний каріотип із наближеними до триплоїдного, тетраплоїдного чи з більшою кількістю хромосомних наборів. Поява додаткових копій 20, 7, 2 і 5 хромосом, а також алейні втрати 18, 17, 6, 14 хромосом, моносомія і структурні перебудови 1-ї хромосоми та делеції різних за розміром ділянок хромосом мали важливе значення у пухлинній прогресії.

*Ключові слова:* гіперпластичні поліпи, аденоматозні поліпи, анеуплоїдія, поліплоїдія, колоректальний рак.

Дослідження механізмів канцерогенезу товстої кишки є важливою проблемою сьогодення у зв'язку з невинним ростом захворюваності на колоректальний рак (КРР), який визнано для осіб обох статей одним із найбільш частих злоякісних новоутворень (ЗН). Україна за захворюваністю на цю патологію посідає 10 місце у світі [1, 4]. Протягом другої половини ХХ та початку ХХІ століття між двома напрямками дослідження раку йдуть дебати про механізми канцерогенезу. Прихильники першого вважають, що канцерспецифічний фенотип є результатом багатоступневих мутацій, які зумовлюються домінуючими онкогенами чи інактивуються рецесивними генами-супресорами пухлин (генна теорія раку); прихильники другого – підтримують ідею, що канцер-специфічний фенотип є результатом впливу тисячі нормальних генів, доза яких змінена в результаті пересортування відповідних хромосом чи анеуплоїдії (хромосомна теорія раку) [7, 8, 12, 14]. Канцерогенез є рідкісним процесом, при якому нормальні клітини перетворюються в ракові шляхом багатоступневих процесів і стадій клітинної еволюції, що відповідає різним передраковим фенотипам і генотипам. На основі різних генетичних, у тому числі цитогенетичних маркерів, більшість вважають можливим виникнення раку з однієї клітини (клональне походження), інші дотримуються гіпотези поліклонального походження раку. Однак рідко дві ракові клітини бувають однаковими. Предметом обговорення залишаються механізми генетичної нестабільності, а саме вивчення анеуплоїдії і поліплоїдії [16]. Одним із ключових пояснень канцерспецифічного фенотипу є порушення функціонування кількох тисяч нормальних генів у результаті анеуплоїдії чи пересортування відповідних хромосом, що призводить до зміненої дози цих генів [6]. І хоча молекулярно-генетичні методи дещо витіснили з практики застосування цитогенетичний аналіз солідних пухлин, однак його інформативність, особливо при дослідженні клітин *in vivo*, і порівняна доступність не викликає сумнівів. На

сьогодні літературні дані стосовно прогностичного значення різних хромосомних перебудов та їх комбінації у розвитку раку є досить суперечливими і неоднозначними [11, 18, 19], хоча вважається, що ініціюючим генотипом ракових клітин є анеуплоїдія – порушення балансу хромосом, що сприяє процесові малігнізації [9, 10, 11, 13, 14, 17]. Тому пошук інформативних цитогенетичних маркерів безпосередньо в новоутвореннях має наукове значення для розуміння механізмів канцерогенезу та практичну цінність для ранньої діагностики КРР. Метою роботи було оцінити прогностичне значення анеуплоїдії та поліплоїдії на різних етапах переродження епітелію товстої кишки.

#### Матеріали та методи

Проведено вивчення каріотипу зразків новоутворень у 35 пацієнтів із різними за морфологічною будовою поліпами та 23 пацієнтів із аденокарциномою товстої кишки, що мали клінічно, ендоскопічно й гістологічно підтверджений діагноз. Пацієнти були мешканцями Львівської, Тернопільської, Закарпатської та Івано-Франківської областей України. Серед обстеженої групи осіб у 9 пацієнтів були виявлені гіперпластичні поліпи (ГПП), а у 26 – аденоматозні. Отримані зразки аденокарцином були взяті з різних відділів товстої кишки. За локалізацією у 15 (65,2%) пацієнтів пухлини містились у прямій кишці, у решті 8 (34,8%) – в ободовій кишці. За ступенем диференціювання 9 пухлин були високо диференційованими, 12 – помірно диференційованими та 2 – низько диференційованими. Препарати метафазних хромосом із поліпів отримували за стандартним методом [15] із власною модифікацією етапів фіксації клітин. Використовували розчин колхіцину в кінцевій концентрації 0,5 мкг/мл. Проводили гіпотонізацію клітин у суміші розчину хлористого калію (0,075М). Клітини фіксували в охолодженому розчині етилового спирту і льодяної оцтової кислоти й мацерували у розчині оцтової кислоти. Препарати із зразків аденокарцином виконували за авторським методом без синхронізації клітин метотрексатом і тривалого культивування, що може спотворювати об'єктивність результату, викликаючи селекцію клітин певного типу [3]. Зразок біоптату з пухлини переносили в чашку Петрі з культуральним середовищем RPMI і ембріональної телячої сироватки, додавали 10 мкг/мл розчину колхіцину та 100 мкг/мл розчину бромистого етидію. Гіпотонізацію проводили розчином суміші хлористого калію (0,075М) і 1%-ного цитрату натрію (1:1). Фіксували клітини у суміші етилового спирту і льодяної оцтової кислоти у співвідношенні 3:1 та проводили мацерацію клітин. Цитогенетичний аналіз виконували з використанням мікроскопа «Aristoplan» при збільшенні (10x100). Препарати аналізували диференційно по 7–15 метафазних пластинок зі зразка за допомогою G-методу з використанням барвника Романовського-Гімзи, розчиненого у фосфатному буфері.

#### Результати і їхнє обговорення

Цитогенетичне дослідження новоутворень товстої кишки становить значні труднощі у зв'язку з низьким рівнем проліферації клітин. Однак, незважаючи на це, агресивність цих пухлин і рівень метастазування є дуже високим. Це зумовлено анеуплоїдією, яка призводить до збільшення кількості копій багатьох сотень генів, і поліплоїдією [13, 14]. Особливий інтерес становить дослідження «пограничних» утворень із високим потенціалом неопластичних змін. До цієї групи відносять великі ГПП й аденоматозні поліпи змішаної будови з поєднанням гіперпластичного і аденоматозного компонентів. Вони вважаються неоплазіями проміжного типу, що виникають із зубчастої аденоми [2, 13]. У ГПП великого розміру та змішаного типу найчастіше траплялися додаткові копії 20, 7 і 13 хромосом, а також додаткові копії 14, 16, 17 та 19 хромосом. Такі ГПП мають бути повністю видалені. На рис. 1 наведено каріотип зразка ГПП з аденоматозним компонентом

із анеуплоїдією, зумовленою додатковими копіями 7, 19, 20 хромосом і структурною перебудовою 1 хромосоми (рис. 1).

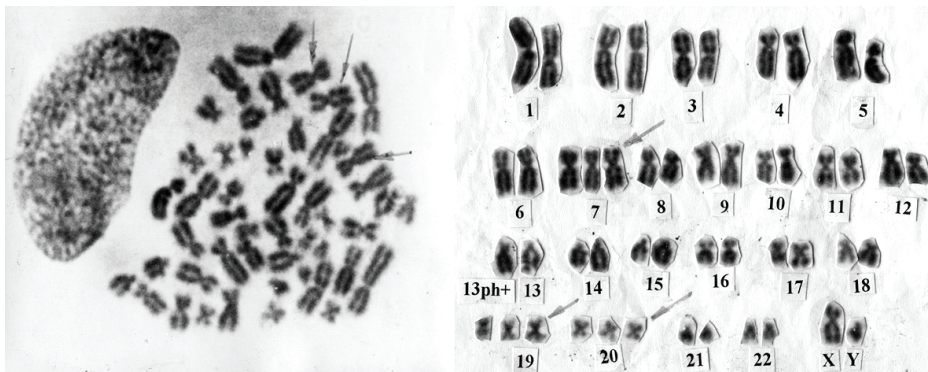


Рис. 1. Каріотип: 49, XY,del 1(q42.3-qter),+7,+19,+20 (зразок №3). Клон клітин №1. Стрілками вказано додаткові копії хромосом. Гіперпластичний поліп із аденоматозним компонентом. Локалізація поліпа: сигмоподібна кишка, Ø верхівки поліпа 4,0 см.

У малих ГПП в дистальних відділах товстої кишки неопластичне прогресування траплялося дуже рідко і каріотип був нормальним.

Широкий спектр аномалій у ГПП великого розміру з присутністю аденоматозного компонента свідчить про непластичний потенціал цих утворень. Найчастішими за морфологічною будовою доброякісними пухлинами товстої кишки виявилися аденоми. Найбільш типові хромосомні аномалії в аденомах були пов'язані з анеуплоїдією – трисомією 13, 7, 20 хромосом. У 10 (38,5%) пацієнтів із аденомами були підтверджені порушення, пов'язані з анеуплоїдіями хромосом. Результати виявлення найчастіших додаткових копій хромосом у різних за морфологічною будовою поліпах наведено в табл. 1.

Таблиця 1

Анеуплоїдії хромосом у різних за морфологічною будовою поліпах товстої кишки

Морфологічна будова поліпів	Додаткові копії хромосом у зразках поліпів
Гіперпластичні поліпи («змішані» та >1 см) (ГПП)	+20(4), +7(2), +13(2), +14(1), +16(1), +17(1), +19(1)
Тубулярні аденоми (ТА)	+7(2), +13(2), +3(1)
Тубулярно-ворсинчасті аденоми (ТВА)	+13(3), +20(3), +7(1), +14(1), +15(1), +18(1)
Ворсинчасті аденоми (ВА)	+7(4), +13(3), +20(2), +16(1)
Разом	+13(10), +7(9), +20(9), +14(2), +16(2), +3(1), +15(1), +17(1), +18(1), +19(1)

**Примітка.** ( ) – кількість випадків із додатковими копіями хромосом.

Перетворення тубулярних у тубулярно-ворсинчасті й ворсинчасті аденоми супроводжувалося збільшенням кількості хромосомних аномалій і розширенням їх спектра. В одному зразку тубулярно-ворсинчастої аденоми та у двох зразках ворсинчастих аденом виявляли клони клітин із порушеною плоїдністю (3n, 4n, 5n) у поєднанні з нормальним каріотипом. Загальна кількість хромосомних аномалій у аденоматозних поліпах становила 13 (50,0%). Загальна кількість цитогенетичних аномалій, пов'язаних зі зміною кількості окремих хромосом (анеуплоїдією) та зі зміною плоїдності, становила у ГПП і тубулярних аденомах – 3 (33,3%), у тубулярно-ворсинчастих – 4 (44,4%), а у ворсинчастих – 6 (75,0%).



При поєднанні аденоми і аденокарциноми товстої кишки спостерігали аномальні клони клітин, що містили додаткові копії 13, 18 і 20 хромосом. У біоптатах аденокарцином аномалії хромосом було виявлено у 100% випадків. Колоректальні неопластичні новоутворення є наслідком комбінації різних типів пошкодження геному. На препаратах досліджених зразків аденокарцином ми спостерігали три різні типи порушення плоїдності: моносомний, змішаний та полісомний. Більшість аденокарцином мали полісомний каріотип із наближеними до триплоїдного, тетраплоїдного чи з більшою кількістю хромосомних наборів. У каріотипі аденокарцином виявляли також анеуплоїдні набори хромосом, представлені додатковими копіями 20, 7, 2, 5, 3, 16, 19, 20, 21, 22 хромосом у різних комбінаціях. Існує гіпотеза, що додаткові копії хромосом чи втрати хромосом пов'язані зі зміною експресії генів, і ця експресія залежить від розміщення перебудованих ділянок у копіях хромосом. Зміни в рівні експресії генів у пухлинах пов'язані з вмістом ДНК. Згідно з літературними даними, при КРР найчастіше ампліфікується хромосома 20 (зокрема, ділянка 20q13.2) [5, 20]. Невідомо точно, чи ампліфікація різних ділянок відбувається незалежно, чи синхронізовано. У пацієнта з помірно диференційованою аденокарциномою прямої кишки з ділянками низької диференціації з ділянками розпаду в одному і тому ж зразку аденокарциноми виявили додаткові копії 20-ї хромосоми від однієї до 10. Збільшення клональної різноманітності, селективне нагромадження копій певних хромосом поряд із моносомією інших, структурні перебудови ділянок хромосом, зумовлені різними за розміром делеціями, переважно великими, а також малими, які неможливо було ідентифікувати за допомогою традиційного G-методу диференційного забарвлення, були типовими для аденокарцином. Важливе значення в пухлинній прогресії мали алейні втрати 18, 17, 1, 3, 8, 14 хромосом, поява додаткових копій 20, 7, 2, 5, 3 і 16 хромосом і делеції певних ділянок хромосом. Моносомії та часткові моносомії 17, 18, 1, 3 хромосом призводили до пухлинної прогресії у зв'язку із присутністю в 18q і 17p хромосомах рецесивних генів супресорів пухлин, що мають важливе значення у виникненні КРР. У зразку пухлини пацієнтки з низькодиференційованою аденокарциномою товстої кишки переважав моносомний каріотип (модальна кількість від 41 до 44 хромосом) з втратою 6, 11, 14, 18, X-хромосоми, зі структурною перебудовою 1-ї хромосоми, маркерною делецією, а також анеуплоїдією – трисомією 3-ї хромосоми (рис. 2).

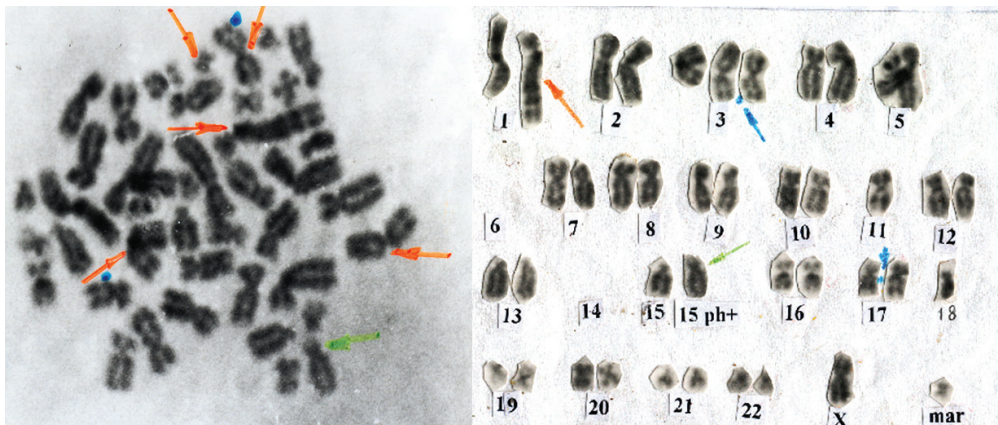


Рис. 2. Мікрофото. Каріотип: 41,X,rea(1),-6,-6,-14,-14,-18,+3,+mar,15ph+. Стрілками позначено ділянки хромосомних перебудов, хроматидних розривів і варіант 15qh+. Низькодиференційована аденокарцинома. Локалізація: низхідний відділ ободової кишки.



Згідно з літературними даними, експресія онкогенів (*N-RAS*, *SKI*), що містяться в хромосомі 1, також призводять до малігнізації клітин і прогресування КРР. Висока ймовірність мутацій 27 генів, розміщених у 3 хромосомі, підтверджує значення цієї хромосоми в колоректальному канцерогенезі [20].

Співвідношення анеуплоїдних і поліплоїдних наборів хромосом у новоутвореннях товстої кишки наведено на рис. 3.

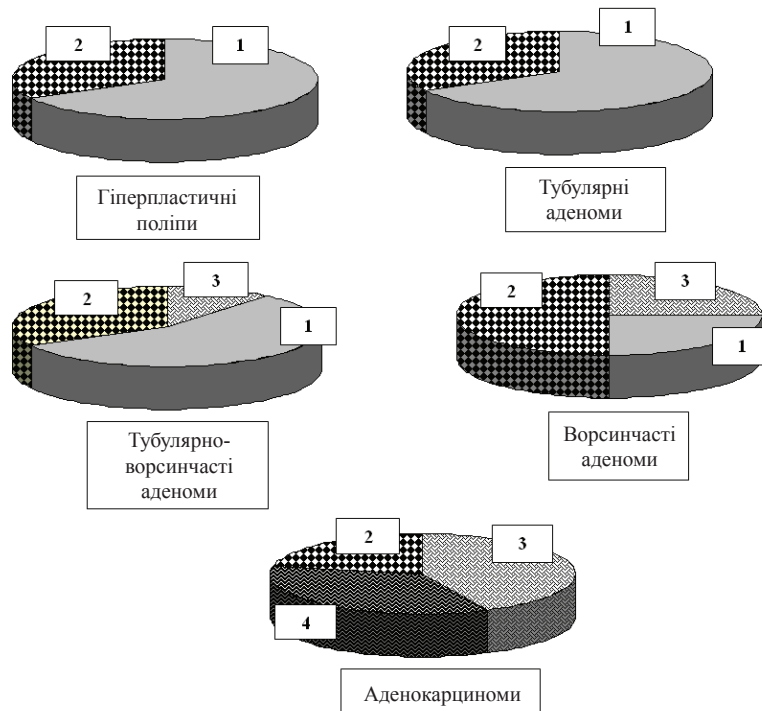


Рис. 3. Співвідношення анеуплоїдних і поліплоїдних наборів хромосом у новоутвореннях товстої кишки: 1 – кількість метафазних пластинок із диплоїдним набором хромосом; 2 – кількість метафазних пластинок із анеуплоїдним набором хромосом; 3 – кількість метафазних пластинок із поліплоїдним набором хромосом; 4 – кількість метафазних пластинок зі «змішаними» анеуплоїдними і поліплоїдними наборами хромосом.

Етапи перетворення аденоматозних поліпів на хромосомному рівні супроводжувалися збільшенням співвідношення анеуплоїдних клонів клітин щодо диплоїдних, з нормальним каріотипом, появою поліплоїдних наборів хромосом, наближених до  $3n$ ,  $4n$ ,  $5n$ .

Широкий спектр хромосомних аномалій, найчастіше анеуплоїдій 13, 7, 20 хромосом, у гіперпластичних поліпах великого розміру ( $> 1$  см) і «змішаних» поліпах із аденоматозним компонентом, свідчить про непластичний потенціал цих утворень.

Найбільш типові хромосомні аномалії в аденомах товстої кишки були пов'язані з анеуплоїдією – трисомією 13, 7, 20 хромосом. Етапи перетворення аденоматозних поліпів на хромосомному рівні супроводжувалися збільшенням співвідношення анеуплоїдних клонів клітин щодо диплоїдних, з нормальним каріотипом, появою поліплоїдних наборів хромосом, наближених до  $3n$ ,  $4n$ ,  $5n$ .

У зразках аденокарцином товстої кишки виявляли анеуплоїдні набори хромосом з додатковими хромосомами, найчастіше 20, 7, 2, 5, 19 та 16, та гіпоплоїдні (моносомні) набори з найчастішою втратою 18, 17, 6, 14 і 1 хромосом.

Клональна різноманітність із переважанням поліплоїдних наборів хромосом, наближених до 3n, 4n і 5n, була найбільш характерною цитогенетичною ознакою аденокарцином товстої кишки.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Гриневиц Ю. А., Юрїнова Л. Г.* Пухлинні маркери: вимоги до проведення аналізу, інтерпретація результатів їх визначення в онкологічній клініці // Лаб. діагн. № 1. 2004. С. 3–9.
2. *Никишаев В. И., Патий А. Р., Тумак И. Н., Коляда И. А.* Эндоскопическая диагностика раннего колоректального рака // Здоров'я України (Онкологія). 2012. Т. 20. № 1. С. 16–20.
3. Пат. на корисну модель 34834 Україна, МПК А61В 10/00 (2006). Спосіб приготування препаратів метафазних хромосом *in vivo* із аденокарцином товстої кишки для визначення спектра цитогенетичних змін при злоякісній трансформації епітелію в новоутвореннях товстої кишки / Лозинська М.Р.; заявник і патентовласник ДУ «Інститут спадкової патології АМН У». № u 2008 03282; заявл. 14.03.2008; опубл. 26.08.2008, Бюл. №16/2008.
4. *Спринсян Т.* «Опухоль и организм»: новые аспекты старой проблемы // Здоров'я України (Онкологія). 2010. Т. 5/6. С. 6–7.
5. *Albertson D. G., Collins C., McCornick F., Gray J. W.* Chromosome aberrations in solid tumors // Nat. Genet. 2003. Vol. 34. P. 369–376.
6. *Diep C. B., Kleivi K., Ribeiro F. R. et al.* The order of genetic events associated with colorectal cancer progression inferred from meta-analysis of copy number changes // Genes. Chromosomes. Cancers. 2006. Vol. 45. P. 31–41.
7. *Duesberg P., Li R.* Multistep carcinogenesis. A chain reaction of aneuploidizations // Cell Cycle. 2003. Vol. 2. N 3. P. 202–210.
8. *Duesberg P. H.* Are cancers dependent on oncogenes or an aneuploidy? // Cancer Genet. Cytogenet. 2003. Vol. 143. P. 89–9.
9. *Duesberg P., Li R.* Multistep carcinogenesis. A chain reaction of aneuploidizations // Cell Cycle. 2003. Vol. 2. N 3. P. 202–210.
10. *Duesberg P.* Chromosomal chaos and cancer // Scientific American. 2007. Vol. 296. N 5. P. 52–59.
11. *Duesberg P., Iokobuzio-Donahue C. A., Mandrioli D. et al.* Origin of metastases: subspecies of cancers generated by intrinsic karyotypic variations // Cell side. 2012. Vol. 11. N 6. P. 1151–1166.
12. *Fabarius A., Hehlmann R., Duesberg P.* Instability of chromosome structure in cancer cells increased exponentially with degrees of aneuploidy // Cancer Genet. Cytogenet. 2004. Vol. 2–3. N 143. P. 59–72.
13. *Holland A. J., Cleveland D. W.* Losing balance: the origin and impact of aneuploidy in cancer // EMBO Rep. 2012. Vol. 13. N 6. P. 501–514.
14. *Li R., Sonic A. S. R., Rasnick D., Duesberg P.* Aneuploidy vs gene mutation hypothesis of cancer: recent study claims mutation but is found to support aneuploidy // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. Vol. 97. P. 3236–3241.
15. *Longy M., Saura R., Schouler L. et al.* Chromosomal analysis of colonic adenomatous polyps // Cancer Genet. Cytogenet. 1990. Vol. 49. P. 249–257.
16. *McCormack A. A., Nikolson J. M. et al.* Cancer-causing karyotypes: chromosomal equilibria between destabilizing aneuploidy and stabilizing selection oncogenic function // Cancer Genet. Cytogenet. 2009. Vol. 188. N 1. P. 1–25.
17. *Nikolson J. M., Duesberg P.* On the karyotypic origin and evolution of cancer cells // Cancer Genet. Cytogenet. 2009. Vol. 194. N 2. P. 96–110.
18. *Noffsiger A. E.* Serrated polyps and colorectal cancer: new pathway to malignancy // Annu Rev. Pathol. 2009. N 4. P. 343–364.

19. Snover D. C., Ahnen D. J., Burt R. W. et al. Serrated polyps of the colon and rectum and serrated polyposis // WHO classification of tumors of the digestive tract. 2010. IARC; Lyon: 2010. P. 160–165.
20. Tsafir D., Bacolod M, Selvanayagam Z. et al. Relationship of gene expression and chromosomal abnormalities in colorectal cancer // Cancer Res. 2006. Vol. 66. N4. P. 2129–2136.

Стаття: надійшла до редакції 27.09.13

доопрацьована 09.12.13

прийнята до друку 12.12.13

## PROGNOSTIC VALUE OF ANEUPLOIDY AND POLYPLOIDY IN COLORECTAL CANCEROGENESIS

M. Lozynska<sup>1</sup>, R. Lozynsky<sup>2</sup>

<sup>1</sup>SI «Institute of Hereditary Pathology of NAMS of Ukraine»

31-a, M. Lysenko St., Lviv 79000, Ukraine

e-mail: maria\_lozynska@ukr.net

<sup>2</sup>SI «Institute of Blood Pathology and Transfusion Medicine of NAMS of Ukraine»

45, General Chuprynka St., Lviv 79044, Ukraine

It was carried out the cytogenetic examination of the colorectal polyps and adenocarcinoma samples from 58 patients with neoplasia, who lived in west regions of Ukraine. The most typical chromosomal abnormality in the samples of hyperplastic polyps and adenomas was aneuploidy of chromosomes 13, 7, and 20. The transformation of tubular adenomas in tubulovillous and in villous adenomas was accompanied with increasing number of chromosome abnormalities and widening of its spectrum. The majority of the adenocarcinoma samples showed polysomic karyotype, ranging from near-triploid and near-tetraploid to even higher number of chromosomal sets. The appearance of the additional copies of chromosomes 20, 7, 2, 5 and allelic losses of chromosomes 18, 17, 6, 14, 1, and the chromosome deletions of various sizes may be significant in colorectal tumorigenesis.

*Keywords:* hyperplastic polyps, adenomas, aneuploidy, polyploidy, colorectal cancer.

## ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ АНЕУПЛОИДИИ И ПОЛИПЛОИДИИ В КОЛОРЕКТАЛЬНОМ КАНЦЕРОГЕНЕЗЕ

М. Лозинская<sup>1</sup>, Р. Лозинский<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ГУ «Институт наследственной патологии НАМН Украины»

ул. М. Лысенко, 31-а, Львов 79000, Украина

<sup>2</sup>ГУ «Институт патологии крови и трансфузионной медицины НАМН

Украины» ул. Генерала Чупрынки, 45, Львов 79000, Украина

Проведено изучение кариотипа образцов новообразований толстой кишки, полученных от 58 пациентов, жителей западных областей Украины. Наиболее типичной хромосомной аномалией в гиперпластических полипах, а также в аденомах была анеуплоидия 13, 7, 20 хромосом. Превращение тубулярных в тубулярно-ворсинчатые и ворсинчатые аденомы сопровождалось увеличением количества хромосомных аномалий и расширением их спектра. Большинство аденокарцином имели полисомный кариотип с приближенными к триплоидным, тетраплоидным или большими по количеству хромосомными наборами. Появление добавочных копий 20, 7, 2 и 5 хромосом, а также аллельные потери 18, 17, 6, 14, 1 хромосом, делеции разных по размеру участков хромосом имели важное значение в опухолевой прогрессии.

*Ключевые слова:* гиперпластические полипы, аденоматозные полипы, анеуплоидия, полиплоидия, колоректальный рак.

## COMPARISON OF ACTIVITY OF THREE HETEROLOGOUS PROMOTERS IN *STREPTOMYCES GHANAENSIS* ATCC14672

H. Mutenko<sup>1</sup>, M. Lopatniuk<sup>1</sup>, L. Horbal<sup>1</sup>, A. Luzhetsky<sup>2</sup>, V. Fedorenko<sup>1</sup>, B. Ostash<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Ivan Franko National University of Lviv  
4, Hrushevskiyi St., Lviv 79005, Ukraine  
e-mail: bohdanostash@gmail.com

<sup>2</sup>Helmholtz Institute for Pharmaceutical Research Saarland  
Saarland University Campus  
Building C2.3, 66123 Saarbrücken, Germany

*Streptomyces ghanaensis* ATCC14672 produces moenomycin A, the only known natural product that directly inhibits peptidoglycan glycosyltransferases. It is desirable to develop reliable genetic tools for this strains which would allow to generate ATCC14672 derivatives producing novel moenomycins. Using  $\beta$ -glucuronidase reporter system, here we studied the activity in ATCC14672 of the three heterologous promoters extensively used in *Streptomyces* genetics – *gylP1/P2*, *aac(3)IVp* and *ermEp*. The promoter of glycerol utilization operon *gylP1/P2* displayed the highest transcriptional activity, while *aac(3)IVp* the weakest one. Activity of the latter was 2 and 3 times lower than that of *gylP1/P2* on the first and fourth day of growth, respectively. The activity of *ermEp* was somewhat higher than that of *aac(3)IVp*, but did not exceed the strength of *gylP1/P2*.

**Keywords:** *Streptomyces ghanaensis*, moenomycin A,  $\beta$ -glucuronidase, reporter system.

Among the producers of clinically important compounds the representatives of the genus *Streptomyces* take a prominent place [2]. One of them is *Streptomyces ghanaensis* ATCC14672, a producer of the phosphoglycolipid antibiotic moenomycin A (MmA), which inhibits the cell wall formation of gram-positive microorganisms. It stands out due to an extremely high activity, the uniqueness of action and absence of reported cases of resistance among pathogens [12, 13]. However, the wild-type strain synthesizes MmA in small quantities [1, 12, 13]. It is necessary to have suitable tools for genetic manipulation of the strain for its improvement. Efficient expression vectors are one of the most useful tools required for such purposes. To obtain such vectors, it is necessary to identify a set of the promoters that display high expression level in ATCC14672. However, relative strength of heterologous promoters in this strain has not been studied so far. Therefore, we decided to study the activity of several popular heterologous promoters in moenomycin producer using a recently described  $\beta$ -glucuronidase reporter system [11]. Based on RNAseq results, this reporter is thought to provide reliable readout of transcriptional activity of the promoters [14]. For experiments we picked up three promoters: *gylP1/P2* from glycerol utilization operon of *S. coelicolor*, *ermEp* derived from erythromycin resistance gene *ermE* of *Saccharopolyspora erythraea* (encodes rRNA methyltransferase) and *aac(3)IVp* from aminoglycoside acetyltransferase gene *aac(3)IV* of *Klebsiella pneumoniae*. The aim of our work was to compare the efficiency of aforementioned promoters in different growth timepoints.

### Material and methods

In this work we used the MmA producer *S. ghanaensis* ATCC14672 (wild type) and its recombinant strains *S. ghanaensis* (pMT3226GusA), *S. ghanaensis* (pSETamGusA), *S. ghanaensis* (pSETermGusA) and *S. ghanaensis* (pGUS). The strains were grown on solid oatmeal medium

and in liquid TSB [3, 8]. Reporter plasmids pMT3226GusA, pSETamGusA and pSETermGusA were constructed through cloning of *ermEp*, *gylP1/P2* and *aac(3)IVp* fragments into pGUS to create transcriptional fusion of the promoter to *gusA* gene. The details of plasmids construction are reported in [5]. The plasmids were transferred, via conjugation, from *E. coli* ET12567 (pUZ8002) to ATCC14672 according to [10]. *E. coli* ET12567 (pUZ8002) was grown on LA medium with kanamycin (Km) at concentration of 50 µg/ml. The media for growth of recombinant actinomycetes and *E. coli* strains were amended with apramycin (Am) and Km at concentration of 50 µg/ml [8]. The activity of the studied promoters was as follows. 25 ml of the seed medium were inoculated with 3 ml from a two days-old preculture of *S. ghanaensis* strains containing reporter plasmids. Cells were grown for 20 or 94 hours at 37°C. 5 ml of the culture were harvested by centrifugation (4,000 ×g for 10 min), resuspended in lysis buffer (50 mM phosphate buffer [pH 7.0], 5 mM dithiothreitol [DTT], 0.1% Triton X-100, 4 mg ml<sup>-1</sup> lysozyme). Lysis was performed at 37°C for 45 min (the completeness of the lysis by that time was confirmed microscopically). Lysates were centrifuged at 4,000 rpm for 10 min. Then, 0.5 ml of lysate was mixed with 0.5 ml of dilution buffer (50 mM phosphate buffer [pH 7.0], 5 mM DTT, 0.1% Triton X-100) supplemented with 5 µl 0.2 M *p*-nitrophenyl-D-glucuronide. The OD<sub>415nm</sub> was measured every minute for a total of 20 minutes of incubation at room temperature. As control, a 1:1 mixture of lysate and dilution buffer was used. All measurements were repeated three times. The glucuronidase activity is calculated in m-units per mg of total protein in the lysate (mU mg<sup>-1</sup>). Total protein was determined by Bradford Protein assay (BioRad, USA). One m-unit is referred to such amount of GusA that is able to produce in one minute 1 µM of *p*-nitrophenol from the substrate in a total volume of 1 mL.

### Results and discussion

The transconjugant colonies of *S. ghanaensis* ATCC14672 carrying the aforementioned reporter plasmids were selected for the resistance to apramycin. We checked the presence of the glucuronidase (GusA) activity of *S. ghanaensis* (pMT3226GusA), *S. ghanaensis* (pSETamGusA), *S. ghanaensis* (pSETermGusA) and *S. ghanaensis* (pGUS) with flooding of 5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronide (X-Gluc) solution on the lawns of the strains. The strains with pMT3226GusA, pSETermGusA and pSETamGusA became dark blue because of chemical transformation of X-Gluc to 5,5'-dibromo-4,4'-dichloro-indigo due to GusA activity, while the strain carrying control plasmid pGus (promoterless *gusA*) remained white (Fig. 1). These data confirmed that strains indeed carried functional *gusA* gene.

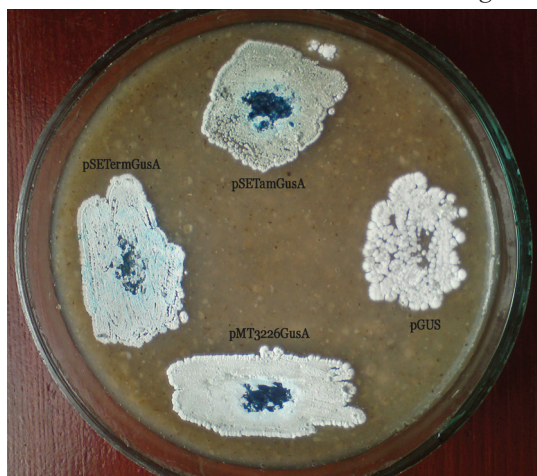


Fig. 1. The lawns of *S. ghanaensis* (pMT3226GusA), *S. ghanaensis* (pSETamGusA), *S. ghanaensis* (pSETermGusA) and *S. ghanaensis* (pGUS) onto which a drop of X-Gluc solution was applied.



To quantitatively describe the efficiency of the studied heterologous promoters, *S. ghanaensis* transconjugants were grown in TSB at 37°C for 20 and 96 hours. At these timepoints mycelium was washed, resuspended with reaction buffer, lysed and then chilled on ice. The glucuronidase activity was analyzed by adding the GusA substrate, X-Gluc (p-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucuronide) solution to the mycelium lysate and immediately measuring the optical density of the sample at 415 nm [9]. These results are represented on fig. 2 and fig. 3.

Glycerol promoter *gylP1/P2* showed the highest transcriptional activity. The *aac(3)IVp* was 2 and 3 times weaker than the *gylP1/P2* on 20 and 96 hour of growth, respectively. The *ermEp* showed higher activity than the *aac(3)IVp*, although it did not exceed that of *gylP1/P2*.

The transcription from *gylP1/P2* in *S. coelicolor* is known to be increased in the presence of glycerol, because the latter interacts with GylR repressor and makes dissociate from the promoter [4]. Glucose, in contrast, is a co-repressing molecule. We note that in ATCC14672 *gylP1/P2* does not seem to be repressed by GylR (its gene is located on pMT3226gusA), as the GusA activity is present in the extracts from the respective strain already after 20 hours of growth. In contrast to the published data [4], we observed that 1% (w/v) glycerol rather repressed than induced *gylP1/P2* (see fig. 2 and 3). On the 96<sup>th</sup> hour *gylP1/P2* activity was more vigorous, than on the 20<sup>th</sup> hour. It likely was caused by the exhaustion of glucose in the broth, which eased up *gylP1/P2* repression.

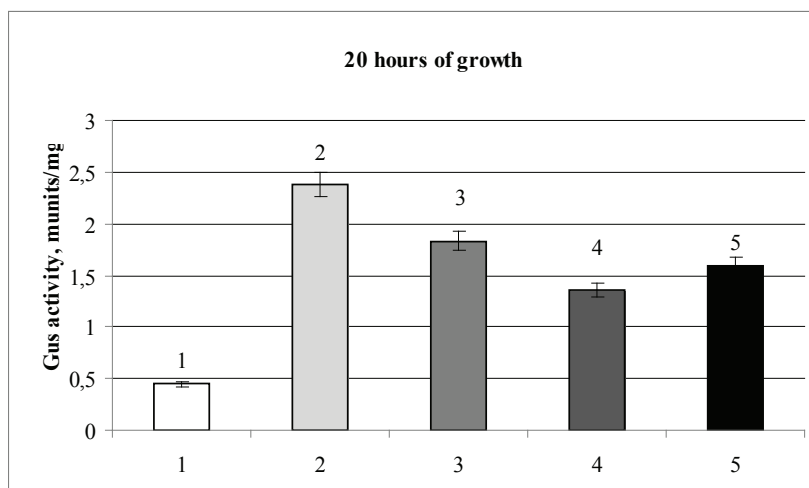


Fig. 2. Glucuronidase activity in cell lysates of *S. ghanaensis* mutants after 20 hours of growth: 1 – *S. ghanaensis* (pGUS) (control); 2 – *S. ghanaensis* (pMT3226GusA); 3 – *S. ghanaensis* (pMT3226GusA), with presence of 1% glycerol in the medium; 4 – *S. ghanaensis* (pSETamGusA); 5 – *S. ghanaensis* (pSETermGusA). Error bar:  $\pm 2\sigma$ .

After 96 h of growth, the activity of *aac(3)IVp* and *ermEp* was lower in comparison to that observed on 20<sup>th</sup> h. Perhaps it is caused by the shift of the culture to the stationary growth phase and the lysis of the cells.

In this work we provide experimental evidence that GusA reporter system is suitable to develop the tools for genetic manipulation in *S. ghanaensis*. In ATCC14672 cells the *gylP1/P2* promoter showed highest transcriptional activity level among three heterologous promoters being tested. Its absolute value was around 1–2 mU mg<sup>-1</sup> of GusA activity, and it did not decrease over the period of 4 days of growth in TSB. Thus, *gylP1/P2* can be used in the future construction of vectors for gene overexpression in *S. ghanaensis*.



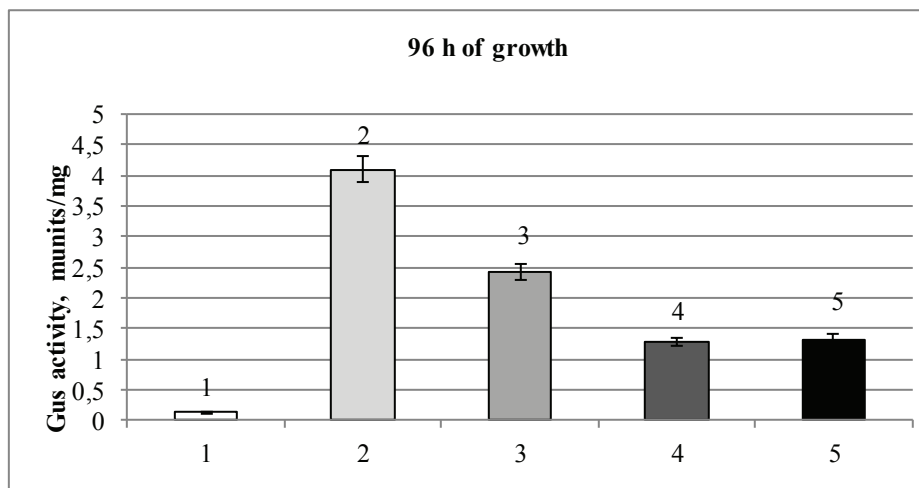


Fig. 3. Glucuronidase activity in cell lysates of *S. ghanaensis* mutants on the 96<sup>th</sup> h of growth: 1 – *S. ghanaensis* (pGUS) (control); 2 – *S. ghanaensis* (pMT3226GusA); 3 – *S. ghanaensis* (pMT3226GusA), with presence of 1% glycerol in the medium; 4 – *S. ghanaensis* (pSETamGusA), 5 – *S. ghanaensis* (pSETermGusA).

This work was supported by grants from Ministry of Education and Science of Ukraine Bg-98F and Bg-97P (to VF).

#### REFERENCES

1. Adachi M., Zhang Y., Leimkuhler C. et al. Degradation and reconstruction of moenomycin A and derivatives: dissecting the function of the isoprenoid chain // J. Am. Chem. Soc. 2006. Vol. 1. N 128(43). P. 14012–14013.
2. Bibb M. J. Regulation of secondary metabolism in streptomycetes // Current Opin. Microbiol. 2005. Vol. 8. P. 208–215.
3. Choi S. U., Lee C. K., Hwang Y. I. et al. Gamma-butyrolactone autoregulators and receptor proteins in non-*Streptomyces* actinomycetes producing commercially important secondary metabolites // Arch. Microbiol. 2003. Vol. 180. P. 303–307.
4. Hindle Z., Smith C. P. Substrate induction and catabolite repression of the *Streptomyces coelicolor* glycerol operon are mediated through the GylR protein // Mol. Microbiol. 1994. Vol. 12. P. 737–745.
5. Horbal L., Kobylyanskyi A., Yushchuk O. et al. Evaluation of heterologous promoters for genetic analysis of *Actinoplanes teichomyceticus*-producer of teicoplanin, drug of last defense // J. Biotechnol. 2013 Oct 23. doi:pii: S0168-1656(13)00451-3.
6. Jefferson R. A., Bevan M., Kavanagh T. The use of the *Escherichia coli*  $\beta$ -glucuronidase as a gene fusion marker for studies of gene expression in higher eukaryotes // Biochem. Soc. Trans. 1987. Vol. 15. P. 17–18.
7. Jefferson R. A., Kavanagh T. A., Bevan M. W. GUS fusions:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants // EMBO J. 1987. Vol. 6. P. 3901–3907.
8. Kieser T., Bibb M. J., Buttner M. J. et al. Practical *Streptomyces* genetics. Norwich, England: John Innes Foundation, 2000. 634 p.

9. *Makitrinsky R.* Genes that regulate moenomycin production: PhD thesis: 03.00.15. Kiev. 2012. 222 p.
10. *Makitrinsky R., Rebets Y., Ostash B.* et al. Genetic factors that influence moenomycin production in streptomycetes // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2010. Vol. 37. N 6. P. 559–566.
11. *Myronovskyi M., Welle E., Fedorenko V., Luzhetskyy A.*  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile reporter in *Actinomycetes* // Appl. Environ. Microbiol. 2011. Vol. 77. P. 5370–5383.
12. *Ostash B., Doud E., Fedorenko V.* The molecular biology of moenomycins: towards novel antibiotics based on inhibition of bacterial peptidoglycan glycosyltransferases // Biol. Chem. 2010. P. 1437–4315.
13. *Ostash B., Walker S.* Moenomycin family antibiotics: chemical synthesis, biosynthesis, biological activity // Nat. Prod. Rep. 2010. P. 1594–1617.
14. *Siegl T., Tokovenko B., Myronovskyi M., Luzhetskyy A.* Design, construction and characterisation of a synthetic promoter library for fine-tuned gene expression in actinomycetes // Metab. Eng. 2013. Vol. 19. P. 98–106.

Стаття: надійшла до редакції 30.09.13

доопрацьована 23.12.13

прийнята до друку 24.12.13

#### ПОРІВНЯННЯ АКТИВНОСТІ ТРЬОХ ГЕТЕРОЛОГІЧНИХ ПРОМОТОРІВ У *STREPTOMYCES GHANAENSIS* ATCC 14672

Г. Мутенко<sup>1</sup>, М. Лопатнюк<sup>1</sup>, Л. Горбаль<sup>1</sup>, А. Лужецький<sup>2</sup>, В. Федоренко<sup>1</sup>, Б. Осташ<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Львівський національний університет імені Івана Франка  
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна  
e-mail: bohdanostash@gmail.com

<sup>2</sup>Гельмгольц-інститут фармацевтичних досліджень Саарланду  
Саарланд-кампус, буд. С2.3, 66123 Саарбрюкен, Німеччина

*Streptomyces ghanaensis* ATCC14672 продукує моеноміцин А, єдину відому природну сполуку, що прямо інгібує пептидогліканові глікозилтрансферази. Становить інтерес розроблення надійних генетичних знарядь, які дали би змогу конструювати похідні ATCC14672 зі зміненим біосинтезом моеноміцинів. Використовуючи  $\beta$ -глюкуронідазну репортерну систему, ми дослідили в ATCC14672 активність трьох гетерологічних промоторів, що широко використовуються у генетиці стрептоміцетів – *gylP1/P2*, *aac(3)IVp* та *ermEp*. Промотор оперона утилізації гліцеролу *gylP1/P2* виявляв найвищу активність, тоді як *aac(3)IVp* – найнижчу. Активність останнього була у 2 і 3 рази нижча ніж така *gylP1/P2* на першу і четверту доби росту, відповідно. Активність *ermEp* була трохи вища ніж *aac(3)IVp*, але не перевищувала сили *gylP1/P2*.

**Ключові слова:** *Streptomyces ghanaensis*, моеноміцин А,  $\beta$ -глюкуронідаза, репортерна система.

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ АКТИВНОСТИ ТРЕХ ГЕТЕРОЛОГИЧЕСКИХ ПРОМОТОРОВ В *STREPTOMYCES GHANAENSIS* ATCC 14672****Г. Мутенко<sup>1</sup>, М. Лопатнюк<sup>1</sup>, Л. Горбаль<sup>1</sup>, А. Лужецкий<sup>2</sup>, В. Федоренко<sup>1</sup>, Б. Остап<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>Львовский национальный университет имени Ивана Франко  
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина  
e-mail: bohdanostash@gmail.com

<sup>2</sup>Гельмгольц-институт фармацевтических исследований Саарланда  
Саарланд-кампус, д. С2.3, 66123 Саарбрюкен, Германия

*Streptomyces ghanaensis* ATCC14672 продуцирует моеномицин А, единственное известное природное соединение, прямо ингибирующее пептидогликановые гликозилтрансферазы. Представляет интерес разработка генетических инструментов, которые позволили бы конструировать штаммы ATCC14672 с измененным биосинтезом моеномицинов. Используя β-глюкуронидазную репортерную систему, мы исследовали в ATCC14672 активность трех гетерологических промоторов, которые широко используются в генетике стрептомицетов – *gyIP1/P2*, *aac(3)IVp* и *ermEp*. Промотор оперона утилизации глицерола *gyIP1/P2* показал самую высокую активность, тогда как *aac(3)IVp* – самую низкую. Активность последнего была в 2 и 3 раза ниже, чем таковая *gyIP1/P2* на первые и четвертые сутки роста, соответственно. Активность *ermEp* была выше, чем *aac(3)IVp*, но не превышала силы промотора *gyIP1/P2*.

**Ключевые слова:** *Streptomyces ghanaensis*, моеномицин А, β-глюкуронидаза, репортерная система.

УДК 502:591.5 + 519.67

**РОЛЬ ПЕДОТУРБАЦІЙНОЇ АКТИВНОСТІ СЛІПАКА  
ЗВИЧАЙНОГО (*SPALAX MICROPHTHALMUS*) У ФОРМУВАННІ  
СТРУКТУРИ ҐРУНТОВОГО ПОКРИВУ**

**Т. Коломбар<sup>1\*</sup>, О. Пахомов<sup>1</sup>, О. Жуков<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара  
пр. Гагаріна, 72, Дніпропетровськ 49010, Україна

<sup>2</sup>Дніпропетровський державний аграрний університет  
вул. Ворошилова, 25, Дніпропетровськ 49600, Україна  
e-mail: dtk1015@mail.ru

Подані результати вивчення впливу риючої активності сліпака на агрегатний склад і електричну провідність ґрунтів. Встановлено, що педотурбаційна активність сліпака призводить до перерозподілу ґрунтових агрегатів і тим самим змінює структуру ґрунту. Відзначено, що характерною особливістю риючої активності є збільшення частки агрономічно цінних агрегатних фракцій розміром 1–7 мм. Зміна фізико-хімічних властивостей ґрунту під дією риючої активності сліпаків призводить до зміни електричної провідності ґрунтового покриву.

*Ключові слова:* педотурбаційна активність, агрегатний склад ґрунтів, електрична провідність.

Активність риючих ссавців впливає на формування фізичних властивостей ґрунтового покриву [5]. Одним із таких показників є агрегатний склад ґрунту, від якого залежить його структура й основні властивості мінеральних та органічних частин. А також «склеювання» їх у процесі засвоєння мікроорганізмами, бактеріями та іншими представниками біологічного середовища ґрунту. Структура ґрунту має дуже важливе значення для функціонування екосистем і сільського господарства (визначає зусилля, необхідні для обробки ґрунту, необхідну кількість поливів і т. ін.) Переважання часток розміром 0,25–2,0 мм робить ґрунт більш пухким і легким для обробки; в той же час у ньому гірше утримуються вода і поживні речовини. Ґрунти з перевагою більш дрібних частинок погано дреноються, є сирими та клейкими, але містять багато поживних речовин і не вилиговуються [9].

Електрична провідність ґрунтів є інтегральним показником, який залежить від низки важливих їх властивостей, зокрема, від агрегатного складу [2]. У попередніх роботах розглядали питання про вплив риючої активності сліпака звичайного (*Spalax microphthalmus*) на електропровідність ґрунту в горизонтальній площині [7], а в цій роботі звернено увагу на вертикальний розподіл цього параметра в місцях порийів сліпака.

Крім того, ми вивчили також особливості зміни співвідношення часток різного розміру в ґрунтовій масі унаслідок педотурбаційної активності сліпака.

**Матеріали та методи**

Урочище Яців Яр, де проводили дослідження, належить до байрачних лісів південного географічного варіанта і лежить поблизу с. Перше Травня (Дніпропетровська область, Україна) (48°19'39,89'' Пн. Ш. та 35°10'55,17'' С. Д.). Загальна протяжність байраку – близько 5,2 км із заходу на схід. Модельний порий був закладений на ділянці степової цілини на схилі північної експозиції байрака Яців Яр. Через порий був зроблений

грунтовий розріз глибиною 0,8 м і шириною 1,3 м. Вимірювання електропровідності й відбір проб для аналізу проводили в його шарах із кроком 0,1 м (рис. 1). Таким чином, полігон представлений 13 трансектами по 6–8 осередків у кожній. Усього в межах модельного пориу було вибрано 93 осередки.

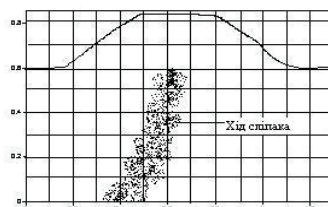


Рис. 1. Схема закладеного полігону (вісь абсцис X – висота розрізу через порий, м – 6–8 осередків; вісь ординат Y – його ширина, м – 13 трансект).

Вимірювання електричної провідності ґрунту (apparent soil electrical conductivity – ECa) проводили за допомогою сенсора HI 76305 (Hanna Instruments, Woodsocket, RI). Цей сенсор працює разом із портативним приладом HI 993310 (рис. 2). Тестер швидко і точно оцінює загальну електропровідність ґрунту, тобто об'єднану провідність ґрунтового повітря, води і часток.



Рис. 2. Портативний прилад HI 993310 зі сенсором HI 76305 (Hanna Instruments, Woodsocket, RI) для вимірювання провідності ґрунту.

Результати вимірювань приладу представлені в одиницях насиченості ґрунтового розчину солями – г/л. Однак слід відзначити, що немає однозначного зв'язку між насиченістю ґрунтового розчину солями й електропровідністю. За даними Віпкера і Кевінса, коефіцієнт переведення одиниць електропровідності (дСм/м – дециСіменс на метр) у одиниці солоності (мг/л) варіює від 1 дСм/м=640 мг/л до 1 дСм/м=700 мг/л, що залежить від якісного складу розчинних солей [11]. У той же час порівняння результатів вимірювань приладом HI 76305 із даними лабораторних досліджень Пеннісі дали змогу оцінити коефіцієнт переведення одиниць: 1 дСм/м=155 мг/л [10]. Неоднозначність переведення одиниць виміру приладу HI 76305 у одиниці електропровідності дає змогу використовувати лише одиниці солоності – г/л.

Поділ матеріалу на агрегати здійснювали за допомогою сухого просіювання в системі сит за методикою Вадюніна, Корчагіна [2]. Було встановлено співвідношення мас (у % від сумарної кількості) таких фракцій: агрегати розміром менше 0,25, 0,25–0,5, 0,5–1, 1–3, 3–5, 5–7, 7–10 і більше 10 мм.

### Результати і їхнє обговорення

Основною тенденцією зміни електропровідності ґрунту в межах обраного модельного пориу сліпака є зменшення її значення з глибиною. Так, електропровідність ґрунту у верхніх горизонтах (рис. 3, А) перебуває на рівні 6–7 г/л (горизонт 0–20 см) з максимальним її значенням 8 г/л у районі ходу сліпака і 5–6 г/л на горизонтах 40–60 см. У ґрунтовому викиді сліпаків електропровідність ґрунту сильно знижена (0–2 г/л).

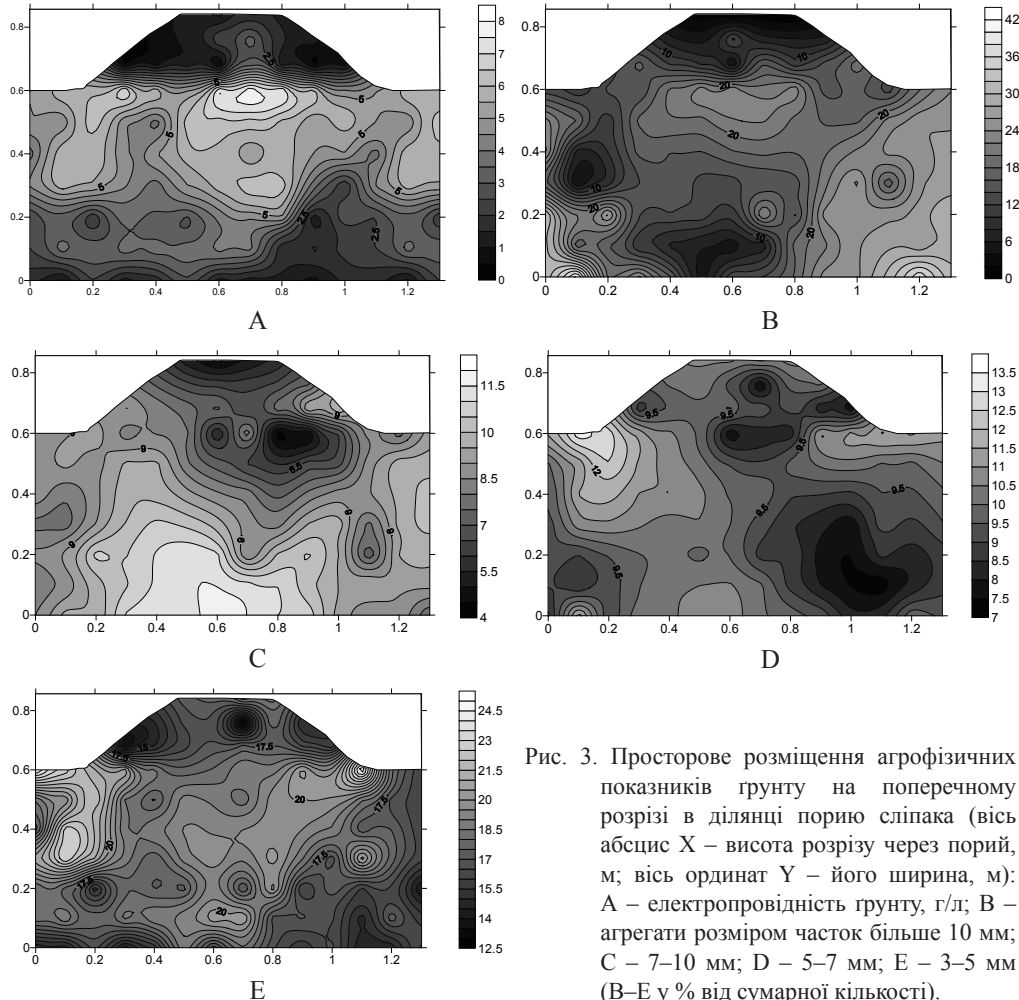


Рис. 3. Просторове розміщення агрофізичних показників ґрунту на поперечному розрізі в ділянці пориу сліпака (вісь абсцис X – висота розрізу через порий, м; вісь ординат Y – його ширина, м): А – електропровідність ґрунту, г/л; В – агрегати розміром часток більше 10 мм; С – 7–10 мм; D – 5–7 мм; Е – 3–5 мм (В–Е у % від сумарної кількості).

Педотурбаційна активність сліпака порушує рівномірний розподіл властивостей ґрунту (в обраному масштабі) [8] і призводить до формування особливої просторової структури. Як видно з наведених на рис. 3, А даних, у межах центру ґрунтового викиду спостерігається ділянка підвищеної електропровідності, яка оточена ділянкою зі зниженою її величиною. У районі ходу сліпака спостерігається значне збільшення цього показника [4]. Це можна пояснити меншою щільністю ґрунту, внаслідок чого збільшується частка ґрунтового повітря, яка має значно меншу електропровідність, ніж тверда або рідка фази ґрунту. Крім того, порий швидко втрачає вологу, яка також є важливим провідником електричного струму.



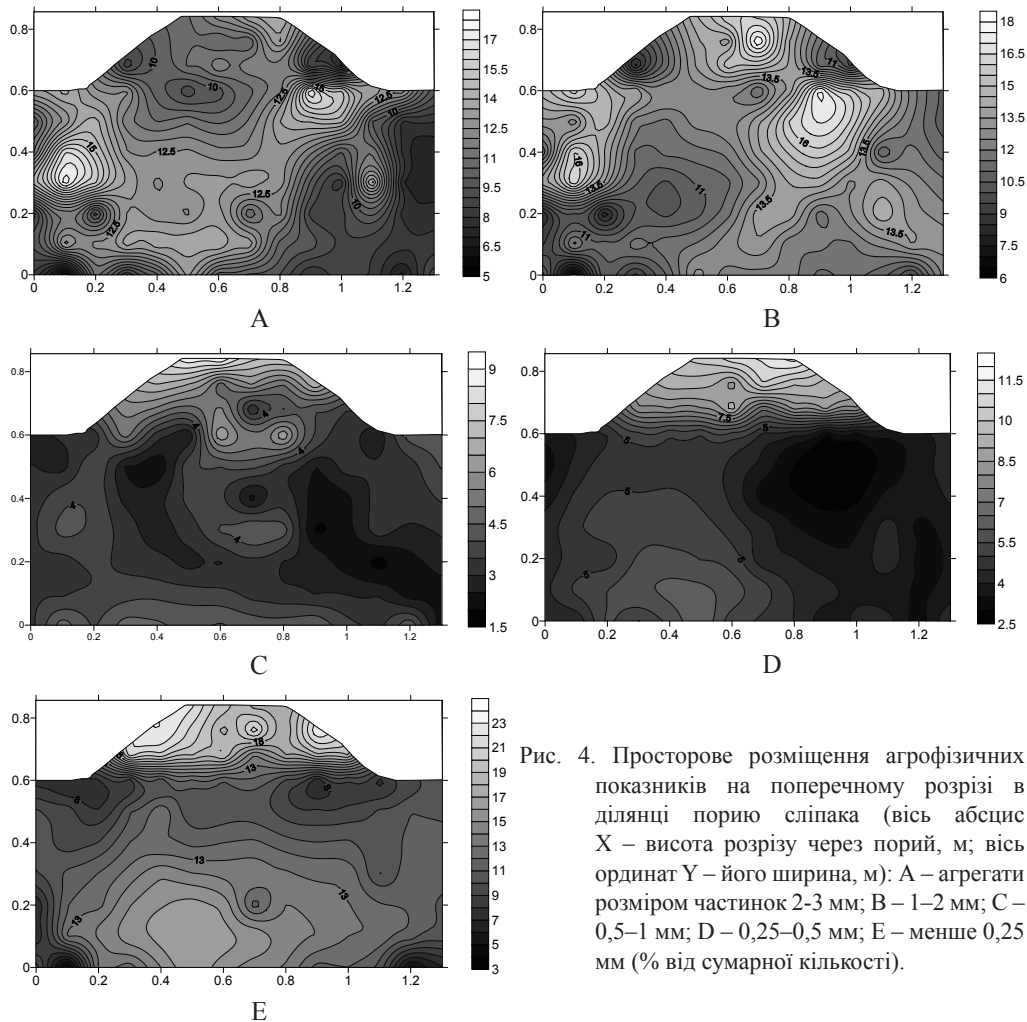


Рис. 4. Просторове розміщення агрофізичних показників на поперечному розрізі в ділянці порий сліпака (вісь абсцис  $X$  – висота розрізу через порий, м; вісь ординат  $Y$  – його ширина, м): А – агрегати розміром частинок 2-3 мм; В – 1-2 мм; С – 0,5-1 мм; D – 0,25-0,5 мм; Е – менше 0,25 мм (% від сумарної кількості).

На рис. 3, 4 показано розподіл агрегатних часточок у межах поперечного розрізу через порий сліпака. На поверхні ґрунту спостерігається незначна кількість великих часток (більше 10 і 7-10 мм), що головним чином є результатом впливу корневих систем трав'янистої рослинності [1]. З глибиною у ґрунті коріння стає менше, їх вплив на структуру слабшає, а розмір агрегатів збільшується. Але в районі ходу сліпака ця закономірність не проявляється у зв'язку з тим, що тварина під час прокладання ходу роздрібнює великі частки. Отже, на всій глибині, вздовж вертикального ходу, не спостерігається значної зміни структури. Найбільша кількість часток розміром 5-7 мм лежить у верхніх горизонтах ґрунту до глибини 20 см. Частки 3-5 мм приблизно однаково розподілені по всій площі розрізу з деяким збільшенням їх кількості в ділянці ходу тварини. Максимальна кількість дрібних агрегатних часточок (0,5-1, 0,25-0,5 і менше 0,25 мм) сконцентрована у ґрунтовому викиді. Вони легко переносяться вітром на значні відстані, що підтверджує участь сліпака в ерозійних процесах.

З отриманих даних випливає, що ріюча активність сліпака привносить значні зміни у звичайний розподіл ґрунтових агрегатів за рахунок подрібнення великих часток і перенесення ґрунтової маси з одних горизонтів в інші.

Кластерний аналіз показує, що в поперечному розрізі порию сліпака можна виділити 5 груп даних. На рис. 5 подано розподіл кластерів у межах ґрунтового профілю.

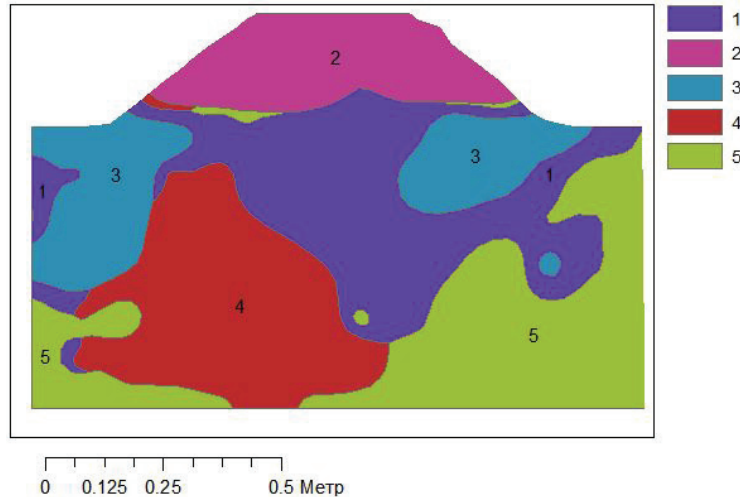


Рис. 5. Просторове розміщення кластерів у межах поперечного зрізу порию сліпака: 1–5 – кластери.

Кластери 3 і 5 характеризують ґрунт, на який не впливає ріюча активність ґрунтових ссавців. Чітко виражений кластер 2 – ґрунт у самому викиді сліпака та кластери 1 і 4, характерні для ділянок з інтенсивною педотурбаційною активністю.

У таблиці показана статистична характеристика виділених кластерів із зазначенням середніх даних кількості частинок різного розміру. Слід зауважити, що майже в кожному з кластерів переважають частинки розміром 5–7 мм. Для кластеру 1 характерна велика кількість дрібних часток (<0,25 мм), однакова кількість часток розміром 0,25–0,5 та 3–5 мм, а також незначний вміст часток розміром 0,5–1 мм і 1–2 мм. У кластері 2, на відміну від інших кластерів, більше часток розміром 0,25–0,5 мм і менше всього частинок >10 мм. Кластер 3 характеризується найбільшою кількістю агрегатів розміром 5–7 і 7–10 мм. 4 кластер є більш однорідним і містить найбільшу кількість великих часток ґрунту. Більша кількість найдрібніших часток (<0,25 мм) і найменша – часток розміром 1–2 мм спостерігається у групі даних кластеру 5.

Статистична характеристика агрегатного складу ґрунту  
 в межах ґрунтового розрізу через порий сліпака

Параметри ґрунту (електро-провідність, ЕС; розмір агрегатів)	Кластер									
	1		2		3		4		5	
	Серед.	Ст. відх.	Серед.	Ст. відх.	Серед.	Ст. відх.	Серед.	Ст. відх.	Серед.	Ст. відх.
ЕС, г/л	19,47	3,00	7,75	6,04	13,11	4,20	11,63	4,14	25,46	5,42
>10 мм	8,09	1,34	7,13	1,57	7,78	1,30	10,64	0,64	9,62	1,03
7–10 мм	9,51	1,05	9,56	1,04	11,10	1,16	10,27	0,45	9,18	1,07
5–7 мм	18,93	0,70	16,34	1,76	21,52	1,59	18,81	0,97	16,35	1,15
3–5 мм	11,49	1,25	10,93	1,84	14,60	1,46	13,12	0,53	8,98	1,42
2–3 мм	13,29	1,12	13,38	2,44	15,27	1,26	11,58	0,92	11,54	1,64
1–2 мм	3,57	1,21	6,01	1,65	3,52	0,69	3,39	0,48	3,33	0,82
0,5–1 мм	4,17	0,92	9,26	1,23	4,07	0,91	5,53	0,45	4,14	0,60
0,25–0,5 мм	11,48	1,36	19,64	2,08	9,02	1,43	15,02	1,56	11,39	2,63
<0,25 мм	19,47	3,00	7,75	6,04	13,11	4,20	11,63	4,14	25,46	5,42

Ґрунтові часточки розміром у межах від 1 до 7 мм є агрономічно цінними і характерні для кластерів 1 і 4, які відображають ділянки з найбільшою інтенсивністю педотурбаційної активності сліпака.

У результаті роботи показано, що ріюча активність сліпака звичайного є важливим фактором формування мозаїчності й різноманіття екологічних умов ґрунтового покриву.

Основною тенденцією зміни електропровідності ґрунту під дією педотурбаційної активності сліпака є зменшення її значення з глибиною від 6–7 г/л у горизонті 0–20 см до 4–5 г/л на глибині 40–60 см, також низька електропровідність у межах ґрунтового викиду, утвореного в результаті ріючої активності сліпака.

Подрібнення великих часток (більше 10 мм) і перенесення ґрунтової маси з одних горизонтів в інші під час прокладання ходів змінює структуру ґрунту, збільшує її аераційні властивості й водопроникність.

Перенесення сліпаком дрібних часток ґрунту (менше 0,25 мм) на його поверхню призводить до інтенсифікації процесів вітрової ерозії.

Характерною особливістю ріючої активності сліпака є збільшення у ґрунті частки агрономічно цінних агрегатних фракцій розміром 1–7 мм.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Белова Н. А. Экология, микроморфология, антропогенез лесных почв степной зоны. Днепропетровск: ДГУ, 1997. 264 с.
2. Вадюнина А. Ф., Корчагина З. А. Методы исследования физических свойств почв. М.: Агропромиздат, 1986. 416 с.
3. Жуков А. В., Коновалова Т. М. Пространственная изменчивость электропроводности почвы под воздействием роющей активности слепышей (*Spalax microphthalmus*) на различных масштабных уровнях // Вісн. Дніпропетровськ. ун-ту. Сер. біол., медицина. 2011. Вип. 2. Т. 2. С. 33–40.
4. Коновалова Т. М. Трехмерная структура почвы в области пороя слепыша (*Spalax microphthalmus*) // Вісн. Дніпропетровськ. ун-ту. Сер. біол., екол. 2011. Вип. 19. Т. 2. С. 71–75.
5. Пахомов А. Е. Биогеоценотическая роль млекопитающих в почвообразовательных процессах степных лесов Украины. Т. 1. Механический тип воздействия. Днепропетровск: ДГУ, 1998. 232 с.
6. Пахомов А. Е., Жуков А. В. Положительное и отрицательное влияние экологического инжиниринга: сравнение парадигм // Вісн. Дніпропетровськ. ун-ту. Сер. біол., екол. 2004. № 1. С. 141–146.
7. Пахомов А. Е., Коновалова Т. М., Жуков А. В. ГИС-подход для оценки изменчивости электропроводности почвы под влиянием педотурбационной активности слепыша (*Spalax microphthalmus*) // Вісн. Дніпропетровськ. ун-ту. Сер. біол., екол. 2010. Вип. 18. Т. 1. С. 58–66.
8. Пахомов А. Е., Кунах О. Н., Коновалова Т. М., Жуков А. В. Пространственная организация системы пороев слепыша (*Spalax microphthalmus*) // Экосистемы, их оптимизация и охрана. Симферополь. 2010. Вип. 2. С. 106–117
9. Теории и методы физики почв / под ред. Е.В. Шеина, Л.О. Карпачевского. М.: Гриф и К, 2007. 616 с.
10. Pennisi B. V., M. van Iersel. 3 ways to measure medium EC // GMPro. 2002. Vol. 22(1). P. 46–48.
11. Whipker B. E., Cavins T. J. Electrical Conductivity (EC): Units and Conversions // <http://www.ces.ncsu.edu/depts/hort/floriculture/Flores/EC%20Conversion.pdf>

**THE ROLE OF PEDOTURBATIONNAYA ACTIVITY  
OF GREATER MOLE RAT (*SPALAX MICROPHTHALMUS*) IN DETERMINING  
THE STRUCTURE OF THE SOIL COVER**

**T. Kolombar<sup>1</sup>, O. Pakhomov<sup>1</sup>, A. Zhukov<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Oles Honchar National University of Dnipropetrovsk  
72, Gagarin Ave., Dnipropetrovsk 49010, Ukraine*

<sup>2</sup>*Dnipropetrovsk State Agrarian University  
25, Voroshylov St., Dnipropetrovsk 49600, Ukraine  
e-mail: dtk1015@mail.ru*

The results of studying the influence of burrowing Greater mole rat activity on aggregate composition and the electrical conductivity of the soil. Found that the greater mole rat pedoturbationnaya activity leads to a redistribution of soil separate entities, thus changes the structure of the soil. It is noted that the characteristic feature of the digging activity is to increase agronomically valuable aggregates 1–7 mm size fractions. Changes in the physical and chemical properties of the soil under the influence of burrowing activity of greater mole rats lead to a change in the electrical conductivity of the soil.

*Keywords:* pedoturbationnaya activity, aggregate composition of soils, electric conductivity.

**РОЛЬ ПЕДОТУРБАЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ СЛЕПЫША  
ОБЫКНОВЕННОГО (*SPALAX MICROPHTHALMUS*) В ФОРМИРОВАНИИ  
СТРУКТУРЫ ПОЧВЕННОГО ПОКРОВА**

**Т. Коломбар<sup>1</sup>, А. Пахомов<sup>1</sup>, А. Жуков<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Днепропетровский национальный университет имени Олесь Гончара  
пр. Гагарина, 72, Днепропетровск 49010, Украина*

<sup>2</sup>*Днепропетровский государственный аграрный университет  
ул. Ворошилова, 25, Днепропетровск 49600, Украина  
e-mail: dtk1015@mail.ru*

Приведены результаты изучения влияния роющей активности слепыша на агрегатный состав и электрическую проводимость почв. Установлено, что педотурбационная активность слепыша приводит к перераспределению почвенных отдельных частей и тем самым изменяет структуру почвы. Отмечено, что характерной особенностью роющей активности является увеличение доли агрономически ценных агрегатных фракций размером 1–7 мм. Изменение физико-химических свойств почвы под действием роющей активности слепышей приводит к изменению электрической проводимости почвенного покрова.

*Ключевые слова:* педотурбационная активность, агрегатный состав почв, электрическая проводимость.

## ВМІСТ І РОЗПОДІЛ ОРГАНІЧНОГО ВУГЛЕЦЮ У КУЛЬТУРБІОГЕОЦЕНОЗАХ ДЕРЕВНИХ НАСАДЖЕНЬ СТЕПУ В УМОВАХ ПРОМИСЛОВОГО РЕГІОНУ

**В. Савосько**

*Криворізький педагогічний інститут  
ДВНЗ «Криворізький національний університет»  
пр. Гагаріна, 54, Кривий Ріг 50086, Україна  
e-mail: savosko@list.ru*

Дослідно-розрахунковим методом встановлено, що запаси органічного вуглецю у штучних деревних насадженнях центральної частини Криворіжжя становлять 30–100 кг/м<sup>2</sup>. Основний пул вуглецю зосереджений у ґрунтах (80–95%) та в деревині (5–20%). На рівень запасів органічного вуглецю у штучних деревних насадженнях впливають вік і умови росту насаджень, а також гранулометричний склад ґрунтів. Нагромадження органічного вуглецю у штучних деревних насадженнях Криворіжжя доцільно вважати важливим фактором регуляції вмісту діоксиду вуглецю в атмосферному повітрі регіону.

*Ключові слова:* пул вуглецю, культурбіогеоценози деревних насаджень, Криворіжжя.

Штучні деревні насадження в потужних промислових регіонах відіграють унікальну роль, формуючи сприятливі для населення мікрокліматичні умови та захищаючи його від негативних наслідків забруднення довкілля. Однак значення таких насаджень останнім часом істотно збільшилося внаслідок актуалізації проблеми потепління клімату й необхідності впровадження заходів зменшення концентрації парникових газів у атмосферному повітрі [10, 11].

Перспективним напрямом зниження вмісту діоксиду вуглецю в атмосфері, на думку експертів, є використання природних можливостей зелених рослин, які завдяки фотосинтезу здатні до активної асиміляції цього газу. Серед рослинності особливе місце належить деревним насадженням, які відзначаються високою біологічною та екологічною організованістю і значною тривалістю життя. Тому деревні насадження слід розглядати як перспективні депозитарії органічного вуглецю в деревині, детриті та ґрунті [4, 13, 21].

За останні роки були здійснені численні дослідження штучних деревних насаджень Криворіжжя, під час яких з'ясовано флористичний склад і екологічний стан насаджень [6, 7], а також запропоновані заходи оптимізації довкілля [7, 20]. Раніше вміст органічного вуглецю в насадженнях регіону розглядався лише в окремих епізодичних публікаціях [19].

Мета роботи – з'ясувати вміст і розподіл органічного вуглецю в основних компонентах (деревині, ґрунті й листовому опаді) культурбіогеоценозів деревних насаджень центральної частини Криворіжжя.

### **Матеріали та методи**

Дослідження були проведені на трьох моніторингових полігонах, які контрастно репрезентують штучні деревні насадження центральної частини Криворіжжя: 1) лісовий масив Карачунівського водосховища, 2) санітарно-захисна зона ПАТ «Арселор Міттал Кривий Ріг», 3) міський лісопарковий пояс. На теренах цих полігонів, де спостерігаються типові екологічні й едафічні умови, були закладені моніторингові ділянки, в межах яких вивчали флористичний склад насаджень і їх вертикальну структуру [2], вимірювали

висоту дерев та діаметр стовбура [2], визначали відносний життєвий стан насаджень (за методикою Алексєєва в модифікації Кулагіна та Шагієвої) [1, 11]. У центральній частині моніторингових ділянок були закладені ґрунтові прикопки глибиною 100 см, де через кожні 20 см відібрали зразки ґрунту [17]. Поруч із прикопками з квадратів 50 см на 50 см у десятикратній повторюваності відбирали зразки листового опаду [18]. Вміст зольних речовин у листовому опаді та кількість органічної речовини у ґрунтах визначали методом сухого прожарювання в муфельній печі при температурі 550°C [17, 18]. Результати опрацьовували методами варіаційної статистики на рівні значущості  $P < 0,95$  [12].

Методика визначення вмісту органічного вуглецю в основних компонентах штучних деревних насаджень Криворіжжя була наступною. Використовуючи таксакаційні методи [2], розраховували запас стовбурної деревини та за допомогою табличних показників щільності деревини [9, 21] визначали масу стовбурної деревини. На основі маси листового опаду та вмісту зольних речовин встановлювали кількість у цьому компоненті органічної речовини [24]. Запас органічної речовини у ґрунті визначали з урахуванням його щільності [3, 15, 17]. Прикінцеві розрахунки виконували на основі попередньо встановлених закономірностей, що 1 кг деревини містить 0,5 кг органічного вуглецю, 1 кг органічної речовини листового опаду – 0,45 кг вуглецю, 1 кг органічної речовини ґрунту – 0,57 кг вуглецю [8, 10, 23, 24].

### Результати і їхнє обговорення

Криворізький залізорудний регіон розташований у посушливій степовій зоні. Тому природний ліс траплявся лише на окремих ділянках заплав річок Інгулець і Саксагань та в байраках балок. Існуючі деревні насадження Криворіжжя мають цілком штучне походження та були створені у 30–70-х роках ХХ століття при промисловому розвитку регіону [7, 20].

Перші посадки захисного масиву Карачунівського водосховища були виконані наприкінці 30-х років, одразу після завершення будівництва цієї гідротехнічної споруди (діл. I та II таблиці). У подальшому насадження деревних порід також здійснювали в середині 50-х (діл. III та IV таблиці) та на початку 70-х років (діл. V таблиці).

Екологічні умови штучних деревних насаджень Карачунівського водосховища дуже різноманітні. Так, дві перші ділянки, де домінують акація біла (*Robinia pseudoacacia* L.) та ясен звичайний (*Fraxinus excelsior* L.), розташовані на мінімальній відстані від рівня води (50–80 м). Тому насадження цих двох ділянок характеризуються повністю сформованою вертикальною структурою та здоровим відносним життєвим станом (див. таблицю). Ділянки III та IV лежать на більш значній відстані від води: 130–190 м. У цій частині лісового масиву чітко простежуються ряди насаджень, які складаються з дуба звичайного (*Quercus robur* L.) з незначними домішками акації білої (*Robinia pseudoacacia* L.). У вертикальній структурі присутні лише два перших яруси дерев, життєвість яких оцінена як ослаблена. Максимально віддалена від води (200–220 м) ділянка V сформована з дуба звичайного (*Quercus robur* L.) та акації білої (*Robinia pseudoacacia* L.). Насадження цієї ділянки характеризуються дуже спрощеною вертикальною структурою та сильно ослабленим відносним життєвим станом.

Деревний масив санітарно-захисної зони ПАТ «Арселор Міттал Кривий Ріг» був створений у середині 30-х років ХХ ст. водночас із будівництвом металургійного комбінату. В першому ярусі насаджень домінують дуб звичайний (*Quercus robur* L.), ясен звичайний (*Fraxinus excelsior* L.) і клен гостролистий (*Acer platanoides* L.). За рахунок позитивного впливу на рівень ґрунтових вод каскаду ставків, екологічні умови цього масиву можна оцінити як відносно сприятливі (діл. VI та VII таблиці). Тому деревні насадження



характеризуються сформованою вертикальною структурою. Однак безпосередня близькість цехів металургійного комбінату обумовила мінімальні значення відносного життєвого стану насаджень, який оцінюється як сильно ослаблений. Моніторингові ділянки міських деревних насаджень лісопаркового поясу розташовані на плакорі в посушливих умовах та поряд із дорогою, де відбувається інтенсивний рух автотранспорту (діл. VIII та IX таблиці). У їх складі переважають дуб звичайний (*Quercus robur* L.) і клен гостролистий (*Acer platanoides* L.). Насадження цих ділянок характеризуються відсутністю вертикальної структури та дуже ослабленим відносним життєвим станом.

Еколого-ботанічні й таксикаційні характеристики штучних  
деревних насаджень Криворіжжя

Моніторингові ділянки	Вертикальна структура					Таксикаційні показники				Відносний життєвий стан	
	A I	A II	A III	Fr	H	Діаметр стовбура на висоті 1,3 м, см	Висота, м	Щільність, шт./га	Запас деревини, м <sup>3</sup> /га	Бал	Оцінка
Захисні насадження Карачунівського водосховища											
I	+	+	+	+	+	25	22	300	156,4	82	Здоров.
II	+	+	+	+	+	21	18	450	135,4	88	Здоров.
III	+	+	-	-	-	18	15	600	110,6	65	Ослаб.
IV	+	+	-	-	-	16	14	675	91,7	70	Ослаб.
V	+	-	-	-	+	12	11	750	45,0	54	Сил. ослаб.
Насадження санітарно-захисної зони ПАТ «Арселор Міттал Кривий Ріг»											
VI	+	-	+	+	-	31	21	150	114,8	31	Сил. ослаб.
VII	+	+	+	-	-	25	19	475	135,1	52	Сил. ослаб.
Захисні насадження міського лісопаркового поясу											
VIII	+	-	-	-	-	19	15	475	97,5	52	Сил. ослаб.
IX	+	+	-	-	-	20	16	425	103,2	45	Сил. ослаб.

**Примітка.** Вертикальна структура: A I – перший ярус, A II – другий ярус, A III – підлісок, Fr – чагарниковий ярус, H – трав'яний ярус, «+» – наявність компонента в ярусі, «-» – відсутність компонента в ярусі. Стан насаджень: Здоров. – здоровий, Ослаб. – ослаблений, Сил. ослаб. – сильно ослаблений.

На нашу думку, близькість до води захисного масиву Карачунівського водосховища закономірно обумовлює максимально комфортні умови розвитку штучного лісу. Тому насадження перших двох ділянок характеризуються найбільшим значенням запасу деревини: 134,4–156,4 м<sup>3</sup>/га (див. таблицю). На інших ділянках масиву при віддаленні від води екологічні умови росту і розвитку деревних рослин поступово та значно погіршуються. Цілком закономірно, що на максимально віддаленій ділянці V виявлений найменший запас деревини – 45 м<sup>3</sup>/га. Сприятливі гідрологічні умови насаджень СЗЗ ПАТ «Арселор Міттал Кривий Ріг», а також їх вік пояснюють високі показники запасів деревини 114,8–135,1 м<sup>3</sup>/га. У захисних насадженнях міського лісопаркового поясу запас деревини становить лише 98–103 м<sup>3</sup>/га. Загалом, основні таксикаційні показники деревних насаджень Криворіжжя є типовими для неморальних лісів аналогічного віку [4, 9, 21, 22]. Водночас вони закономірно менші за аналогічні характеристики лісів центральної та північно-західної України [5, 13, 14, 16].

Проведені розрахунки показали, що стовбурна деревина насаджень Криворіжжя накопичує від 1,4 до 4,9 кг/м<sup>2</sup> органічного вуглецю, середнє значення 3,5 кг/м<sup>2</sup> (рис. 1). При цьому максимальна щільність вуглецю 4,30–4,97 кг/м<sup>2</sup> закономірно виявлена на ділянках I та II, де спостерігаються найбільш сприятливі екологічні умови. Важливо підкреслити, що

запаси органічного вуглецю у стовбурній деревині насаджень Криворіжжя перебувають на рівні лісів помірної зони. Так, в Україні щільність вуглецю коливається в межах від 1,56 кг/м<sup>2</sup> (насадження осики на Львівщині) до 10,3 кг/м<sup>2</sup> (сосновий ліс у Хмельницькій області) при середньому значенні 6,6 кг/м<sup>2</sup> [5, 13, 16].

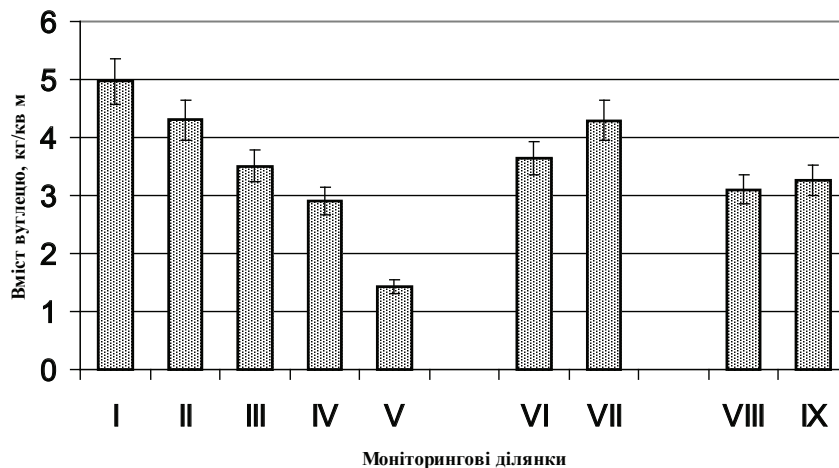


Рис. 1. Вміст органічного вуглецю у стовбурній деревині штучних деревних насаджень Криворіжжя (моніторингові ділянки див. таблицю)

За даними літератури, в лісах Росії стовбурна деревина залежно від екологічних умов зростання, видового складу та віку насаджень накопичує від 1,5 до 6,5 кг/м<sup>2</sup> органічного вуглецю [4, 8, 10, 21]. При цьому експерти FAO вважають [21], що лісові насадження у середньому акумулюють 3,43 кг/м<sup>2</sup> органічного вуглецю, що менше за рівні накопичення в насадженнях Криворіжжя.

У лісових екосистемах, як відомо, ще одним важливим пулом органічного вуглецю є лісова підстилка [4, 9, 21, 24]. За нашими розрахунками (рис. 2), у ґрунти штучних деревних насаджень Криворіжжя з листовим опадом щорічно надходить від 0,06 до 0,13 кг/м<sup>2</sup> органічного вуглецю (середнє значення 0,10 кг/м<sup>2</sup>). При цьому максимальні значення цього показника 0,11–0,13 кг/м<sup>2</sup> були виявлені на території санітарно-захисної зони металургійного комбінату. Слід відзначити, що щільність органічного вуглецю в листовому опаді штучних деревних насаджень Криворіжжя значно менша, порівняно з лісами Світу. Так, за даними літератури [4, 9, 13, 21, 24], ліси України в листовому опаді накопичують від 0,29 до 0,64 кг/м<sup>2</sup> вуглецю, Росії – 0,17–13,0 кг/м<sup>2</sup>, Норвегії – 0,3–0,7 кг/м<sup>2</sup>, Китаю – 0,8–0,9 кг/м<sup>2</sup>. Дослідники відзначають чітку тенденцію до зниження значень цього показника в напрямку від хвойних порід до листяних, а також від північних насаджень до південних [21, 24].

Зазначена закономірність пояснюється інтенсивністю надходження листового опад та швидкістю його розкладу. Тому насадження Криворізького регіону, які складаються виключно з листяних порід і перебувають за південною межею природного поширення лісу та характеризуються незначним рівнем накопичення органічного вуглецю в листовому опаді [6].

Встановлено, що в метровому шарі ґрунтів під штучними деревними насадженнями Криворіжжя максимальна кількість вуглецю була виявлена в санітарно-захисній зоні металургійного комбінату і лісопарковому поясі 93,0 та 90,5 кг/м<sup>2</sup>, відповідно (рис. 3). На

нашу думку, легкий гранулометричний склад ґрунтів захисного масиву Карачунівського водосховища зумовив найменші рівні накопичення вуглецю – лише 33,9 кг/м<sup>2</sup>. Загалом, вміст органічного вуглецю у ґрунтах під штучними деревними насадженнями Криворізького регіону перевищує аналогічні показники лісів інших природно-кліматичних зон [4, 8, 10, 21]. Цей факт, на нашу думку, пояснюється домінуванням у регіоні чорноземного типу ґрунтоутворення, який характеризується накопиченням у ґрунтах гумусу й органічних речовин.

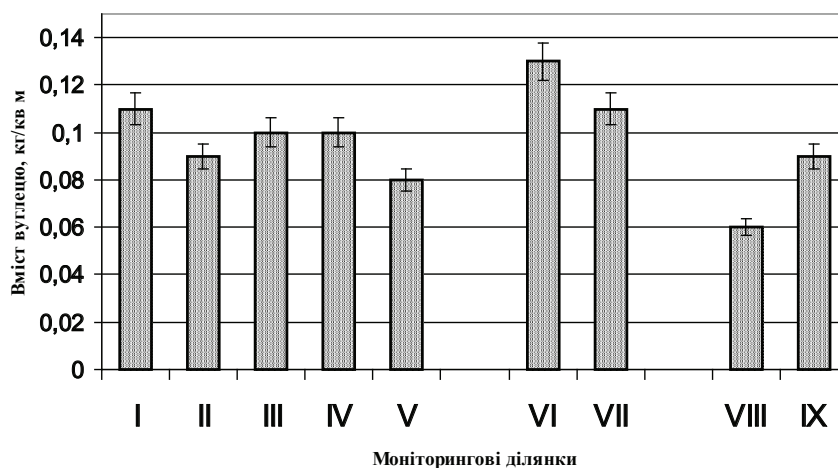


Рис. 2. Вміст органічного вуглецю в листовому опаді штучних деревних насаджень Криворіжжя (моніторингові ділянки див. таблицю).

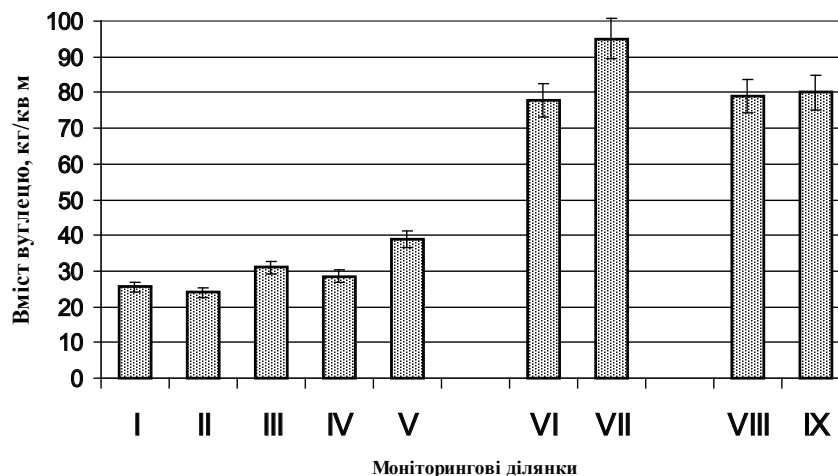
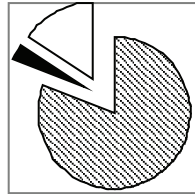


Рис. 3. Вміст органічного вуглецю в метровому шарі ґрунтів штучних деревних насаджень Криворіжжя (моніторингові ділянки див. таблицю)

Штучні деревні насадження Криворіжжя характеризуються певними закономірностями розподілу запасів органічного вуглецю. В першу чергу слід зазначити, що у ґрунтах

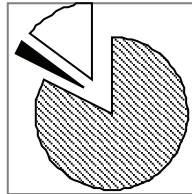
депонується від 80 до 95% цього елемента (рис. 4). У стовбурній деревині накопичується до 20% запасів органічного вуглецю, тоді як листовий опад містить мінімальну кількість – лише 0,07–0,34% органічного вуглецю. Встановлена нами структура розподілу запасів органічного вуглецю деревних насаджень є, в принципі, типовою для лісів помірної зони [4, 9, 21]. Однак ми виявили дещо збільшені значення питомої ваги ґрунтового вуглецю.

Захисні насадження Карачунівського водосховища



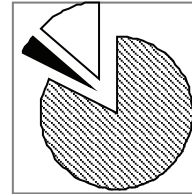
■ Грунт ■ Л/О □ Дер

I



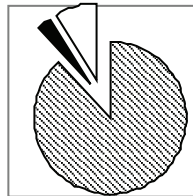
■ Грунт ■ Л/О □ Дер

II



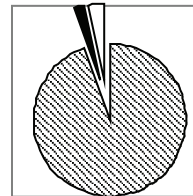
■ Грунт ■ Л/О □ Дер

III



■ Грунт ■ Л/О □ Дер

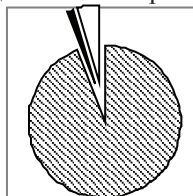
IV



■ Грунт ■ Л/О □ Дер

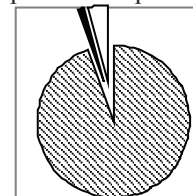
V

Насадження санітарно-захисної зони ПАТ «Арселор Міттал Кривий Ріг»



■ Грунт ■ Л/О □ Дер

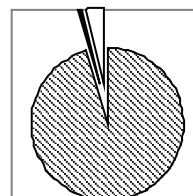
VI



■ Грунт ■ Л/О □ Дер

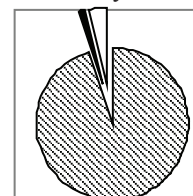
VII

Захисні насадження міського лісопаркового поясу



■ Грунт ■ Л/О □ Дер

VIII



■ Грунт ■ Л/О □ Дер

IX

Рис. 4. Розподіл органічного вуглецю у штучних деревних насадженнях Криворіжжя (I–IX моніторингові ділянки див. таблицю).

Таким чином, сучасні деревні насадження центральної частини Криворіжжя характеризуються: штучним походженням, розвитком під негативним впливом степового клімату і забруднення доквілля, спрощеною вертикальною структурою, а також ослабленим відносним життєвим станом. Залежно від еколого-едафічних умов розвитку та віку порід, запаси органічного вуглецю деревних насаджень Криворіжжя становлять 30–100 кг/м<sup>2</sup>. При цьому від 80 до 95% цих запасів припадає на ґрунти, 5–20% – на стовбурну деревину, 0,05–0,35% – на листовий опад.

За нашими результатами, запас органічного вуглецю у штучних деревних насадженнях Криворіжжя, незважаючи на умови степового клімату і забруднення доквілля, перебувають на рівні лісів помірної зони. Тому їх доцільно вважати важливим фактором регуляції вмісту діоксиду вуглецю в атмосферному повітрі регіону. Важливо наголосити, що отримані нами результати можуть бути використані при розробці заходів зменшення концентрації парникових газів в атмосферному повітрі регіону. У подальших дослідженнях вважаємо за доцільне провести розрахунки чистої первинної продукції деревних насаджень на основі запасів деревини. Також доцільно здійснити уточнення вмісту органічного вуглецю у ґрунтах (з урахуванням кількості ґрунтових карбонатів).

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Алексеев В. А.* Диагностика жизненного состояния деревьев и древостоев // *Лесоведение*. 1989. № 4. С. 51–57.
2. *Анучин Н. П.* Лесная таксация. М.: Лесная промышленность, 1977. 522 с.
3. *Аринушкина Е. В.* Руководство по химическому анализу почв. М.: Изд-во МГУ, 1970. 487 с.
4. *Базилевич Н. И.* Биологическая продуктивность экосистем Северной Евразии. М.: Наука, 1993. 293 с.
5. *Василишин Р. Д., Домашовець Г. С.* Фітомаса та депонований вуглець лісів Львівської області в контексті лісорослинного районування // *Наук. вісн. Нац. лісотехн. ун-ту України*. 2008. Вип. 18.3. С. 50–58.
6. *Добровольский И. А.* Особенности формирования лесной подстилки искусственных лесных ценозов степи в условиях промышленного загрязнения атмосферного воздуха // *Вопросы степного лесоведения и лесной рекультивации земель: сб. науч. трудов*. Днепропетровск: ДГУ, 1986. С. 98–103.
7. *Добровольский И. А.* Эколого-биогеоценологические основы оптимизации техногенных ландшафтов степной зоны Украины путем озеленения и облесения: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Днепропетровск: ДГУ, 1979. 62 с.
8. *Замолодчиков Д. Г., Уткин А. А.* Система конверсионных коэффициентов для расчета чистой первичной продукции лесных экосистем по запасам насаждений // *Лесоведение*. 2000. № 6. С. 54–63.
9. *Замолодчиков Д. Г., Коровин Г. Н., Уткин А. И.* и др. Углерод в лесном фонде и сельскохозяйственных угодьях России. М.: Т-во науч. изданий КМК, 2005. 201 с.
10. *Кудеяров В. Н., Заварзин С. А., Благодатский С. А.* и др. Пулы и потоки углерода в наземных экосистемах России. М.: Наука, 2007. 315 с.
11. *Кулагин А. А., Шагиева Ю. А.* Древесные растения и биологическая консервация промышленных загрязнений. М.: Наука, 2005. 190 с.
12. *Лакин Г. Ф.* Биометрия. М.: Высшая школа, 1990. 352 с.
13. *Лакіда П. І.* Фітомаса лісів України. Тернопіль: Збруч, 2002. 256 с.

14. Миклуш С. І., Миклуш Ю. С. Загальна фітомаса рівнинних букових насаджень України // Наук. вісн. Нац. лісотехн. ун-ту України. 2009. Вип. 19.4 С. 16–21.
15. Панас Р. М. Ґрунтознавство. Львів: Новий Світ, 2006. 372 с.
16. Пастернак В. П. Оцінка запасів вуглецю в соснових насадженнях свіжого бору // Вісн. Харків. нац. ун-ту. Лісове господарство. 2009. № 1. С. 208–211.
17. Практикум по почвоведенню / под ред. И.С. Кауричева. М.: Агропромиздат, 1986. 246 с.
18. Родин Л. Е., Ремезов Н. П., Базилевич Н. И. Методические указания к изучению динамики и биологического круговорота в фитоценозах. Л.: Наука, 1967. 143 с.
19. Савосько В. М. Деревні насадження промислових регіонів як депозитарій запасів органічного вуглецю // Рослини та урбанізація: матеріали третьої міжнар. наук.-практ. конф. (Дніпропетровськ, 19–20 березня 2013 р.). Дніпропетровськ: ТОВ ТВГ «Куніца», 2013. С. 10–12.
20. Терещенко В. Ф. Екологічні принципи і прийоми підбору деревних і чагарникових порід для рекультиватії скельних відвалів Кривбасу: автореф. дис. ... канд. біол. наук. Дніпропетровськ: ДДУ, 1993. 18 с.
21. Усольцев В. А. Биологическая продуктивность лесов Северной Евразии: методы, база данных и её приложения. Екатеринбург: УрО РАН, 2007. 636 с.
22. Уткин А. И., Замолодчиков Д. Г., Честных О. В. и др. Леса России как резервуар органического углерода биосферы // Лесоведение. 2001. № 5. С. 8–23.
23. Честных О. В., Лыжин В. А., Кокиаров А. В. Запасы углерода в подстилках лесов России // Лесоведение. 2007. № 6. С. 114–121.
24. Чорнобай Ю. М. Трансформація рослинного детриту в природних екосистемах. Львів: ДПМ НАН України, 2000. 352 с.

*Стаття: надійшла до редакції 09.08.13*

*доопрацьована 09.12.13*

*прийнята до друку 16.12.13*

## **CONTENT AND DISTRIBUTION OF ORGANIC CARBON IN CULTURAL BIOGEOCENOSIS OF THE TREE PLANTATION ON STEPPE AN INDUSTRIAL AREA**

**V. Savosko**

*Kryvyi Rih Educational Institute*

*State Institution of Higher Education «Kryvyi Rih National University»*

*54, Gagarin Ave., Kryvyi Rih 50086, Ukraine*

*e-mail: savosko@list.ru*

Experimental calculation method revealed that stocks of organic carbon in artificial tree stands central Rih are 30–100 kg/m<sup>2</sup>. The main carbon's pool is concentrated in soils (80–95%) and wood (5–20%). It is shown that the level of organic carbon stocks in artificial tree plantation dependence from age, and conditions affecting vegetation growth and size distribution of soil. Accumulation of organic carbon in artificial tree plantations at Kryvyi Rih ore mining region should be considered an important factor in the regulation of carbon dioxide content in the atmosphere of the region.

*Keywords:* carbon pool, cultural biogeocoenoses of the tree plantations, Kryvyi Rih ore mining region.



**СОДЕРЖАНИЕ И РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ОРГАНИЧЕСКОГО УГЛЕРОДА  
В КУЛЬТУРБИОГЕОЦЕНОЗАХ ДРЕВЕСНЫХ НАСАЖДЕНИЙ СТЕПИ  
В УСЛОВИЯХ ПРОМЫШЛЕННОГО РЕГИОНА**

**В. Савосько**

*Криворожский педагогический институт  
Государственное высшее учебное заведение  
«Криворожский национальный университет»  
пр. Гагарина, 54, Кривой Рог 50086, Украина  
e-mail: savosko@list.ru*

Опытно-расчетным методом установлено, что запасы органического углерода в искусственных древесных насаждениях центральной части Криворожья составляют 30–100 кг/м<sup>2</sup>. Основной пул углерода сосредоточен в почвах (80–95%) и в древесине (5–20%). Доказано, что на уровень запасов органического углерода в искусственных древесных насаждениях влияют возраст и условия произрастания насаждений, а также гранулометрический состав почв. Накопление органического углерода в искусственных древесных насаждениях Криворожья целесообразно считать важным фактором регуляции содержания диоксида углерода в атмосферном воздухе региона.

*Ключевые слова:* пул углерода, культурбиогеоценозы древесных насаждений, Криворожье.

УДК 594.1:591.5

**ВПЛИВ БІОТИЧНИХ ЧИННИКІВ НА РИТМ СЕРЦЕВИХ СКОРОЧЕНЬ У  
ПЕРЛІВНИЦЕВИХ (BIVALVIA, UNIONINAE, ANODONTINAE)**

**А. Стадниченко, В. Гирин**

*Житомирський державний університет імені Івана Франка  
вул. Велика Бердичівська, 40, Житомир 10008, Україна  
e-mail: stadnychenko@yandex.ru*

Досліджено особливості впливу на ритм серцебиття у перлівницевих *Unio pictorum*, *U. tumidus*, *Anodonta cygnea* «зябрової вагітності», епіойків (личинки гірчака) і паразитів (трематод). За сприятливих умов навколишнього середовища на частоті серцебиття у самок «зяброва вагітність» не позначається. Заселення зябер цих моллюсків личинками гірчака і ураження їхніх гонад трематодами викликають порушення серцевого ритму, характер і ступінь вираженості яких зумовлюються кількістю епіойків і паразитів, які припадають на одну особину їхніх хазяїв.

*Ключові слова:* *Unio*, *Anodonta*, «зяброва вагітність», личинки гірчака, трематоди, частота серцебиття.

Ритм серцевих скорочень у всіх тварин, у тому числі й у двостулкових моллюсків родини перлівницевих (Unionidae), значною мірою залежить від дії на них сукупності абіотичних чинників навколишнього середовища. Натомість про роль біотичних чинників у цьому плані відомостей небагато. Вони, здебільшого, обмежуються тими, котрі стосуються впливу на частоту серцебиття у моллюсків такого біотичного чинника як зараження їх плоскими червами – аспідогастрами [6–8] або партеногенетичними поколіннями (спороцисти, материнські та дочірні редії) і розповсюджувальними личинками (церкарії) трематод [11, 12], облігатними проміжними хазяями яких ці моллюски є. Однак і ці матеріали є далеко не повними, а іноді суперечливими. Ще скупішими є відомості [14] щодо залежності серцевого ритму перлівницевих у разі заселення їх епіойками (личинками гірчака), а також у разі перебування самок цих моллюсків у стані «зябрової вагітності». Все це і спонукало нас узяти за мету дослідження з'ясування того, як кожен із цих трьох біотичних чинників впливає на частоту серцебиття у видів *Unio* і *Anodonta*.

Роботу виконано за фінансової підтримки Державного агентства з питань науки, інновацій та інформатизації України (договір № М/385-2012 від 08.10.2012 р.).

**Матеріали та методи**

Матеріалами слугували 1074 екз. – *Unio pictorum* (Linnaeus, 1758) (431 екз.), *U. tumidus* (Philipsson, 1788) (447 екз.), *Anodonta cygnea* (Linnaeus, 1758) (196 екз.), зібраних у басейні Середнього Дніпра (р. Гуйва, с. Пряжево Житомирської обл.) з квітня по жовтень 2012 р. До місця стаціонарних досліджень матеріал перевозили обгорненим складеною у кілька шарів вологою мішковиною. Аклімацію тварин до умов лабораторного утримання здійснювали, як належить [15], протягом 15 діб. Моллюсків при цьому утримували в акваріумах (ємність 200 л) із дехлорованою відстоюванням (доба) водопровідною водою (температура 20–22°C, рН 7,4–8, вміст кисню – 8,4–8,9 мг/л). За зменшення об'єму води в акваріумах на 1/5 його поповнювали свіжою водою.

По завершенні періоду аклімації молюсків встановлювали у них кількість серцевих скорочень за одиницю часу (уд./хв). Задля цього у стулках їхніх черепашок (у ділянках, які містяться над серцем) за допомогою ножівки робили «віконце» (1,5×1,5 см), намагаючись при цьому в жодному разі не ушкодити ні покриви нутрянного мішка, ні, тим паче, розміщені у ньому внутрішні органи. Протягом наступних 30 хв перлівницевих утримували в заповнених акваріумною водою кюветах, аби у них стабілізувався ритм серцевих скорочень. Далі візуально, користуючись секундоміром, підраховували кількість ударів серця за хвилину. Ці результати знімали тричі, а потім виводили середнє значення для кожної досліджуваної особини.

Опісля, перетнувши замикальні м'язи черепашки, розкривали її стулки і оглядали зябри на предмет виявлення на них епіойків – личинок гірчака і марсупіїв порожніх або заповнених тією чи іншою мірою яйцеклітинами, ембріонами або личинками (глохідіями) цих тварин. За необхідності мікроскопіюванням тканин гонад з'ясовували стать досліджуваних особин. Останнім по черзі здійснювали обстеження молюсків на зараженість їх партенітами і личинками трематод. З цією метою із тканин статевих залоз, гепатопанкреаса, мантиї виготовляли і досліджували (МБР, зб. 7×8 і 7×40) тимчасові мікропрепарати.

Статистичну обробку кількісних даних здійснено методами базової варіаційної статистики [3, 4].

#### Результати і їхнє обговорення

Норма особини – це відповідність її умовам перебування [16]. З'ясовано, що за таких обставин ритм серцевих скорочень у всіх досліджених видів є дуже подібним (див. таблицю). Крайні значення амплітуди коливання цього показника становлять 6–13 уд./хв. Статистично вірогідної різниці за частотою серцебиття між самцями і самками не виявлено. Усі ці відомості не суперечать тим, які було отримано щодо видів *Unio* і *Anodonta* у попередні роки [12, 13].

Самки усіх перлівницевих відкладають яйцеклітини у вивідні камери – марсупії, які утворюються у них на зовнішніх півзбрах, і, як вкрай рідкісний виняток, – на півзбрах внутрішніх. У цих вивідних сумках відбувається ембріональний розвиток *Unio* і *Anodonta*, який завершується формуванням личинок перлівницевих – глохідіїв. «Зяброва вагітність» у досліджених нами видів *Unio*, як виявилось (див. таблицю), не вплинула на ритм серцевих скорочень у самок, тоді як щодо *Anodonta cygnea* відзначено статистично вірогідне ( $P=99,1\%$ ) сповільнення його порівняно з нормою (на 8,1%).

Вплив біотичних чинників на ритм серцевих скорочень (уд./хв) у перлівницевих

Молюск	n	Стать	Ритм серцевих скорочень			
			норма	«зяброва вагітність»	личинки гірчака	трематодна інвазія
			M±m V	M±m V	M±m V	M±m V
<i>U. pictorum</i>	217	Самки	9,71±0,62 21,10	9,69±0,38 18,20	10,69±0,42 9,90	11,58±0,07 17,00
	214	Самці	10,15±0,32 21,05		11,03±0,35 20,20	12,93±0,53 11,65
<i>U. tumidus</i>	227	Самки	9,34±0,09 11,10	9,44±0,04 10,60	9,74±0,04 12,30	10,93±0,50 21,20
	220	Самці	9,36±0,02 17,64		11,36±0,46 15,88	13,99±0,73 12,2
<i>A. cygnea</i>	102	Самки	9,74±0,22 8,90	8,95±0,32 18,10	10,89±0,32 9,60	13,57±0,83 10,11
	94	Самці	10,68±0,18 11,10		11,15±0,78 15,60	13,91±0,64 12,90

Зумовлене це, гадаємо, тим, що у всіх перлівницевих в їхніх життєвих циклах спостерігаються 4 фази розмноження, які у видів *Unio* і *Anodonta* не збігаються в часі [2, 10]. Досліджені нами *U. pictorum* і *U. tumidus* були зібрані у липні, тобто тоді, коли самки їх перебували на четвертій фазі циклу розмноження (фаза згасання). У марсупіях їх спостерігалися лише нечисленні ембріони третіх кладок. Таке невелике фізіологічне навантаження не позначилося на ритмі серцебиття цих тварин. Що стосується *A. cygnea*, то у неї, як у всіх видів *Anodontinae*, репродуктивний цикл трифазний (дві фази осінні й одна весняна). Використані у нашому дослідженні *A. cygnea* були здобуті у першій-другій декадах травня, тобто тоді, коли вони перебували на третій фазі їхнього циклу розмноження, а марсупії їх були вщерть виповнені повністю сформованими, цілком готовими для виведення у навколишнє середовище глохідіями. Висока плодючість видів *Anodonta* – 40–694 тис. яйцеклітин на особину [9, 17], а також те, що останньому нересту у них передують гібернація, наштотвухують на думку, що ці дві обставини, взяті вкупі (важка «вагітність» і ослаблення організму тварин унаслідок перебування їх у несприятливих умовах зимівлі) спричиняють у них певне зниження рівня загального обміну речовин. А одним із показників прояву цього і є статистично вірогідне ( $P=99,1\%$ ) сповільнення частоти їхніх серцевих скорочень.

На зябрах різних видів *Unio* і *Anodonta* нерідко локалізуються звичайні для них епіойки – личинки гірчака (риби з родини корошових) *Rhodeus sericeus amarus* Bloch. Їх самки за допомогою довгого яйцекладу відкладають ікру в мантійну порожнину цих моллюсків, а личинки, що з неї розвиваються, осідають на зябрах перлівницевих. Живляться вони самотійно за рахунок великих запасів жовтка, зосередженого в жовтковому міхурі. Своїм хазяям – моллюскам – за високої інтенсивності заселення їхніх зябер вони завдають відчутної шкоди через те, що стискають їхні філаменти, порушуючи тим самим газообмін, що в них зазвичай відбувається. А це, у свою чергу, позначається на ритмі серцебиття цих тварин (див. таблицю). Ступінь вираженості й напрям такого порушення визначаються інтенсивністю заселення їх епіойками. Так, для самок *U. tumidus*, за нашими даними, вона становила  $41\pm 4,3$  екз./особ., а для *U. pictorum* – від  $8,2\pm 1,1$  екз./особ. У перших із них відзначено статистично вірогідне ( $P=94,5\%$ ) прискорення серцебиття, тоді як у других суттєвих змін у цьому плані не відбулося. Відомо, що ступінь заселеності зябер личинками гірчака зазвичай є вищим у самців порівняно зі самками [10]. Тому саме у перших із них частіше спостерігається зрушення значень показника частоти серцебиття у бік його зростання. Згідно з одержаними даними, такої різниці між самцями і самками не виявлено (див. таблицю). Вважаємо, що провідну роль у зрушеннях частоти серцебиття відіграє не стільки стать моллюсків, скільки кількість оселених на їхніх зябрах епіойків. Це добре видно на прикладі *A. cygnea*, у самок якої статистично вірогідне ( $P=99,6\%$ ) зростання частоти серцебиття викликається оселенням на її зябрах  $33,3\pm 2,4$  екз./особ. личинок гірчака. У самців же з того самого біотопа цей показник не порушується проти норми (а у зябрах їх виявлено лише  $7,2\pm 0,9$  екз./особ. цього епіойка).

Прискорення ритму серцевих скорочень, вважаємо, слід розглядати як прояв захисно-приспосувального процесу, спрямованого на посилення газообміну у зябрах перлівницевих, ушкоджених унаслідок компресії їх цими епіойками.

Звичайними паразитами перлівницевих є плоскі черви – трематоди, для яких ці моллюски виконують роль облігатних проміжних хазяїв. Трематоди різних видів можуть неоднаково інтенсивно впливати на них. Тому в наведену у цій статті таблицю включено тільки ті дані, котрі стосуються моллюсків спонтанно заражених трематодами лише одного виду – *Vicephalus polymorphus* Baer, 1827. Досліджені тварини відзначалися переважно помірною (середньою) інтенсивністю інвазії (дифузне ураження близько 50% від загального

об'єму статевих залоз). Зареєстровано лише єдиний випадок генералізованої інвазії (у самця *U. tumidus* уся гонада в різних напрямках була пронизана довжелезними (до 1500 мкм) спороцистами *B. polymorphus*) і два випадки слабкої інвазії (ураження цими гельмінтами до 10% об'єму гонад у самця *U. pictorum* і самки *U. tumidus*). Ці поодинокі випадки ми не включили в об'єм аналізованої сукупності даних, представлених у таблиці.

З'ясовано, що за ураження спороцистами і церкаріями *B. polymorphus* близько 50% об'єму статевих залоз у перлівницевих у них статистично вірогідно ( $P=99,9\%$ ) зростає частота пульсації серця (див. таблицю). Ці дані дуже близькі до отриманих нами раніше результатів досліджень [10, 11, 14, 15]. Порівняння їх свідчить про те, що напрям зрушень частоти серцебиття не зумовлюється видовою приналежністю гельмінтів, а визначається, перш за все, інтенсивністю інвазії молюсків цими паразитами.

Отже, біотичні чинники зовнішнього походження (епіюйки і паразити) залежно від кількісної характеристики діючих на молюсків агентів змушують останніх пристосовуватися до негативного на них впливу, щоби зменшити його шкідливу дію або нівелювати її взагалі. А відтак, зростання ритму серцевих скорочень у *Unio* і *Anodonta* за означених вище обставин – це захисно-пристосувальна реакція, що проявляється у формі компенсаторної тахікардії. Адже відомо [18], що за дії на прісноводних безхребетних, у тому числі й на молюсків, ушкоджуючих чинників навколишнього середовища у них (як протидія цьому) підвищується рівень загального обміну речовин [1, 5]. У нашому досліді проявом цього якраз і є зростання частоти серцебиття, яке спрямоване на підвищення ефективності функціонування всіх фізіологічних процесів організму цих тварин, аби звести до можливого мінімуму шкідливість впливу на них епіюйків і паразитів.

Що стосується «зябрової вагітності», то її можна розглядати як своєрідний періодично діючий біотичний чинник внутрішнього походження. Цей філогенетично обумовлений фізіологічний процес є звичайним, обов'язковим етапом життєвих циклів перлівницевих, спрямованим на збереження їх видів. Тому «зяброва вагітність» у нормі не викликає будь-яких зрушень у функціонуванні тих чи інших систем органів цих тварин. Тоді ж, коли останні зазнають дії несприятливих для них чинників навколишнього середовища або потерпають унаслідок патологічних зрушень стабільності гомеостазу їх внутрішнього середовища, «зяброва вагітність» може виступати у ролі обтяжуючого чинника. У таких випадках кінцевий результат, безперечно, буде залежати від сукупної дії на організм молюсків усіх зовнішніх і внутрішніх чинників, у тому числі і від «зябрової вагітності».

У нормі частина серцевих скорочень у *U. pictorum*, *U. tumidus* і *A. cygnea* становить зазвичай 9–10 уд./хв, (незалежно від статі тварин) при амплітуді коливання значення цього показника від 6 до 13 уд./хв. У неінвазованих і слабо інвазованих трематодою *B. polymorphus* самок з ознаками «зябрової вагітності» ритм серцевих скорочень лишається без змін. Помірна трематодна інвазія таких молюсків супроводжується прискоренням серцебиття, а важка, тотальна інвазія – значним його уповільненням. Ступінь і напрям змін ритму серцебиття у перлівницевих обох статей унаслідок ушкодження їхніх зябер звичайними епіюйками цих тварин – личинками гірчака – обумовлюється інтенсивністю заселеності їх останніми. Низький її рівень не впливає на частоту серцебиття, помірний веде до його прискорення, а високий рівень – до уповільнення.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Бургер Т. И. Метаболизм водных беспозвоночных в токсической среде. К.: Наук. думка, 1979. 190 с.

2. Властов Б. В. Порционность яйцекладок, фазы размножения и продолжительность эмбриогенеза при разных температурах у видов перловиц (*Unio*) // Вопр. общей зоологии и медицинской паразитологии. М.: Изд-во АН СССР, 1962. С. 63–83.
3. Деркач М. П. Елементи статистичної обробки результатів біологічного експерименту. Львів: Вид-во ЛДУ, 1963. 67 с.
4. Лакин Г. Ф. Биометрия. М.: Высш. школа, 1973. 343 с.
5. Маляревская А. Я. Биохимические механизмы адаптации гидробионтов к токсическим веществам // Гидробиол. журнал. 1985. Т. 21. Вып. 3. С. 70–82.
6. Павлюченко О. В. Вплив зараженості перлівницевиx (Mollusca: Bivalvia: Unionidae) гельмінтом *Aspidogaster conchicola* на ритм серцевих скорочень *in vitro* // Наук. часопис НПУ ім. М.П. Драгоманова. Біологія. 2005. № 1 (1). С. 127–134.
7. Павлюченко О. В. Ритм сердечной деятельности перловицевых как показатель их физиологического статуса // Актуальные проблемы экологической физиологии, биохимии и генетики животных: матер. Междунар. науч. конф. Саранск: Изд-во Мордов. ун-та, 2005. С. 169–170.
8. Павлюченко О. В. Вплив інвазії *Aspidogaster conchicola* на ритм серцевих скорочень Unioninae (Mollusca: Bivalvia) // Молодь і поступ біології: тези доп. I Міжнар. конф. студентів і аспірантів. Львів: СПОЛОМ, 2005. С. 259–260.
9. Стадниченко А. П. Зараженность *Unio pictorum* и *Anodonta piscinalis* (Mollusca, Lamellibranchia) партенитами *Vucephalus polymorphus* Baer (Trematodes) и воздействие паразитов на организм хозяев // Паразитология. 1974. Т. 7. Вып. 5. С. 421–426.
10. Стадниченко А. П. Перлівницеві. Кулькові (Unionidae, Cycladidae). К.: Наук. думка, 1984 (Фауна України. Т. 29. Вип. 9). 382 с.
11. Стадниченко А. П., Анистратенко В. В., Грабинская О. В. и др. Влияние трематодной инвазии на ритм сердечной деятельности пресноводных моллюсков, подвергнутых воздействию на них ксенобиотиков // Деп. в УкрИНТЭИ 04.03.1993. №358-Ук 93. 10 с.
12. Стадниченко А. П., Анистратенко В. В., Грабинская О. В. и др. Зараженность перловицевых (Mollusca, Bivalvia, Unionidae) партенитами *Vucephalus polymorphus* (Trematoda) и воздействие паразитов на ритм сердечной деятельности хозяев // Паразитология. 1974. Т. 28. Вып. 2. С. 124–129.
13. Стадниченко А. П., Гирин В. К., Иваненко Л. Д. Комплексна дія екологічних факторів на ритм серцевих скорочень у перлівницевиx // Вісн. ЖНАЕУ. Біологія. 2009. № 1. С. 191–196.
14. Стадниченко А. П., Сластенко Н. М., Бондаренко О. В. и др. Влияние ионов тяжелых металлов на ритм сердечных сокращений перловицевых // Деп. в УкрНИИТИ 11.03.90, №420-Ук 90. 24 с.
15. Стадниченко А. П., Сластенко Н. М., Бондаренко О. В. и др. Влияние физиологического статуса перловиц и сочетанного поражения их партенитами буцефалид и личинками горчака на ритм сердечных сокращений моллюсков // Тез. докл. III Всесоюз. съезда паразитологов. К.: Б.И., 1991. С. 158.
16. Строганов Н. С. Биологический аспект проблемы нормы и патологии в водной токсикологии // Теорет. проблемы водн. токсикологии. Норма и патология. М.: Наука, 1983. С. 5–21.
17. Троицкий С. К. Пресноводные ракушки Азово-Черноморского края. Ростов-на-Дону: Азово-Черноморское Краевое изд-во, 1934. 44 с.
18. Хлебович В. В. Акклимация животных организмов. Л.: Наука, 1981. 136 с.



**THE INFLUENCE OF BIOTIC FACTORS ON HEART CONTRACTIONS RHYTHM IN LAMELLIBRANCHIA MOLLUSKS (BIVALVIA, UNIONINAE, ANODONTINAE)****A. Stadnychenko, V. Gyrin**

*Ivan Franko State University of Zhytomyr  
40, Velyka Berdychivska St., Zhytomyr 10008, Ukraine  
e-mail: stadnychenko@yandex.ru*

Peculiarities of "gill pregnancy", *Rhodeus amarus* larvae and trematodes influence on heart rhythms in *Unio pictorum*, *U. tumidus*, *Anodonta cygnea* are researched. In favourable environment female gill pregnancy doesn't change heart rhythms. These mollusks gills invasion with *Rhodeus amarus* larvae and the destruction of their gonads with trematodes cause changes in heart rhythms the character and level of which depend on *Rhodeus amarus* larvae and parasites quantity per one specimen of their hosts.

*Keywords:* *Unio*, *Anodonta*, "gill pregnancy", *Rhodeus amarus* larvae, trematodes, heart contractions frequency.

**ВЛИЯНИЕ БИОТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА РИТМ СЕРДЕЧНЫХ СОКРАЩЕНИЙ У ПЕРЛОВИЦЕВЫХ (BIVALVIA, UNIONINAE, ANODONTINAE)****А. Стадниченко, В. Гирин**

*Житомирский государственный университет имени Ивана Франко  
ул. Большая Бердичевская, 40, Житомир 10008, Украина  
e-mail: stadnychenko@yandex.ru*

Исследованы особенности влияния на ритм сердцебиения у перловицевых *Unio pictorum*, *U. tumidus*, *Anodonta cygnea* «жаберной беременности», эпийков (личинки горчака) и паразитов (трематод). При благоприятных условиях внешней среды на частоте сердцебиения у самок «жаберная беременность» не отражается. Заселение жабер этих моллюсков личинками горчака и заражение их трематодами вызывают нарушения сердечного ритма, характер и степень выраженности которых обуславливаются количеством эпийков и паразитов, приходящихся на одну особь их хозяев.

*Ключевые слова:* *Unio*, *Anodonta*, «жаберная беременность», личинки горчака, трематоды, частота сердцебиения.

## МОРФОЛОГІЧНИЙ ТА ГЕНЕТИЧНИЙ ПОЛІМОРФІЗМ ЗЕЛЕНИХ ЖАБ (*PELOPHYLAX*) ВОДОЙМ ЗАХІДНОЇ УКРАЇНИ

В. Стах<sup>1</sup>, М. Белоконь<sup>2</sup>, І. Хамар<sup>1</sup>, Ю. Белоконь<sup>2</sup>, О. Решетило<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Львівський національний університет імені Івана Франка  
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна

<sup>2</sup>Інститут загальної генетики імені М.І. Вавилова РАН  
вул. Губкіна, 3, Москва 119991, Росія

<sup>3</sup>Інститут екології Карпат НАН України  
вул. Козельницька, 4, Львів 79026, Україна  
e-mail: vstax\_77@mail.ru

Проблема видового визначення зелених жаб пов'язана з гібридним способом відтворення особин *Pelophylax esculentus*. Гібрид успадковує гени обох батьків: жаби озерної *Pelophylax ridibundus* і жаби ставкової *Pelophylax lessonae*. Було встановлено, що чотири з досліджених особин є типовим прикладом геміклонального успадкування, а їхня локалізація не зумовлена географічними умовами. Порівнявши дані генетичного та морфологічного аналізів, встановили, що під час визначення видової приналежності особин зелених жаб у польових умовах оптимальним є використання індексу F/T. За його допомогою точність визначення особин зелених жаб до виду становить 70%.

*Ключові слова:* клептон, мікросателітні локуси, жаба озерна, жаба ставкова, жаба істівна, Західна Україна.

На даний час актуальним серед сучасних напрямів зоології є дослідження тварин з особливим характером таксономічного статусу та специфічних еволюційних взаємовідносин, що ми і спостерігаємо у деяких земноводних, зокрема у представників роду *Pelophylax*. Вони представлені у Львівській та Волинській областях трьома видами: жабою озерною – *Pelophylax ridibundus* [Pallas, 1771], ставковою – *Pelophylax lessonae* [Camerano, 1882 «1881»] та їхнім гібридом – істівною – *Pelophylax esculentus* [Linnaeus, 1758]. Оскільки в даному випадку спостерігається нетрадиційне успадкування при утворенні гібридних форм, та передавання у мейозі, як правило, геномів одного із батьківських видів, то це і стало причиною тверджень про причетність останнього виду до нової еволюційно-таксономічної одиниці – «клептону», та про наявність напівклонального (геміклонального) розмноження.

До останнього часу для встановлення видової приналежності зелених жаб використовувалися здебільшого морфометричні методи. Л. Бергер [15] вказував на діагностичність таких показників, як відношення довжини стегна до довжини гомілки (F/T), довжини першого пальця задньої кінцівки до довжини внутрішньоп'яtkового горбка (D.p./L.t.ci.), довжини гомілки до довжини внутрішньоп'яtkового горбка (T./L.t.ci.). У 80-х роках С.В. Тарашук [13] для вибірок чисельністю не менше 20 особин запропонував узагальнений мультиплікативний індекс:  $I_x = T/L.t.ci. * D.p./L.t.ci. * T/L.c.s.$  Для кожного виду встановлені межі індексу, проте в літературних джерелах подаються різні показники мінімуму та максимуму, наприклад: *P. lessonae* < 20 < *P. esculentus* < 32 < *P. ridibundus* [8]; *P. lessonae* < 22 < *P. esculentus* < 42 < *P. ridibundus* [13]. Дослідження гібридних популяцій із Центральної Чорноземної зони Росії показали наявність перекривання п'яти морфологічних індексів ставкової, істівної та озерної жаб у разі окремих особин, але у разі

численних вибірок середні морфологічні індекси можуть вважатися досить надійними [18]. Таким чином, морфологічний метод визначення окремих особин не є абсолютно точним. Зважаючи на це, різними дослідниками були запропоновані різноманітні генетичні методи встановлення видової приналежності.

Методом проточної цитометрії встановлено, що розмір геному *P. ridibundus* перевищує розмір геному *P. lessonae* на 16%, а геном *P. esculentus*, який утворився в результаті об'єднання геномів батьківських видів, займає проміжне положення [2, 18]. Окрім точного встановлення видової приналежності особини, цей метод дає можливість визначати плоідність геному.

Для визначення виду у зелених жаб застосовують також аналіз ізоферментів, що кодується ядерними та мітохондріальними генами. Діагностичними можуть вважатися локуси альбуміну (*Alb*), лактатдегідрогенази (*Ldh-B*), естерази (*Es-1*) й аспартатамінотрансферази (*Aat -1,-2*) [4–6].

За останнє десятиліття значного поширення набули таксономічні дослідження зелених жаб за допомогою аналізу мікросателітних послідовностей ДНК. Ядерні мікросателітні локуси високополіморфні, успадковуються кодомінантно і тому є зручним інструментом для вивчення генетичної структури популяцій. З метою вивчення цих локусів геному зелених жаб комплексу *P. ridibundus* – *P. esculentus* – *P. lessonae* були розроблені видоспецифічні праймери [16, 17, 22].

Проточна цитометрія та ізоферментний аналіз потребують відбору значної кількості біологічного матеріалу (крові, м'язової тканини), під час якого жаба гине і таким чином вилучається з популяції. На противагу цьому, аналіз мікросателітних локусів поєднує в собі точність визначення виду і можливість прижиттєвого збору проб для аналізу без завдання шкоди досліджуваній тварині [21]. На території України порівняння видів за допомогою мікросателітних послідовностей ДНК раніше не проводилось.

Метою нашої роботи було з'ясування особливостей морфометричних ознак і проведення аналізу мікросателітних послідовностей ДНК зелених жаб Львівської та Волинської областей.

Для досягнення мети були поставлені такі завдання: проаналізувати основні таксономічно важливі морфологічні ознаки та їхню мінливість (індекс F/T, мультиплікативний індекс); визначити видову приналежність особин зелених жаб за генотипами 10 мікросателітних локусів; порівняти морфометричні та генетичні результати визначення видів.

### Матеріал і методи

Матеріал відбирали у польових умовах за допомогою батрахологічного сачка. У водоймах смт Нижанковичі (Львівська обл., Старосамбірський р-н.; 49°40'34» пн.ш., 22°48'30» сх.д.) було відібрано 31 особину; водоймах орнітологічного заказника «Чолгині» (Львівська обл., Яворівський р-н.; 49°55'14» пн.ш., 23°26'11») – 42 особини; озері Пісочне (Волинська обл., Шацький р-н.; 51°27'39» пн.ш., 24°34'26» сх.д.) – 12 особин; озері Луки (Волинська обл., Шацький р-н.; 51°33'15» пн.ш., 24°20'37» сх.д.) – 9 особин. Через незначну кількість особин зелених жаб, відібраних у Шацькому національному природному парку, вибірки з озер Луки та Пісочне були об'єднані.

Морфологічній частині досліджень передувала робота з вивчення проявів мінливості зовнішніх морфологічних ознак і можливостей їх використання в еволюційно-таксономічному аналізі: *L.* (довжина тіла); *L.c.* (довжина голови); *Lt.c.* (ширина голови); *D.r.-o.* (відстань від кінця морди до ока); *D.r.-n.* (відстань від ніздрі до кінця морди); *Lt.r.* (ширина рила); *L.o.* (довжина ока); *Sp.in.* (проміжок між очима); *D.n.-o.* (відстань від ніздрі

до переднього краю ока); *Lt.p.* (ширина повіки); *Sp.ip.* (проміжок між повіками); *L.tum.* (найбільша довжина барабанної перетинки); *D.tum.-o.* (відстань від барабанної перетинки до заднього краю ока); *L.m.* (довжина передньої лапи); *Lt.m.* (ширина п'ястя); *D.p.* (довжина першого пальця передньої кінцівки); *F.* (довжина стегна); *T.* (довжина гомілки); *L.c.s.* (довжина додаткової гомілки); *Lt.c.s.* (ширина додаткової гомілки); *D.h.* (довжина першого пальця задньої кінцівки); *D.q.* (довжина четвертого пальця задньої кінцівки); *L.t.ci.* (довжина внутрішньоп'яtkового горбка); *A.t.ci.* (ширина внутрішньоп'яtkового горбка) [1, 3, 7, 11, 12, 14].

ДНК виділяли із фіксованих у 70% етиловому спирті м'язових тканин, а також із зразків епітелію ротової порожнини, зібраних на ватні палички за методикою Н. Підансьє та співавторів [21]. Для виділення використовували універсальні набори "Diatom™ DNA Prep" виробництва ООО «Лаборатория Изоген» (Росія). У результаті аналізу літературних джерел і лабораторного тестування було відібрано 10 пар праймерів для ампліфікації міросателітних локусів у зелених жаб, більшість із яких є діагностичними для визначення виду – *Rrid059*, *Rrid082*, *Rrid171* [17]; *Res5*, *Res14*, *Res16*, *Res22* [22]; *RICA1b5*, *RICA18*, *RICA19* [16]. Для проведення ПЛР використовували готові суміші реагентів із наборів для ПЛР-ампліфікації GenePak® PCR Core виробництва ООО «Лаборатория Изоген» (Росія). Електрофоретичне розділення отриманих фрагментів ДНК проводили в 6% поліакриламідному гелі, з використанням трис-ЕДТА-боратного електродного буферу (ТБЕ). Для визначення довжин фрагментів у кожну гелеву пластинку поряд із досліджуваними зразками вносили маркер довжин ДНК – плазмиду *E. coli* pBR322, оброблену ендонуклеазою рестрикції HpaII. Статистичну обробку отриманих результатів проводили у програмі GenAlEx 6.41 із використанням модуля Population Assignment [19, 20].

### Результати і їхнє обговорення

Протягом 2011–2012 років нами для аналізу морфометричних і фенотипних показників було відібрано 94 особини. Кількісне співвідношення видів для кожної вибірки наведено в табл. 1.

На підставі аналізу літературних і одержаних власних даних щодо морфологічного опису зелених жаб ми дійшли висновку, що лише співвідношення деяких із них може використовуватися під час визначення виду.

Таблиця 1

Видова приналежність зелених жаб у вибірках із водойм Західної України за морфометричними ознаками та результатами генетичного аналізу

Вид	Кількість особин, які належать до даного виду за відповідними показниками								
	Морфометричні ознаки	Аналіз міросателітних ДНК	Збіг видової приналежності*	Морфометричні ознаки	Аналіз міросателітних ДНК	Збіг видової приналежності*	Морфометричні ознаки	Аналіз міросателітних ДНК	Збіг видової приналежності*
	«Чолгині»			«Шацьк»			«Нижанковичі»		
<i>P. ridibundus</i>	20	18	14	3	5	2	31	31	31
<i>P. lessonae</i>	15	18	11	12	2	2	–	–	–
<i>P. esculentus</i>	7	6	1	6	12	6	–	–	–
Разом	42	42	26	21	19	10	31	31	31

**Примітка:** \* – збіг видової приналежності за морфометричними ознаками та результатами генетичного аналізу.

Як уже наголошувалося, не менш важливим для визначення виду є співвідношення довжини стегна (F) до довжини гомілки (T). Індекс F/T доволі часто використовується як основний критерій під час визначення видової приналежності зелених жаб. У озерної жаби стегно коротше від гомілки, тому індекс F/T є меншим від одиниці, а у ставкової – задньогомілкової зчленування заходять одне за одне, тобто індекс F/T більший від одиниці. Їстівна ж жаба характеризується проміжними даними, тобто F/T=1, і задньогомілкової зчленування торкаються одне одного [10]. Значення індексу F/T для досліджених нами жаб наведено у табл. 2.

Таблиця 2

Значення індексу F/T для зелених жаб Західної України

Вид	Територія	F/T (за морфотипом)	F/T (за генотипом)
<i>P. lessonae</i>	Чолгині	1,06	1,02
<i>P. ridibundus</i>	Чолгині	0,93	0,94
<i>P. esculentus</i>	Чолгині	0,99	0,99
<i>P. lessonae</i>	Нижанковичі	Немає вибірки	Немає вибірки
<i>P. ridibundus</i>	Нижанковичі	0,95	0,95
<i>P. esculentus</i>	Нижанковичі	Немає вибірки	Немає вибірки
<i>P. lessonae</i>	Шацьк	1,03	1,04
<i>P. esculentus</i>	Шацьк	1	1,02
<i>P. ridibundus</i>	Шацьк	0,95	0,99

Значний збіг індексу F/T з даними розподілу на групи за генотипами показує, що цей індекс можна вважати досить інформативним у визначенні виду. Визначення за допомогою цього індексу 70% особин підтвердилися і аналізом мікросателітної ДНК (табл. 1). Тобто видова приналежність 66 особин, визначена за допомогою індексу F/T, була підтверджена результатами мікросателітного аналізу.

У результаті аналізу мінливості за 10 мікросателітними локусами були встановлені індивідуальні генотипи жаб і розраховані частоти алелів у досліджених вибірках (табл. 3). Локуси *Rrid059*, *RIC1b5* і *Res22* можна вважати діагностичними для визначення виду, оскільки їхні алелі, виявлені у дослідженні, є видоспецифічними. У *P. lessonae* в локусі *Res22*, крім алелів, що ампліфікуються, виявлено «ноль»-алель, наявність якого може вплинути на точність встановлення видової приналежності. Наявність «ноль»-алелів у генотипах окремих особин пов'язана з відсутністю в їхніх геномах послідовностей ДНК, комплементарних до праймерів досліджуваного мікросателітного локусу. У генотипах особин гетерозиготних за даним локусом «ноль»-алелі можуть не виявлятися, тому зазначений локус можна використовувати лише разом з іншими діагностичними локусами. «Ноль»-алелі виявлено також у локусах *Res14* у обох видів, *Res16* – у *P. lessonae*, *Res5* – у *P. ridibundus*, а локус *RIC18* ампліфікується лише у зразках *P. lessonae* і *P. esculentus*. Виявлено спільні для обох видів алелі локусів *Rrid171*, *Res14*, *Res16* і *Res5*. Наявність неампліфікованих алелів і алелів, що трапляються у генотипах представників обох видів, не дає змоги використати більшість локусів для визначення видової приналежності, але їх високий поліморфізм дає можливість оцінити диференціацію індивідуальних генотипів.

Ми провели порівняння генотипів усіх досліджених жаб і встановили для них приналежність до генетичних груп на основі подібності. Сумарні генотипні дані з включенням вибірки *P. ridibundus* з чистої популяції Нижанкович показують досить чіткий розподіл на два батьківських види *P. ridibundus*, *P. lessonae* та перехідну генотипну групу *P. esculentus* (див. рисунок).

Таблиця 3

## Частоти алелів десяти мікросателітних локусів жаб

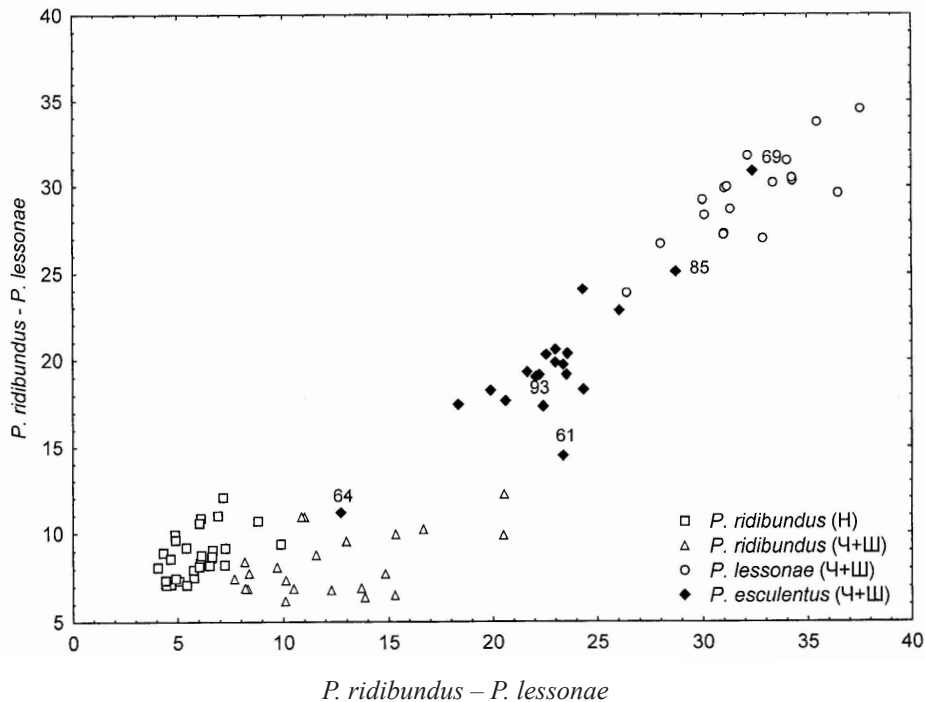
Локус	Алель	<i>P. ridibundus</i> (Н)*	<i>P. ridibundus</i> (ЧШ)	<i>P. lessonae</i> (ЧШ)	<i>P. esculentus</i> (ЧШ)	Локус	Алель	<i>P. ridibundus</i> (Н)*	<i>P. ridibundus</i> (ЧШ)	<i>P. lessonae</i> (ЧШ)	<i>P. esculentus</i> (ЧШ)		
<i>Rrid059</i>	103	0,000	0,000	1,000	0,500	<i>RICA1b5</i>	123	0,000	0,000	1,000	0,452		
	125	0,217	0,295	0,000	0,190		137	0,000	0,227	0,000	0,143		
	127	0,083	0,114	0,000	0,024		139	1,000	0,682	0,000	0,333		
	133	0,017	0,000	0,000	0,000		141	0,000	0,091	0,000	0,071		
	135	0,183	0,091	0,000	0,000		<i>Res14</i>	135	0,033	0,045	0,111	0,262	
	137	0,133	0,182	0,000	0,167			141	0,000	0,091	0,333	0,024	
	139	0,167	0,227	0,000	0,119			143	0,000	0,023	0,111	0,095	
	141	0,033	0,045	0,000	0,000			147	0,550	0,341	0,000	0,048	
	143	0,017	0,000	0,000	0,000		149	0,250	0,318	0,000	0,048		
	145	0,033	0,000	0,000	0,000		null	0,167	0,182	0,444	0,524		
	147	0,067	0,045	0,000	0,000		<i>RICA18</i>	175	0,000	0,000	0,056	0,000	
	149	0,050	0,000	0,000	0,000			181	0,000	0,000	0,222	0,071	
	<i>Rrid171</i>	173	0,000	0,023	0,056			0,000	183	0,000	0,000	0,139	0,024
		175	0,067	0,000	0,111			0,048	185	0,000	0,000	0,111	0,048
177		0,000	0,068	0,333	0,405	187	0,000	0,023	0,139	0,095			
179		0,000	0,000	0,111	0,000	191	0,000	0,000	0,167	0,429			
181		0,800	0,750	0,111	0,429	193	0,000	0,000	0,028	0,143			
183		0,000	0,000	0,111	0,024	195	0,000	0,000	0,028	0,048			
185		0,000	0,068	0,056	0,000	199	0,000	0,023	0,000	0,000			
187		0,000	0,000	0,028	0,000	null	1,000	0,955	0,111	0,143			
193		0,133	0,091	0,083	0,048	<i>Res5</i>	143	0,000	0,386	0,000	0,000		
201		0,000	0,000	0,028	0,024		145	0,000	0,068	0,083	0,048		
205		0,000	0,000	0,056	0,024		147	0,267	0,273	0,500	0,833		
117		0,267	0,250	0,000	0,738		149	0,000	0,000	0,333	0,119		
121		0,133	0,114	0,000	0,048	153	0,000	0,000	0,028	0,000			
135		0,000	0,068	0,000	0,071	167	0,000	0,000	0,056	0,000			
137	0,450	0,091	0,000	0,000	null	0,733	0,273	0,000	0,000				
139	0,100	0,000	0,000	0,048	<i>Res22</i>	91	0,050	0,455	0,000	0,000			
null	0,000	0,000	0,111	0,000		93	0,000	0,023	0,000	0,000			
120	0,017	0,182	0,000	0,000		105	0,000	0,000	0,833	0,095			
122	0,300	0,159	0,000	0,000	109	0,000	0,000	0,056	0,000				
124	0,167	0,114	0,000	0,000	<i>Rrid082</i>	163	0,200	0,182	0,139	0,095			
126	0,083	0,068	0,667	0,357		165	0,117	0,409	0,250	0,310			
128	0,000	0,000	0,000	0,048		183	0,683	0,409	0,306	0,548			
132	0,000	0,227	0,000	0,190		195	0,000	0,000	0,028	0,047			
134	0,433	0,250	0,000	0,262		201	0,000	0,000	0,028	0,000			
null	0,000	0,000	0,333	0,143		207	0,000	0,000	0,250	0,000			
<i>RICA19</i>	111	0,000	0,045	1,000	0,952								
	113	1,000	0,955	0,000	0,048								

Примітка: \* – Н – Нижанковичі, ЧШ – Чолгині + Шацьк сумарно.

У результаті проведеного аналізу наявності певних алелів за 10 мікросателітними локусами зразки № 40, 50, 51, 53, 73, визначені морфологічно як *P. lessonae*, і № 62, 66, 74 визначені як *P. esculentus*, були віднесені до *P. ridibundus*; зразки *P. ridibundus* № 59, 79, 81, 82 і *P. esculentus* № 44, 60, 63 – до *P. lessonae*; зразки *P. lessonae* № 54, 57, 58, 89, 93 і *P. ridibundus* № 55, 85 – до *P. esculentus*. Слід зазначити, що генотипи зразків 61 і 64 за діагностичним локусом *Rrid059A* повністю відповідали *P. ridibundus*, але за локусом *RICA1b5* у них, крім варіанта властивого для *P. ridibundus*, був виявлений алель 123, характерний для *P. lessonae*. Екземпляр № 93, визначений за генотипом *RICA1b5* як *P. ri-*



*dibundus*, у генотипі *Rrid059A* має один із алелів від *P. lessonae*. Зразки 69 і 85 відповідали *P. lessonae* за генотипом локусу *Rrid059A*, але в локусі *RIC1b5* один із алелів у кожного з них був від *P. ridibundus*. При розподілі генотипів за всіма десятьма локусами зразок 64 потрапляє до групи озерних жаб, зразки 61 і 93 – до їстівних жаб, № 85 – до групи проміжної між їстівною та ставковою жабами, а зразок 69 потрапляє до групи ставкових жаб (див. рисунок).



Розподіл зелених жаб на підставі аналізу їх генотипів за мікросателітними локусами: Н – Нижанковичі, Ч+Ш – Чолгині та Шацьк.

Характер розподілу генотипів за подібністю показує, що у гібридних популяціях зелених жаб існують не тільки чисті види *P. ridibundus*, *P. lessonae*, але й ціла низка перехідних гібридних форм, які за морфологічними рисами можуть відхилятися в бік одного з батьківських видів. За літературними даними, відома можливість нерівноцінного об'єднання генотипів *P. ridibundus* і *P. lessonae* у геномах *P. esculentus* [9]. Відхилення ознак гібридів у бік одного з батьківських видів може бути зумовлене розщепленням ознак у гаметогенезі гібридних особин, що виявляється під час схрещування гібридів між собою і з особинами батьківських видів, оскільки всі вони присутні у популяціях «Чолгинь» і «Шацька». Однак дане припущення потребує докладної перевірки, оскільки при геміклональному успадкуванні рекомбінації генотипів не відбувається.

Таким чином, на основі отриманих даних можна зробити висновок, що найбільш важливими для визначення виду зелених жаб з-поміж морфологічних ознак та індексів є характер стику гомілкових зчленувань (індекс F/T). Аналіз мікросателітних послідовностей ДНК підтвердив точність встановлення видової приналежності за цим індексом у 70% випадків. За характером забарвлення черева та горла зелених жаб також можна встановити видову приналежність особин, проте зі значно меншою достовірністю. Зокрема, темне

забарвлення горла характерне для *P. ridibundus* (у 31,9% випадків у наших дослідженнях), світле горло і черево для *P. lessonae* (у 19% випадків). На підставі аналізу мікросателітних послідовностей ДНК вдалося визначити певні генетичні локуси, які дають можливість встановити видову приналежність особин зелених жаб зі значно більшою достовірністю, ніж з використанням морфологічних і морфометричних критеріїв. Особливо цінними у діагностиці є локуси *Rrid059A*, *RIcA1b5* та *Res22*, у яких виявлені унікальні алелі, характерні для кожного виду зокрема. У генотипі *P. esculentus* наявні алелі від обох чистих видів і немає своїх унікальних варіантів.

Роботу виконано за часткової фінансової підтримки підпрограми «Динаміка і збереження генофондів» програми фундаментальних досліджень Президії РАН «Жива природа: сучасний стан і проблеми розвитку».

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Банников А. Г., Даревский И. С., Ищенко В. Г. и др. Определитель земноводных и пресмыкающихся фауны СССР: учеб. пособие для студентов биол. специальностей пед. ин-тов. М.: Просвещение, 1977. 415 с.
2. Боркин Л. Я., Виноградов А. Е., Розанов Ю. М., Цауне И. А. Полуклональное наследование в гибридогенном комплексе *Pelophylax esculentus*: доказательство методом проточной ДНК-цитометрии // Докл. АН СССР. 1987. Т. 295. № 5. С. 1261–1264.
3. Ищенко В. Г. Динамический полиморфизм бурых лягушек фауны СССР. М.: Наука, 1978. С. 116–123.
4. Межжерин С. В., Песков В. Н. Биохимическая изменчивость и генетическая дифференциация популяций озерной лягушки *Rana ridibunda* Pall. // Цитология и генетика. 1992. Т. 26. № 1. С. 43–48.
5. Межжерин С. В., Морозов-Леонов С. Ю., Некрасова О. Д. и др. Эволюционно-генетические аспекты полуклонального воспроизводства гибридной формы кл. *esculenta* (*Amphibia*) // Наук. вісн. Ужгород. ун-ту. Сер. біол. 2007. Вип. 21. С. 79–84.
6. Межжерин С. В., Морозов-Леонов С. Ю., Некрасова О. Д. и др. Генетическая структура гибридных поселений и морфометрия зеленых лягушек комплекса *Rana esculenta* L., 1758 Западноукраинского региона // Наук. вісн. Ужгород. ун-ту. Сер. біол. 2009. Вип. 26. С. 5–12.
7. Некрасова О. Д. Структура популяцій та гібридизація зелених жаб *Rana esculenta* complex урбанізованих територій Середнього Придніпров'я: автореф. дис. ... канд. біол. наук. К., 2002. 19 с.
8. Некрасова О. Д., Морозов-Леонов С. Ю. Диагностика лягушек комплекса *Rana esculenta* (*Amphibia*, *Ranidae*) в гибридных популяциях Приднепровья // Вестн. зоологии. 2001. Т. 35. № 5. С. 45–50.
9. Лада Г. А. Среднеевропейские зеленые лягушки (гибридогенный комплекс *Rana esculenta*): введение в проблему // Флора и фауна Черноземья. Тамбов, 1995. С. 88–109.
10. Писанець С. М. Земноводні України. К.: Вид-во Раєвського, 2007. 192 с.
11. Пащенко Ю. Й. Визначник земноводних та плазунів УРСР. К.: Радянська школа, 1955. 148 с.
12. Таращук В. І. Земноводні та плазуни. Фауна України. Т.7. К.: Вид-во АН УРСР, 1959. 246 с.
13. Таращук С. В. К методике определения европейских зеленых лягушек группы *Rana esculenta* (*Amphibia*, *Anura*) // Вестн. зоологии. 1985. 3. С. 83–85.

14. Таращук С. В. Схема морфометрической обработки представителей настоящих лягушек (Ranidae) // Руководство по изучению земноводных и пресмыкающихся. К., 1989. С. 73–74.
15. Berger L. Systematyka żab zielonych // Przegl. zool. 1969. Vol. 13. N 3. S. 219–238.
16. Garner T. W. J., Gautschi B., Rothlisberger S., Reyer H.-U. A. Set of CA repeat microsatellite markers derived from the pool frog, *Rana lessonae* // Molecular Ecology. 2000. Vol. 9. P. 2155–2234.
17. Hotz H., Uzzel T., Guex G.-D. et al. Microsatellites: a tool for evolutionary genetic studies of western Palearctic water frogs // Mitt. Mus. Nat.kd. Berl., Zool. Reihe. 2001. Vol. 77. N 1. P. 43–50.
18. Lada G. A., Borkin L. J., Vinogradov A. E. Distribution, population systems and reproductive behavior of green frogs (hybridogenetic *Rana esculenta* complex) in the Central Chernozem Territory of Russia // Russian J. Herpetol. 1995. Vol. 2. № 1. P. 46–57.
19. Peakall R., Smouse P. E. GenAlEx V6: Genetic Analysis in Excel. Population Genetic Software for Teaching and Research // Molecular Ecology Notes. 2006. Vol. 6. N 1. P. 288–295.
20. Peakall R., Smouse P. E. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update // Bioinformatics. 2012. Vol. 28. P. 2537–2539.
21. Pidancier N., Miquel C., Miaud C. Buccal swabs as a non-destructive tissue sampling method for DNA analysis in amphibians // Herpetological J. 2003. Vol. 13. P. 175–178.
22. Zeisset I., Rowe G., Beebee T. J. C. Polymerase chain reaction primers for microsatellite loci in the north European water frogs *Rana ridibunda* and *R. lessonae* // Molecular Ecology. 2000. Vol. 9. P. 1171–1193.

Стаття: надійшла до редакції 30.05.13

доопрацьована 16.10.13

прийнята до друку 30.10.13

## MORPHOLOGICAL AND GENETIC POLYMORPHISM OF GREEN FROGS (*PELOPHYLAX*) IN WATER BODIES OF WESTERN UKRAINE

V. Stakh<sup>1</sup>, M. Belokon<sup>2</sup>, I. Khamar<sup>1</sup>, Yu. Belokon<sup>2</sup>, O. Reshetylo<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Ivan Franko National University of Lviv  
4, Hrushevskiy St., Lviv 79005, Ukraine

<sup>2</sup>Vavilov Institute of General Genetics RAS  
3, Gubkin St., Moscow 119991, Russia

<sup>3</sup>Institute of Ecology of the Carpathians, NAS of Ukraine  
4, Kozelnytska St., Lviv 79026, Ukraine

e-mail: vstax\_77@mail.ru

The problem of species differentiation of green frogs is connected to the hybrid type of *Pelophylax esculentus* reproduction. The hybrid has got genes of both parents: Marsh frog *Pelophylax ridibundus* and Pool frog *Pelophylax lessonae*. There was established that the four investigated individuals are typical example of hemiclinal inheritance, and their location is not determined by geographical conditions. Based on comparison of genetic and morphological analyses it was ascertained that using F/T index is the optimal way to deter-

mine the species of green frog in the field. The accuracy of green frogs' determination using this index is 70%.

*Keywords:* klepton, microsatellite loci, Marsh frog, Pool frog, Edible frog, Western Ukraine.

## МОРФОЛОГИЧЕСКИЙ И ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ ЗЕЛЕННЫХ ЛЯГУШЕК (*PELOPHYLAX*) ВОДОЕМОВ ЗАПАДНОЙ УКРАИНЫ

В. Стах<sup>1</sup>, М. Белоконь<sup>2</sup>, І. Хамар<sup>1</sup>, Ю. Белоконь<sup>2</sup>, О. Решетило<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Львовский национальный университет имени Ивана Франко  
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина

<sup>2</sup>Институт общей генетики имени Н. И. Вавилова РАН  
ул. Губкина, 3, Москва 119991, Россия

<sup>3</sup>Институт экологии Карпат НАН Украины  
ул. Козельницкая, 4, Львов 79026, Украина  
e-mail: vstax\_77@mail.ru

Проблема видового определения зеленых лягушек связана с гибридным способом воспроизведения особей *Pelophylax esculentus*. Гибрид несет гены обоих родителей: озерной лягушки *Pelophylax ridibundus* и прудовой лягушки *Pelophylax lessonae*. Было установлено, что четыре из исследуемых особей являются типичным примером гемиклонального наследования, а их локализация не обусловлена географическими условиями. Сравнив данные генетического и морфологического анализов, установили, что при определении вида особей зеленых лягушек в полевых условиях оптимальным является использование индекса F/T. С его помощью точность определения особей зеленых лягушек до вида составляет 70%.

*Ключевые слова:* клеpton, микросателлитные локусы, лягушка озерная, лягушка прудовая, лягушка съедобная, Западная Украина.

## ХАРАКТЕРИСТИКА ІХТІОФАУНИ КОЛЕКТОРА НА Р. НИВКА (М. КИЇВ)

Д. Медовник\*, В. Алексієнко

Київський національний університет імені Тараса Шевченка  
вул. Володимирська, 64, Київ 01601, Україна  
e-mail: fallen91@meta.ua

У колекторі на річці Нивка виявлено 8 видів риб, серед яких траплялися, зокрема, чебачок амурський (*Pseudorasbora parva* (Temminck and Schlegel), 1846) – 44%, пічкур звичайний (*Gobio gobio* (L.), 1758) – 31% і карась сріблястий (*Carassius gibelio* (Bloch), 1782) – 23%. Морфометричний аналіз пластичних ознак із високим ступенем вірогідності ( $P < 0,95$ ) показав достовірні відмінності пічкурів з колектора на р. Нивка та з р. Дніпро за 15 ознаками з 23.

*Ключові слова:* колектор, риба, Київ.

Багато малих річок, що протікають територією великих міст, закриті колекторами і поповнюються стічними водами. У частині з них трапляються представники іхтіофауни, пристосовані до екстремальних умов. Дослідження видового складу риб і їхніх екологічних особливостей мають суттєве значення для оцінки антропогенного впливу на екосистеми малих річок.

### Матеріали та методи

Дослідження проводили з березня 2011 р. по березень 2012 р. в колекторі на р. Нивка (права притока р. Ірпінь). Річка має довжину близько 20 км і бере початок у м. Києві та має два колектори – на початку й у середній частині. У першому колекторі риби не виявлено, на відміну від другого, який починається у Святошинському р-ні м. Києва і закінчується біля с. Софіївська Борщагівка (рис. 1). Довжина його становить близько 3 км, висота – 2,5 м, ширина – 4 м. Для проведення досліджень у колекторі було обрано 10 дослідних ділянок площею по 100 м<sup>2</sup>, на яких проведено 10 обстежень (20.03.11, 07.05.11, 08.06.11, 12.08.11, 25.09.11, 23.10.11, 27.11.11, 24.12.11, 29.01.12 та 25.03.12). Під час цих обстежень вловили 1981 екз. риб за допомогою підсаки діаметром 40 см і розміром вічка 3 мм. Збір матеріалу проводили на дослідних ділянках, просуваючись уздовж колектора проти течії та вимірюючи температуру води, глибину і швидкість течії. Дані гідрологічні умови були виміряні згідно із загально визнаними методиками [3]. Глибину вимірювали металевією рулеткою – по п'ять промірів з інтервалом 1 м на початку кожної ділянки, по умовній лінії, перпендикулярній напрямку колектора. Температуру води вимірювали термометром. Швидкість течії вимірювали, пускаючи пінопластовий поплавок уздовж натягнутої рулетки (10 м) і заміряючи час, за який поплавок проходить цю відстань. У подальшому враховували середньоарифметичне цих значень. Визначені мінімальні (min), максимальні (max) та середньоарифметичні (X) значення даних показників для кожної з ділянок. Риб визначали та вимірювали загально визнаними методами [1, 4, 6, 7]. За стандартною методикою [2] проведено повний морфометричний аналіз одного з численних видів – 31 особини пічкура звичайного.



Рис. 1. Розміщення Борщагівського колектора: А – місце витікання р. Нивка в колектор, Б – місце витікання р. Нивка з колектора.

### Результати і їхнє обговорення

Обстеження колектора (рис. 2) показало, що глибина і температура води в ньому зменшувалися вгору проти течії, а швидкість течії коливалась у межах 0,30–0,47 м/с (табл. 1). Вплив на температуру води мали скиди з міської тепломережі, які суттєво підвищували середню температуру в нижній частині колектора. У січні температура зростає від 2°C у найвищій за течією ділянці (№10) до 16°C у найнижчій (№1). У червні ці значення становили відповідно 24 та 26°C, а поблизу місць скиду з тепломережі температура води сягнула 30°C. У колектор практично не потрапляє сонячне світло (візуально сприймається як повна темрява), немає вищої рослинності.

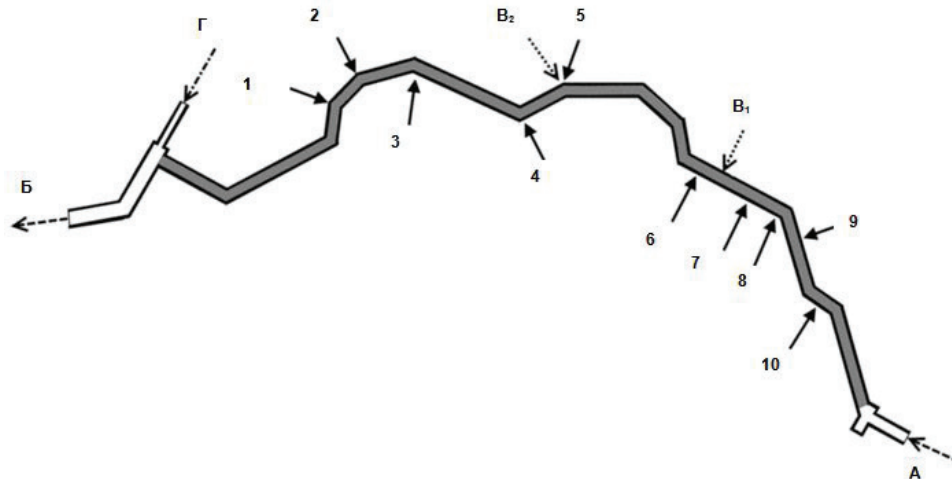


Рис. 2. Схема Борщагівського колектора на р. Нивка: А, Б – початок і кінець підземної частини русла; В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub> – місця витікання гарячої води з міської тепломережі; Г – місце впадіння р. Желань; 1–10 – початки відміру дослідних ділянок довжиною по 25 м.



За період досліджень у колекторі виловлено 1981 екз. риби, які належать до 8 видів і 4 родин (табл. 2). Переважали в уловах чебачок (44%), пічкур (31%) і карась (23%). Їхня стандартна довжина становила в середньому 5,0 (від 1,1 до 8,4) см, 6,9 (2,1–14,0) см та 7,3 (3,5–14,4) см. Інші види траплялися поодинокі і сумарно становили 1% улову. Протягом року чисельність риби, виловленої у колекторі за час одного обстеження, коливалася від 57 (серпень) до 343 екз. (вересень). Найбільшу кількість риби вловили на ділянці №4 (480 екз.), де спостерігали постійні скиди теплих вод, а найменшу кількість – на ділянці №7 (40 екз.).

З верхньої відкритої частини р. Нивка риба заходила у колектор і чисельність її поступово зменшувалася від ділянки №10 (149 екз.) до ділянки №7, що пов'язано з малими глибинами та зниженням температури води (табл. 1) у колекторі до ділянки №6, де починаються скиди води з тепломереж міста. Результати морфометричного аналізу пічкура з колектора на р. Нивка та порівняння його за пластичними ознаками з пічкуром з р. Дніпро [5] представлені у табл. 3.

Таблиця 1

## Гідрологічні умови у колекторі на р. Нивка

Ділянка	Глибина, см			Температура води, °С			Швидкість течії, см/с		
	min	max	X	min	max	X	min	max	X
1	12	20	16	10	26	16	0,24	0,4	31
2	11	20	16	10	26	16	0,23	0,44	32
3	7	23	15	10	23	15	0,26	0,66	39
4	6	25	13	9	34	17	0,24	0,76	47
5	6	14	11	8	27	15	0,22	0,55	42
6	12	20	16	7	24	15	0,14	0,63	30
7	5	15	9	6	26	14	0,22	0,52	40
8	4	12	8	2	26	12	0,28	0,59	42
9	4	10	7	2	24	12	0,25	0,78	39
10	6	10	7	2	24	11	0,2	0,63	40

Примітка. X – середньоарифметичне значення.

Таблиця 2

## Видовий склад і кількість відловлених екземплярів риби із колектора на р. Нивка

Родини, види	Кількість риби на ділянках (№№1–10), екз.										Разом
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
<b>Родина Коропові (Cyprinidae)</b>											
Чебачок амурський ( <i>Pseudorasbora parva</i> (Temminck and Schlegel), 1846)	58	128	67	212	72	79	22	49	80	111	878
Пічкур звичайний ( <i>Gobio gobio</i> (Linnaeus), 1758)	81	58	89	171	95	72	15	8	23	12	624
Карась сріблястий ( <i>Carassius gibelio</i> (Bloch), 1782)	58	57	44	95	65	59	3	44	10	26	461
Краснопірка звичайна ( <i>Scardinius erythrophthalmus</i> (Linnaeus), 1758)	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
Гірчак європейський ( <i>Rhodeus amarus</i> (Bloch), 1782)	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
<b>Родина Окуневі (Percidae)</b>											
Окунь річковий ( <i>Perca fluviatilis</i> , Linnaeus, 1758)	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	2
<b>Родина Головешкові (Odontobutidae)</b>											
Ротань головешка ( <i>Perccottus glenii</i> , Dybowski, 1877)	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	4
<b>Родина Колючкові (Gasterosteidae)</b>											
Колючка триголкова ( <i>Gasterosteus aculeatus</i> (Linnaeus), 1758)	0	0	0	0	8	2	0	0	0	0	10
<b>Усього:</b>	198	243	201	480	241	215	40	101	113	149	1981

Пічкур із колектора на р. Нивка був представлений особинами, більшими за розмірами, ніж у р. Дніпро (8,9 см проти 7,4 см). За кількістю лусок у бічній лінії та кількістю розгалужених променів у плавцях відмінностей між ними не зареєстровано. Значення таких пластичних ознак, як довжина голови (с), найбільша висота тіла (Н), товщина (іН), антедорзальна відстань (аD), висота анального плавця (hA), висота голови

біля потилиці (hc) та позаочна відстань (po), у пічкурів із колектора з високим ступенем вірогідності переважали такі у пічкурів з р. Дніпро. Натомість за вентроанальною відстанню (VA), довжиною основи спинного плавця (ID), довжиною основи анального плавця (IA), довжиною грудного плавця (IP), довжиною черевного плавця (IV), довжиною верхньої та нижньої лопатей хвостового плавця (IC<sub>1</sub> і IC<sub>2</sub>) та довжиною вусиків (сіг), пічкурі з колектора з високим ступенем вірогідності поступалися пічкурам з р. Дніпро. За іншими пластичними ознаками вірогідних відмінностей не знайдено. Суттєві відмінності пластичних ознак пічкурів із колектора та р. Дніпро можна пояснити значними відмінностями умов їх існування.

Таблиця 3

Порівняння деяких пластичних ознак пічкурів із колектора на р. Нивка та з р. Дніпро [5]

Ознака	р. Дніпро, n=35		Колектор на р. Нивка, n=31		T <sub>st</sub>
	M	±m	M	±m	
l, см	7,4	0,11	8,9	1,78	P<0,05
У % від стандартної довжини (l):					
c	24,75	0,16	26,23	0,19	<b>6,040769</b>
H	18,9	0,12	21,42	0,27	<b>8,524667</b>
h	8,01	0,11	8,31	0,07	2,233208
iH	12,98	0,17	16,99	0,32	<b>11,2139</b>
aD	45,7	0,23	47,58	0,23	<b>5,729704</b>
pD	42,35	0,33	41,29	0,43	-1,95533
pl	22,98	0,24	21,99	0,36	-2,26724
aA	69,49	0,25	68,98	0,19	-1,60624
PV	24,01	0,29	24,71	0,24	1,856247
VA	22,66	0,2	20,94	0,17	<b>-6,56811</b>
ID	13,12	0,17	11,63	0,14	<b>-6,77749</b>
hD	18,92	0,19	18,84	0,31	-0,22496
IA	7,61	0,09	7,07	0,14	<b>-3,14456</b>
hA	13,01	0,18	15,08	0,13	<b>9,302598</b>
IP	19,52	0,18	16,99	0,21	<b>-9,25213</b>
IV	15,98	0,14	14,33	0,12	<b>-8,91545</b>
IC <sub>1</sub>	19,51	0,33	16,71	0,18	<b>-7,49061</b>
IC <sub>2</sub>	18,46	0,35	16,46	0,21	<b>-4,89891</b>
У % від довжини голови (с):					
hc	56,41	0,64	66,10	0,51	<b>11,84346</b>
o	23,07	0,36	23,62	0,36	1,087278
po	38,29	0,42	41,50	0,44	<b>5,253204</b>
r	38,21	0,42	37,70	0,45	-0,83713
сіг	22,75	0,41	16,63	0,40	<b>-10,7326</b>

**Примітка.** M – середнє арифметичне; ±m – середня помилка; T<sub>st</sub> – критерій Стюдента; p – рівень вірогідності за пороговим значенням – 2,66. Ознаки: l – стандартна довжина тіла; c – довжина голови; H – найбільша висота тіла; h – найменша висота тіла; iH – товщина тіла у місці найбільшої висота тіла; aD – антедорзальна відстань; pD – постдорзальна відстань; pl – довжина хвостового стебла; aA – антеанальна відстань; PV – пектровентральна відстань; VA – вентроанальна відстань; ID – довжина основи спинного плавця; hD – висота спинного плавця; IA – довжина основи анального плавця; hA – висота анального плавця; IP – довжина грудного плавця; IV – довжина черевного плавця; IC<sub>1</sub> – довжина верхньої лопаті хвостового плавця; IC<sub>2</sub> – довжина нижньої лопаті хвостового плавця; hc – висота голови; o – діаметр ока; po – позаочна відстань; r – довжина рила; сіг – довжина вусиків.

Отже, у колекторі на р. Нивка відмічено 8 видів риб, серед яких чебачок амурський (44% від загальної чисельності), пічкур звичайний (31%) і карась сріблястий (23%). Інші види траплялися поодинокі. Морфометричний аналіз пічкура з колектора порівняно з пічкуром із р. Дніпро з високим ступенем вірогідності (p<0,05) показав різницю за 15 ознаками з 23, що може бути пов'язано з відмінностями їх умов існування (зокрема, з низькою освітленістю в колекторі та відсутністю вищих водяних рослин).

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Алексієнко В. Р. Іхтіологія: посібник для студ. біол. ф-тів. К.: Укр. фітосоціол. центр, 2010. 116 с.
2. Алексієнко В. Р., Подобайло А. В. Методичні вказівки до вивчення іхтіології (розділ “Морфометричний аналіз риб”) для студентів біологічного факультету. К.: ВЦ “Київський університет”, 1998. 36 с.
3. Быков В. Д., Васильев А. В. Гидрометрия. Л.: Гидрометеиздат, 1972. 448 с.
4. Мовчан Ю. В. Риби України. К.: Золоті ворота, 2011. 444 с.
5. Мовчан Ю. В., Смірнов А. І. Коропові. Ч. 1. Плітка, ялець, гольян, краснопірка, амур, білизна, верховка, лин, чебачок амурський, підуст, пічкур, марена // Фауна України. К.: Наук. думка, 1981. Т. 8. Риби. Вип. 2. 423 с.
6. Лакін Г.Ф. Биометрия: учеб. пособие для биол. спец. вузов. 4-е изд., перераб. и доп. М.: Высшая школа, 1990. 352 с.
7. Правдин И. Ф. Руководство по изучению рыб (преимущественно пресноводных). 4-е изд., перераб. и доп. / под ред. П.А. Дрягина, В.В. Покровского. М.: Пищевая пром-сть, 1966. 375 с.

Стаття: надійшла до редакції 28.02.13

доопрацьована 30.09.13

прийнята до друку 07.10.13

## CHARACTERISTIC OF THE ICHTHYOFAUNA OF SEWER ON THE RIVER NYVKA

D. Medovnyk\*, V. Aleksienko

Taras Shevchenko National University of Kyiv  
64, Volodymyrska St., Kyiv 01601, Ukraine  
e-mail: fallen91@meta.ua

Eight fish species were found from the intercepting sewer on the river Nyvka, including *Pseudorasbora parva* (Temminck and Schlegel), 1846 – 44% of total, Common gudgeon (*Gobio gobio* (L.), 1758) – 31% and Prussian carp (*Carassius gibelio* (Bloch), 1782) – 23%. Two gudgeon populations (from a sewer and from Dnepr River) significantly differ in 15 of 23 studied morphometric characters.

Keywords: sewer, fish, Kyiv.

## ХАРАКТЕРИСТИКА ИХТИОФАУНЫ КОЛЛЕКТОРА НА Р. НИВКА (Г. КИЕВ)

Д. Медовник, В. Алексеенко

Київський національний університет імені Тараса Шевченка  
ул. Владимирская, 64, Киев 01601, Украина  
e-mail: fallen91@meta.ua

В коллекторе на речке Нивка обнаружено 8 видов рыб, среди которых чебачок амурский (*Pseudorasbora parva* (Temminck and Schlegel), 1846) – 44% от общей численности, пескарь обыкновенный (*Gobio gobio* (L.), 1758) – 31% и карась серебристый (*Carassius gibelio* (Bloch), 1782) – 23%. Морфометрический анализ пластических признаков с высокой степенью вероятности ( $P < 0,95$ ) показал достоверные отличия пескарей из коллектора и р. Днепр по 15 признакам из 23.

Ключевые слова: коллектор, рыба, Киев.

**ВИДОВИЙ СКЛАД І ПОШИРЕННЯ КЛІЩІВ РОДУ *UNIONICOLA*  
(ACARI: HYDRACARINA: UNIONICOLIDAE) – ПАРАЗИТІВ ПЕРЛІВНИЦЕВИХ  
(MOLLUSCA: BIVALVIA: UNIONIDAE) У РІЧКОВИХ БАСЕЙНАХ УКРАЇНИ**

**Т. Шевчук**

*Житомирський державний університет імені Івана Франка  
вул. Велика Бердичівська, 40, Житомир 10008, Україна  
e-mail: tetyana\_shevchuk5@ukr.net*

У перлівницевих із річкових басейнів України виявлені шість видів кліщів роду *Unionicola* Haldeman, 1842: *U. upsilophora* Bonz, 1783, *U. intermedia* Koenike, 1882, *U. bonzi* Claparede, 1869, *U. aculeata* Koenike, 1980, *U. crassipes* Müller, 1776, *U. hankoi* Szalay, 1927. У 32% станцій збору на тілі моллюсків був відзначений *U. bonzi*, у 28% – *U. aculeata*, значно рідше траплялися *U. crassipes* (13%) і *U. hankoi* (5%). Найбільше видове багатство кліщів роду *Unionicola* характерне для басейнів Прип'яті та Дніпра, а найменше – Західного Бугу. Перлівницеві, інвазовані кліщами роду *Unionicola*, у 75–100% випадків траплялись у водоймах сповільненого режиму, менше – у річках (67%).

*Ключові слова:* *Unionicola*, поширення, перлівницеві, річкові басейни України.

В умовах незадовільного екологічного стану водойм через антропогенний вплив в Україні різко скоротилася щільність населення популяцій перлівницевих – прісноводних двостулкових моллюсків, які відіграють істотну роль в очищенні гідроценозів [5]. Однак не виключено, що однією з причин вимирання цієї групи тварин є паразитування в них кліщів роду *Unionicola* Haldeman, 1842. Живлячись тканинами м'якунів, водяні кліщі викликають запальну реакцію і цим самим завдають їм неабиякої шкоди [10–12]. Деякі дослідники спостерігали їх у Європі, Азії, Африці, Північній Америці [6, 12, 14–17]. В Україні ж цілеспрямовані дослідження щодо поширення кліщів роду *Unionicola* – паразитів перлівницевих не проводилися, що й обумовило вивчення цих тварин на даній території.

**Матеріали та методи**

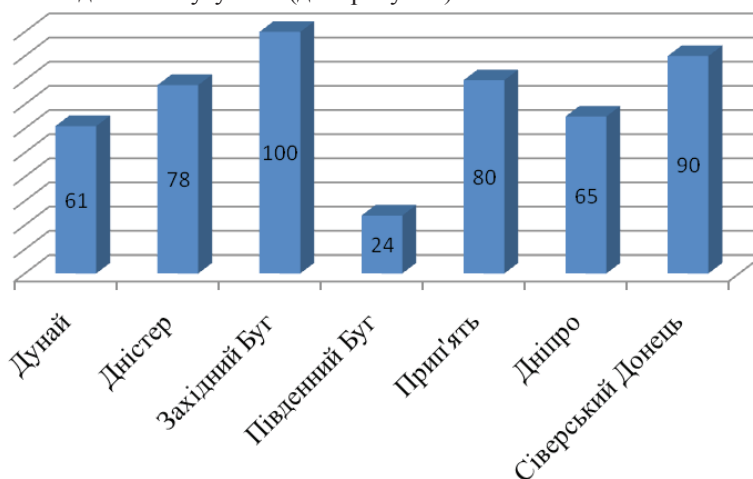
Збори матеріалу проводили у 2009–2012 рр. Загалом було обстежено 258 станцій. У 118 із них були виявлені перлівницеві, зокрема: в басейні Дунаю у 18 із 45 станцій, Дністра – 9 із 26, Західного Бугу – 5 із 18, Південного Бугу – 13 із 31, Прип'яті – 15 із 20, Дніпра – 43 із 64, Сіверського Дінця – 10 із 15, річках Криму – 5 із 34. У річках Приазов'я (5 станцій дослідження) перлівницеві не виявлені. Збір, транспортування й утримування живих перлівницевих здійснювали за загальноприйнятими методиками [7]. Проводили видову ідентифікацію перлівницевих [1, 13] і водяних кліщів [6, 8, 14, 16]. Виготовлення постійних препаратів із тіла кліщів здійснювали за стандартною методикою [9]. Частоту трапляння паразита розраховували як виражене у відсотках співвідношення кількості станцій, де виявлені заражені ним перлівницеві, до загальної кількості обстежених станцій з моллюсками [4]. Слід відзначити, що видовий склад і частоту трапляння кліщів роду *Unionicola* визначали тільки у станціях з інвазованими перлівницевими. Усього оброблено 4323 екз. моллюсків і 3550 екз. кліщів.

**Результати і їхнє обговорення**

За результатами проведених досліджень, у двостулкових моллюсках *Unio tumidus* Philipsson, 1788, *U. pictorum* Linnaeus, 1758, *U. crassus* Philipsson, 1788, *Anodonta anati-*  
© Шевчук Т., 2014

*na* Linnaeus, 1758, *A. cygnea* Linnaeus, 1758, *Pseudanodonta complanata* Rossmässler, 1835, *Sinanodonta woodiana* Lea, 1834 були виявлені шість видів кліщів роду *Unionicola*: *U. ypsilon* Bonz, 1783, *U. intermedia* Koenike, 1882, *U. bonzi* Claparede, 1869, *U. aculeata* Koenike, 1980, *U. crassipes* Müller, 1776, *U. hankoi* Szalay, 1927. Водяні кліщі роду *Unionicola* були виявлені на тілі перлівницевих у всіх річкових басейнах України, крім річок Криму. Варто зазначити, що в досліджених водоймах Приазов'я (р. Молочна, р. Токмак, р. Кальміус, Миколаївське водосховище, Донецьке море) перлівницеві не були виявлені, що, ймовірно, пов'язано з негативними змінами гідрохімічних і гідрологічних показників, які призводять до збіднення видового різноманіття малакоценозів [2].

Найчастіше перлівницеві, заражені кліщами роду *Unionicola*, траплялись у басейні Західного Бугу – 100% станцій, у яких виявлені уніоніди, та Сіверського Дінця – 90, рідше – Дунаю – 61 та Південного Бугу – 24 (див. рисунок).



Відсоток (%) пунктів у річкових басейнах України, в яких були виявлені перлівницеві, заражені кліщами роду *Unionicola*.

Для більш детального аналізу досліджені водойми були розділені на кілька типів за їхніми характеристиками: річки, канали, ставки, водосховища, лимани й озера. Окремі типи водойм значною мірою відрізнялись як за видовим складом, так і за показниками частоти трапляння водяних кліщів роду *Unionicola* у перлівницевих України.

Наприклад, у басейні Дунаю молюски, інвазовані водяними кліщами, відзначені у 7 (50%) з 14 річок, де були виявлені перлівницеві, у трьох каналах Кілійської дельти, а також у ставку (с. Оріховиця, Івано-Франківська обл.). Слід відзначити, що частота трапляння різних видів кліщів роду *Unionicola* – паразитів уніонід – неоднакова. Так, найчастіше траплялися *U. bonzi* (вид виявлений у 33% станцій, де відзначені перлівницеві), дещо менше – *U. ypsilon* (28), *U. intermedia* та *U. aculeata* (біля 11%).

У басейні Дністра перлівницеві були інвазовані водяними кліщами у трьох із п'яти річок. Інфіковані молюски виявлені також у Бурштинському водосховищі (м. Бурштин, Івано-Франківська обл.), Дністровському лимані (с. Красна коса та с. Сухолужжя, Одеська обл.) і ставку (м. Калуш, Івано-Франківська обл.). В уніонідах із водойм і водотоків цього басейну зареєстровано п'ять видів кліщів роду *Unionicola*, а саме: *U. ypsilon*, *U. intermedia*, *U. bonzi*, *U. aculeata* та *U. crassipes*. Найбільша частота трапляння характерна для *U. intermedia* (вид виявлений у 44% станцій, де відмічені перлівницеві) та *U. aculeata* (44%), а найменша – *U. crassipes* (11%).

Для водойм і водотоків басейну Західного Бугу характерна низька частота трапляння перлівницеви (27%). Ймовірно, причиною цього є негативний екологічний стан басейну Західного Бугу [3]. До речі, в усіх водоймах, де були виявлені уніоніди, а саме: озерах Люцимер (сmt Шацьк Волинської обл.), Пісочне (с. Любохони Волинської обл.), Пульмо (с. Залісся Волинської обл.), річці Кам'янка (сmt Кам'янка-Бузька Львівської обл.) та Добротвірському водосховищі (сmt Добротвір Львівської обл.), були знайдені молюски, інвазовані кліщами роду *Unionicola*. Хоча паразитували в уніонідах лише три види: *U. ypsilophora*, *U. bonzi* та *U. aculeata* (див. таблицю).

Кількість станцій (%) у річкових басейнах України, де були виявлені перлівниці, інвазовані кліщами роду *Unionicola*

Види кліщів	Річкові басейни							
	Дунай	Дністер	Західний Буг	Південний Буг	Прип'ять	Дніпро	Сіверський Донець	Загалом
<i>U. ypsilophora</i> Bonz, 1783	28	22	20	8	47	21	20	23
<i>U. intermedia</i> Koenike, 1882	11	44	–	39	20	14	30	20
<i>U. bonzi</i> Claparede, 1869	33	22	20	15	40	33	70	32
<i>U. aculeata</i> Koenike, 1980	11	44	40	39	20	37	10	28
<i>U. crassipes</i> Müller, 1776	–	11	–	–	13	21	30	13
<i>U. hankoi</i> Szalay, 1927	–	–	–	–	13	9	–	5

Примітка. Вид не відзначений у перлівницеви – «–».

У 9 (69%) із 13 річок басейну Південного Бугу були виявлені молюски, заселені паразитами. У 39% цих станцій на тілі перлівницеви зареєстровано *U. intermedia*, 39 – *U. aculeata*, лише в 8 – *U. ypsilophora*.

Проведені дослідження показали, що в басейні Прип'яті перлівниці були інфіковані паразитами: зокрема, в 11 (79%) з 14 річок й у ставі, що збудований на р. Деревичка (с. Великі Деревичі, Житомирська обл.). У межах даного басейну поширені всі шість видів кліщів роду *Unionicola* (див. таблицю).

Молюски, інвазовані кліщами, були виявлені й у 25 (68%) із 37 річок басейну Дніпра. У ставку в с. Ружин Житомирської обл. перлівниці були також інфіковані, а у ставку в м. Кривий Ріг – вільні від інвазії. У водосховищі, збудованому на р. Ірша (с. Нова Борова, Житомирська обл.), виявлені молюски, заражені кліщами, а в Макортівському (с. Саївка, Дніпропетровська обл.) – вільні від інвазії. В обстеженому оз. Кам'яне (сmt Радомишль, Житомирська обл.) також відзначено паразитування кліщів на тілі уніонід. У каналі Дніпро – Інгuleць (м. Світловодськ, Кіровоградська обл.) перлівниці виявилися вільними від інвазії. Як і в басейні Прип'яті, у водоймах і водотоках Дніпра поширені шість видів водяних кліщів. У більшій кількості станцій у перлівницеви відзначений *U. aculeata*, найменше – *U. hankoi* (див. таблицю).

У басейні Сіверського Дінця з шести досліджених річок у п'яти (83%) були виявлені кліщі роду *Unionicola*, які паразитували в уніонідах. У Волинківському (с. Оленівка, Донецька обл.) і Червонооскільському (с. Сеньково, Харківська обл.) водосховищах, озерах Лиман (сmt Зміїв, Харківська обл.), Чернецьке (с. Святі гори, Донецька обл.) відзначені інвазовані молюски. У цих водних об'єктах виявлено п'ять видів кліщів, а саме: *U. ypsilophora*, *U. intermedia*, *U. bonzi*, *U. aculeata* та *U. crassipes* (див. таблицю).

Отже, у перлівницеви із річкових басейнів України виявлені шість видів кліщів роду *Unionicola*: *U. ypsilophora*, *U. intermedia*, *U. bonzi*, *U. aculeata*, *U. crassipes*, *U. hankoi*



Найбільше видове багатство кліщів роду *Unionicola* характерне для басейнів Прип'яті та Дніпра, найменше – для Західного Бугу. У 32% станцій на тілі молюсків був відзначений *U. bonzi*, у 28% – *U. aculeata*, значно менше – *U. crassipes* (13%) та *U. hankoi* (5%). Перлівниці, інвазовані кліщами роду *Unionicola*, часто траплялись у стоячих водоймах і водотоках сповільненого режиму (75–100%), менше – у річках (67%).

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Васильєва Л. А. Перлівниці Unionidae (Bivalvia) фауни України: алозимна й морфологічна мінливість: автореф. дис. ... канд. біол. наук: 03.00.08. К., 2011. 23 с.
2. Дегтяренко О. В. Сучасний стан малакофауни річок Північного Приазов'я // Зоологічна наука у сучасному суспільстві: матеріали Всеукр. наук. конф., 15–18 вер., 2009 р. Київ; Канів, 2009. С. 142–146.
3. Ковальчук І. П. Управління водогосподарською та водоохоронною діяльністю: на прикладі басейну Західного Бугу // Укр. географ. журнал. 2009. № 3. С. 49–53.
4. Методика изучения биогеоценозов внутренних водоемов / под ред. Р. Д. Мордухай-Болтовской. М.: Наука, 1975. 240 с.
5. Пампура М. М. Сучасне поширення і структура поселень перлівницевих Unionidae Rafinesque, 1820 (Bivalvia) фауни України: автореф. дис. ... канд. біол. наук: 03.00.08. К., 2013. 25 с.
6. Соколов И. И. Hydracarina – водяные клещи Ч. 1: Hydrachnellae. Фауна СССР. Паукообразные. М.;Л.: Изд-во АН СССР, 1940. С. 328–338.
7. Стадниченко А. П. Фауна України. Перлівниці. Кулькові (Unionidae, Cycladidae). К.: Наук. думка, 1984. Т. 29. Вип. 9. 384 с.
8. Тузовский П. В. Определитель дейтонимф водяных клещей. М.: Наука, 1990. 238 с.
9. Тузовский П. В. Морфология и постэмбриональное развитие водяных клещей. М.: Наука, 1987. 96 с.
10. Baker R. A. Tissue damage and leucocytic infiltration following attachment of the mite *Unionicola intermedia* to the gills of the bivalve mollusc *Anodonta anatina* // J. Invertebr. Pathol. 1976. Vol. 27. N 3. P. 371–376.
11. Baker R. A. Nutrition of the mite *Unionicola intermedia* Koenike, and its relationship to the inflammatory response induced in its molluscan host *Anodonta anatina* L. // Parasitology. 1977. Vol. 75. P. 301–308.
12. Davids C. The relations between mites of the genus *Unionicola* and mussels *Anodonta* and *Unio* // Hydrobiologia. 1973. Vol. 41. N 1. P. 37–44.
13. Glöer P., Meier-Brook C. Süßwassermollusken. Hamburg: DJN, 1998. 136 S.
14. Hevers V. J. Morphologie und Systematik der in Deutschland auftretenden Schwamm- und Muschel-Milben-Arten der Gattung *Unionicola* (Acarina, Hydrachnellae, Unionicolidae) // Stuttgart Entomologia Generalis. 1978. Vol. 5 (I). N 10. S. 324–327.
15. Mitchell R. D., Pitchford G. W. On mites parasitizing *Anodonta* in England // J. Conchology. 1953. N 11. P. 365–370.
16. Soar D. Chas, Williamson W. The British Hydracarina. London: Printed for the ray society Sold by Dulay & CO., LTD., 1927. Vol. II. P. 122–145.
17. Viets K. Die ökologischen (parasitologischen) Beziehungen zwischen Wassermilben (Hydrachnellae, Acari) und Süßwassermollusken // Ztschr. angew. Entomol. 1954. N. 35. P. 459–494.

---

Стаття: надійшла до редакції 12.04.13

доопрацьована 04.12.13

прийнята до друку 27.12.13

**THE SPECIES COMPOSITION AND DISTRIBUTION OF THE GENUS UNIONICOLA  
(ACARI: HYDRACARINA: UNIONICOLIDAE) - PARASITES OF UNIONIDAE  
(MOLLUSCA: BIVALVIA: UNIONIDAE) IN RIVER BASINS OF UKRAINE**

**T. Shevchuk**

*Zhytomyr State University named after Ivan Franko  
40, Velyka Berdychivska St., Zhytomyr 10008, Ukraine  
e-mail: tetyana\_shevchuk5@ukr.net*

Six species of mites *Unionicola* Haldeman, 1842 genus: *U. ypsilophora* Bonz, 1783, *U. intermedia* Koenike, 1882, *U. bonzi* Claparede, 1869, *U. aculeata* Koenike, 1980, *U. crassipes* Müller, 1776, *U. hankoi* Szalay, 1927 in river basins of Ukraine were determined. In 32% of collection points on the body of mollusks was marked *U. bonzi*, at 28% – *U. aculeata*, much less met – *U. crassipes* (13%) and *U. hankoi* (5%). The highest species richness of mites of genus *Unionicola* characteristically for a pools of Pripyat and Dnieper River, and the smallest one the Western Bug. In 75–100% mollusks infested by mites of the genus *Unionicola* occurred in slow waters and less – in rivers (67%) the basine.

*Keywords: Unionicola, distribution, mollusks, river basins of Ukraine.*

**ВИДОВОЙ СОСТАВ И РАСПРОСТРАНЕНИЕ КЛЕЩЕЙ РОДА UNIONICOLA  
(ACARI: HYDRACARINA: UNIONICOLIDAE) - ПАРАЗИТОВ ПЕРЛОВИЦЕВЫХ  
(MOLLUSCA: BIVALVIA: UNIONIDAE) В РЕЧНЫХ БАСЕЙНАХ УКРАИНЫ**

**Т. Шевчук**

*Житомирский государственный университет имени Ивана Франко  
ул. Большая Бердичевская, 40, Житомир 10008, Украина  
e-mail: tetyana\_shevchuk5@ukr.net*

У перловицевых из речных бассейнов Украины обнаружены шесть видов клещей рода *Unionicola* Haldeman, 1842: *U. ypsilophora* Bonz, 1783, *U. intermedia* Koenike, 1882, *U. bonzi* Claparede, 1869, *U. aculeata* Koenike, 1980, *U. crassipes* Müller, 1776, *U. hankoi* Szalay, 1927. В 32% станциях на теле моллюсков был отмечен *U. bonzi*, в 28% – *U. aculeata*, значительно реже встречались *U. crassipes* (12%) и *U. hankoi* (5%). Самое большое видовое богатство клещей рода *Unionicola* характерно для бассейнов Припяти и Днепра, самое маленькое – Западного Буга. Перловицевые, инвазированные клещами рода *Unionicola*, в 75–100% случаев встречались в водоемах замедленного режима, меньше – в реках (67%).

*Ключевые слова: Unionicola, распространение, перловицевые, речные бассейны Украины.*

## ТАКСОНОМІЧНА СТРУКТУРА КЛАДОЦЕРОЦЕНОЗІВ УКРАЇНСЬКОГО РОЗТОЧЧЯ

О. Іванець

Львівський національний університет імені Івана Франка  
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна  
e-mail: oleh\_ivanets@mail333.com

*Cladocera* – важливий компонент зоопланктону. Основою роботи слугували 1548 проб, зібраних у 1992–2012 рр. Вивчали таксономічну структуру гіллястовусих раків Українського Розточчя. Найвищу репрезентативність мають родини *Chydoridae* (43%) і *Daphniidae* (41%). Нижчими показниками характеризуються *Bosminidae* (5%), *Sididae* (5%) і *Leptodoridae* (2%), *Polyphemidae* (2%), *Macrothricidae* (2%). Показано, що трофічна сітка водойм добре розвинена. У водоймах регіону представлені насамперед форми, поширені в Голарктиці та Палеарктиці.

*Ключові слова:* зоопланктон, *Cladocera*, Українське Розточчя.

Гіллястовусі раки (*Cladocera*) – важливий об’єкт гідроекологічного моніторингу, одне із завдань якого полягає у визначенні стану природних екосистем. Вони – важлива ланка трофічних ланцюгів у передачі енергії від автотрофів до вищих трофічних рівнів. У складі зоопланктонних угруповань гіллястовусі разом із веслоногими становлять до 90% біомаси і засвоюють до 80% енергії, яку споживають. Ці організми – чутливі індикатори стану водойм, оскільки для забезпечення оптимального функціонування ценозу можуть під впливом факторів середовища перебудовувати структуру угруповань унаслідок зміни співвідношення таксономічних груп [18, 22, 27, 38, 45, 48, 54].

Життєздатність біологічних систем і їх стійкість до впливу несприятливих факторів визначається, в першу чергу, структурно-функціональними характеристиками. Для оцінки ключових функцій кладоцеровозів як основи вивчення екологічних систем водойм важливим є об’єднання видів на основі подібності їх характеристик та ідентифікація відповідних функціональних груп, що визначаються певним типом життєдіяльності, однотипно і достатньо передбачувано реагують на довкілля. Особливості таких груп визначаються взаємодіями на популяційному рівні [1–4, 22, 34, 44, 49].

На даний час визначення стану гідроекосистем Розточчя, що розташоване у транскордонному регіоні України та Польщі, є особливо актуальним для Центрально-Східної Європи, оскільки по цій території проходить частина Європейського вододілу.

Розточчя має вигляд дугоподібної гряди завширшки від 5 км до 30 км, що на 180 км простягається від м. Краснік (Польща) на територію України до м. Львова. У межах України розташовується близько 60 км цього регіону, який представлений трьома геоморфологічними районами: Равське Розточчя, Янівське Розточчя, Львівське Розточчя [20, 37, 46, 56].

На даний час у літературі відсутня узагальнена інформація про дослідження таксономічної структури регіональних фаун гіллястовусих раків. Саме тому метою нашої роботи було проаналізувати структуру надвидових таксонів кладоцеровозів Українського Розточчя, котрі є більш консервативними. Об’єднання груп видів за особливостями біології, трофічними характеристиками становить особливий інтерес і дає змогу більш формалізовано підійти до вивчення угруповань, які є різноманітними у видовому відношенні.

### Матеріали та методи

У даній роботі представлені результати аналізу структури кладоцеровозів. Огляд фауни гіллястовусих, історія досліджень і гідрологічна характеристика Українського Розточчя викладені в одній із попередніх публікацій [15]. Матеріалом послужили 1548 проб, зібраних у водоймах Українського Розточчя протягом 1992–2012 років. Відбір і обробку проб здійснювали за загальноприйнятими методиками [19, 28, 30, 60]. Для визначення матеріалу використовували посібники [21, 23, 26, 33, 35, 40, 41, 48, 58].

Таксоном вважали таксономічну групу будь-якого рангу, котра достатньо відособлена, щоби їй можна було присвоїти певну категорію. Враховували, що таксономічна категорія є абстрактним терміном, котрий представляє назву певної групи, а організми, які належать до цих категорій, – конкретні зоологічні об'єкти. Брали до уваги, що поняття таксону має два аспекти: воно належить до конкретних організмів і має бути формально описаним під відповідною назвою [8, 25, 31, 42].

Таксономічну структуру та її рангування аналізували, враховуючи методичні рекомендації [29, 36, 44].

Результати попередніх досліджень опубліковані в низці робіт [9, 10–17, 43, 50, 51].

### Результати і їхнє обговорення

Таксономічна структура кладоцеровозів Українського Розточчя подана в табл. 1. У водоймах виявлено 42 види гіллястовусих раків, що належать до 7 родин і 19 родів. До родини *Chydoridae* належить 18 видів, до родини *Daphniidae* – 17 видів, по 2 види до родин *Sididae* і *Bosminidae*, по 1 виду до родин *Macrothricidae*, *Polyphemidae* і *Leptodoridae*. Типовими формами за чисельністю і частотою трапляння є: *Ceriodaphnia quadrangula*, *C. pulchella*, *Bosmina (Bosmina) longirostris*, *Daphnia (Daphnia) pulex*, *D. (D.) longispina*, *Moina brachiata*, *Chydorus ovalis*, *Ch. globosus*, *Ch. latus*, *Alona rectangula*, *A. affinis*.

В основу аналізу таксономічної структури покладено особливості біології та трофіки гіллястовусих з урахуванням адаптивності ознак, котрі забезпечують живлення організмів і є, разом з тим, діагностичними для тих чи інших груп.

Таблиця 1

Таксономічна структура кладоцеровозів водойм Українського Розточчя

№ п/п	Родини	Роди	Структурні характеристики кладоцеровозів				
			А	Б	В	Г	Д
1	<b>Sididae</b>	<i>Sida</i>	1	11	2	50	5
		<i>Diaphanoson</i>	1		2	50	
2	<b>Daphniidae</b>	<i>Ceriodaphnia</i>	6	27	15	35	41
		<i>Daphnia</i>	6		15	35	
		<i>Moina</i>	2		5	12	
		<i>Scapholeberis</i>	2		5	12	
		<i>Simocephalus</i>	1		2	6	
3	<b>Macrothricidae</b>	<i>Macrothrix</i>	1	5	2	100	2
4	<b>Chydoridae</b>	<i>Acroperus</i>	1	42	2	6	43
		<i>Alona</i>	4		10	22	
		<i>Alonella</i>	2		5	10	
		<i>Chydorus</i>	4		10	22	
		<i>Disparalona</i>	1		2	6	
		<i>Graproleberis</i>	1		2	6	
		<i>Pleuroxus</i>	4		10	22	
		<i>Tretocephala</i>	1		2	6	
		<i>Bosmina</i>	2	5	5	100	5
6	<b>Polyphemidae</b>	<i>Polyphemus</i>	1	5	2	100	2
7	<b>Leptodoridae</b>	<i>Leptodora</i>	1	5	2	100	2

**Примітка:** А – кількість видів; Б – представленість (%) родини в кладоцеровозі за числом родів; В – представленість (%) роду в кладоцеровозі за числом видів; Г – представленість (%) роду в родині за числом видів; Д – представленість (%) родини в кладоцеровозі за числом видів.

Такий підхід обумовлений визначенням ієрархії таксономічних категорій, котра певною мірою відображає ступінь схожості й давність походження груп. У *Cladocera* виникнення таких груп обумовлене зміною функцій або їх розвитком. Зокрема, антени у них виконують функцію весла і забезпечують рух, а тулубні кінцівки, внаслідок розвитку функції збирання харчових часточок, повністю втратили функцію руху [25, 26, 47, 48].

Розвиток функції збирання харчових часточок супроводжувався морфологічним диференціюванням щетинок і привів до повної втрати тулубними кінцівками ролі органів руху. Черевна стінка тіла перетворилася на харчовий рівчак, котрий є єдиним шляхом транспортування їжі до ротового отвору. Завдяки особливостям будови харчового рівчака і специфіці роботи усього фільтрувального апарату гіллястовусі можуть відбирати харчові частки за їх розмірами.

Стулки черепашки, поряд із захисною функцією, набули пристосувань, котрі дають змогу регулювати надходження харчових часток. Таким чином у *Cladocera* сформувався складний апарат для захоплення їжі [26, 38, 47, 48].

Тулубні кінцівки, котрі становлять найбільш активну частину апарату для захоплення їжі, перебувають у постійному, дуже швидкому русі. Число ударів грудних ніжок сягає 300–500 ударів на 1 хв. Спектр раціону фільтраторів *Cladocera* досить широкий. Він включає наносестон (одноклітинні водорості, часточки детриту, дрібні найпростіші) й ультрасестон (бактерії, дуже дрібні частки детриту, колоїдні часточки у фазі дисперсії). Загалом розмір харчових часточок змінюється від 3 до 300 мкм [26, 32, 47, 48, 55, 57].

Аналіз таксономічної структури на основі адаптивних ознак дає змогу виявити типові характеристики, що властиві для тих чи інших ценозів з урахуванням спеціальних пристосувань, характерних для таксонів, котрі забезпечують таку життєво важливу функцію організму як живлення [7, 22, 25, 26, 32, 39, 47, 48, 52, 53].

Середня кількість родів у родинях гіллястовусих раків Українського Розточчя становить 3. Родин, що мають відсоток родів вище від середнього, – 2 (*Chydoridae* і *Daphniidae*). Це становить 29% від усіх зареєстрованих родин. П'ять родин (*Sididae*, *Macrothricidae*, *Bosminidae*, *Polyphemidae*, *Leptodoridae*) мають відсоток родів, нижчий від середнього, і в сукупності становлять 71% від усіх зареєстрованих родин.

При аналізі родинних спектрів можна помітити їхні характерні особливості, які обумовлені, значною мірою, особливостями біології та живлення гіллястовусих (табл. 2).

Висока представленість, з врахуванням кількості родів, належить родині *Chydoridae*. У цій родині зареєстровано 8 родів. Вона досягає, з урахуванням цього показника, найвищого, четвертого рангу, і становить 42% у структурі кладоцеровоценозу.

Таку закономірність можна пояснити як тим, що *Chydoridae* в цілому найбільша за числом видів родина гіллястовусих раків, які мають виразну морфологічну й екологічну відмінність, так і тим, що види, котрі належать до цієї родини, населяють переважно прибережну літоральну зону водойм, у якій є багато макрофітів [26, 40, 48]. Саме такі зони акваторій є типовими для багатьох водойм Українського Розточчя.

Проживання хідорід у прибережній зоні обумовлене спеціальними морфологічними та фізіологічними адаптаціями. Зокрема, такі пристосування полягають у диференціюванні та спеціалізації кінцівок, котрі забезпечують рух і живлення на субстраті. Їх постабдомен дуже рухомий, може значно витягуватися, що забезпечує очищення складного апарату кінцівок, котрі беруть участь у живленні. Кишківник їх петлеподібно вигнутий, що збільшує його довжину і забезпечує якомога повніше засвоєння поживних речовин, зокрема, детриту, який становить значну частку раціону хідорід. Представники цієї родини мають порівняно товсті покрити, котрі захищають їх від механічних пошкоджень, а ймовірність

пошкоджень досить висока через проживання серед рослинності. Такі пристосування певною мірою розкривають особливості хідорід, що забезпечують їм оптимальні умови локалізації та живлення у прибережній зоні. Разом з тим, серед цієї групи гіллястовусих є види, наприклад *Chydorus sphaericus*, які хоч і трапляються в особливо великих кількостях біля берегів, але їх є достатньо і у відкритих частинах водойм. *Chydorus* може фільтрувати і захоплювати харчові частки як із товщі води, так і з поверхні водоростей та рослин [26, 40, 41, 48].

Таблиця 2

## Рангування кладоцероценозів Українського Розточчя у спектрі родин і родів

№ п/п	Родини	Кількість родів у родині	Ранг родини за кількістю родів	Представленість (%) родини в кладоцероценозі за числом родів
1	Macrothricidae	1	1	5
2	Bosminidae	1	1	5
3	Polyphemidae	1	1	5
4	Leptodoridae	1	1	5
5	Sididae	2	2	11
6	Daphniidae	5	3	27
7	Chydoridae	8	4	42

У родині *Daphniidae* зареєстровано 5 родів. Ця родина характеризується дещо меншим, третім рангом, і становить 27% у структурі кладоцероценозу. Представники родини *Daphniidae* насамперед ведуть пелагічний спосіб життя і трапляються переважно у відкритих частинах акваторії. За типом живлення вони є фільтраторами. Їх фільтраційний апарат є найбільш складним і високоспеціалізованим. У цій спеціалізації важливу роль відіграла модифікація метахронічного ритму руху кінцівок. Фільтраційний апарат *Daphnia* діє як засмоктувальна помпа, у побудові якої беруть участь усі п'ять пар кінцівок [26, 48, 58].

Родина *Sididae* має два роди і займає за цим показником провідну роль серед досліджених родин, що мають меншу від середньої кількість родів. За морфологією кінцівок і за механізмом дії апарат *Sida* є найпримітивнішим. Його дія складається з двох фаз синхронного руху кінцівок. *Sida crystallina* на дорзальному боці голови має утвори, що виконують функцію присоски. За допомогою них вона фіксується до підводних рослин і менше енергії витрачає на рух. Це дає змогу з меншою затратою енергії відфільтрувати водорості й підвищує ефективність роботи фільтрувального апарату. Живиться переважно рослинним мікропланктоном [26, 48, 58].

Родина *Macrothricidae* представлена одним родом *Macrothrix*. Представники цієї групи ведуть бентосний, придонний спосіб життя. Тримаються поблизу мулистого ґрунту. Живляться детритом [26, 41, 48].

Представники родини *Bosminidae* представлені дрібними формами. Для них характерний добре розвинений рostrum. Босміни здатні плавати між нитками синьозелених водоростей і відкидати їх рostrumом. Важливим є те, що швидкість руху мандибул і ширина щілини у дрібних видів не залежить від концентрації синьозелених водоростей [48, 59].

Фільтратори другого трофічного рівня, споживаючи значну кількість речовин, забезпечують, у цілому, підтримання балансу в гідроекосистемі [4, 24, 34].

Замикають трофічний ланцюг на рівні зоопланктонних угруповань облігатні хижачки родин *Polyphemidae* і *Leptodoridae*. Загалом дорослі організми здатні споживати здобич розміром від 4 до 440 мкм (найпростіші, коловертки, дрібні гіллястовусі ракоподібні, дрібні личинки хірономід). Живлення хижих кладоцера цих родин має свої особливості. Вільні, не приховані черепашкою кінцівки *Polyphemidae* і *Leptodoridae* пристосовані до захоплення здобичі. Проте *Polyphemus* частково зберігає здатність до фільтрації. Молода *Leptodora*



живиться як хижак уже з першої доби свого життя. Вона з'їдає до 5 рачків розміром до 0,6–0,7 мм. На 5–6 добу з'їдає до 30 рачків. У свою чергу, *Leptodora* і *Polyphemus* є високоякісним кормом для риб, оскільки *Leptodora* має великі розміри, а популяції *Polyphemus* утворюють великі скупчення, що робить їх легкодоступними для риб [5, 6, 32, 33].

Аналіз представленості родин на рівні видів має дещо інші закономірності (табл. 3). Зокрема, за цією характеристикою зменшується відмінність між родиною *Chydoridae* (18 видів) і *Daphniidae* (17 видів). Ранг цих родин відповідає ординації за ознакою кількості родів. Проте виразно зростає представленість родини *Daphniidae* у ценозі (41%). Певні відмінності є і в рівні різноманіття родини *Bosminidae*. За кількістю видів ця родина має вищий, другий ранг, так само як і родина *Sididae*. Рівень різноманіття родин *Macrothricidae*, *Polyphemidae* і *Leptodoridae* не змінився, проте значимість цих родин за представленістю у ценозі знизилася більше ніж удвічі і становить по 2%.

Таблиця 3

Рангування кладоцеровоценозів Українського Розточчя у спектрі родин і видів

№ п/п	Родини	Кількість видів у родині	Ранг родини за кількістю видів	Представленість (%) родини в кладоцеровоценозі за кількістю видів
1	Macrothricidae	1	1	2
2	Polyphemidae	1	1	2
3	Leptodoridae	1	1	2
4	Sididae	2	2	5
5	Bosminidae	2	2	5
6	Daphniidae	17	3	41
7	Chydoridae	18	4	43

Рангування кладоцеровоценозів у спектрі родів наведено в табл. 4. Аналіз спектру родів з урахуванням кількості видів у них характеризується певними особливостями. За рангуванням та значимістю у ценозі роди можна розділити на чотири групи.

У першій групі (табл. 4) головну роль відіграють роди *Daphnia* і *Ceriodaphnia* (родина *Daphniidae*), яким притаманний найвищий 4 ранг. Вони становлять за кількістю видів по 15% від усього видового складу.

Другу групу родів становлять представники родини *Chydoridae* (*Alona*, *Chydorus*, *Pleuroxus*). Для них притаманний дещо нижчий 3 ранг. Вони становлять по 10% від загальної кількості видів. Цікавим є те, що в цілому значимість у ценозі перших двох груп родів є однаковою. Вони становлять по 30% від загальної кількості видів.

У третю групу родів 2-го рангу, крім представників родин *Daphniidae* і *Chydoridae*, включений ще рід *Bosmina*. Ця група родів представлена досить своєрідними формами. Так, *Scapholeberis* веде нейстонний спосіб життя і має для цього відповідні адаптації. Зокрема, нижній край стулок у них рівний і має значну кількість щетинок, що забезпечує надійну фіксацію до плівки поверхневого натягу води. Рід *Moina*, який представлений дрібними формами, характеризується синхронним ритмічним рухом кінцівок (на відміну від метасинхронного у *Daphniidae*). Це дає змогу зробити припущення, що рід *Moina* філогенетично є більш давнім [26, 48, 58].

Четверта група включає десять родів. Вона є найбільш численною. Роди цієї групи характеризуються найнижчим, першим рангом. Проте їхня сукупна представленість у ценозі, як і представленість родів третьої групи, становить 20%. Група окремих родів і видів, що має невисоку представленість, відіграє важливу роль у підтриманні стабільності ценозу. Це обумовлене тим, що при зміні умов середовища деякі з цих форм, унаслідок перебудови структури ценозу, можуть зайняти панівне становище, забезпечуючи в цілому його стабільні функціональні характеристики.

Таблиця 4

## Рангування кладоцеровоценозів Українського Розточчя у спектрі родів і видів

№ п/п	Роди	Кількість видів у роді	Ранг	Представленість (%) роду в кладоцеровоценозі за кількістю видів	Група родів
1	Acroperus	1	1	2	IV
2	Diaphanosoma	1	1	2	IV
3	Disparalona	1	1	2	IV
4	Graproleberis	1	1	2	IV
5	Leptodora	1	1	2	IV
6	Macrothrix	1	1	2	IV
7	Polyphemus	1	1	2	IV
8	Simoccephalus	1	1	2	IV
9	Sida	1	1	2	IV
10	Tretocephala	1	1	2	IV
11	Alonella	2	2	5	III
12	Bosmina	2	2	5	III
13	Moina	2	2	5	III
14	Scapholeberis	2	2	5	III
15	Alona	4	3	10	II
16	Chydorus	4	3	10	II
17	Pleuroxus	4	3	10	II
18	Daphnia	6	4	15	I
19	Ceriodaphnia	6	4	15	I

Таким чином, аналіз таксономічної структури кладоцеровоценозів з урахуванням адаптивних ознак, котрі забезпечують живлення, дав змогу виділити певні функціональні одиниці.

На рівні родин – це *Chydoridae* і *Daphniidae*, що займають у водоймах різні біотопи, різні екологічні ніші та як первинні фільтратори відіграють особливу роль у трофодинаміці водойм. На рівні родів – це *Daphnia*, *Ceriodaphnia* (перша група) і *Alona*, *Chydorus*, *Pleuroxus* (друга група). У першій і другій групах родів спостерігається збільшення кількості таксономічних одиниць нижчого рангу при вирівнюванні їхньої значимості у ценозі. Ці групи представлені відповідно двома і трьома таксонами, що становлять по 30%, третя і четверта групи родів – чотирма і десятьма таксонами, що становить по 20% за кількістю видів. Це свідчить про добре розвинену трофічну сітку кладоцеровоценозів.

Менш різноманітні групи родів нижчих рангів відіграють провідну роль у ценозі при стресових ситуаціях, детермінуючи в цілому функціональну стабільність угруповань. Гіллястовусі другого трофічного рівня є своєрідним біофільтром, який очищає водойми і підтримує екологічний баланс екосистеми.

Представники облігатних хижих форм родин *Polyphemidae* і *Leptodoridae* відіграють важливу роль у забезпеченні оптимізації трофодинаміки. Ці безхребетні хижаки забезпечують передавання енергії на вищі рівні трофічної піраміди, споживаючи дрібних зоопланктерів, котрі, як правило, не елімінуються рибами. У свою чергу, внаслідок великих розмірів (*Leptodoridae*) або здатності утворювати великі скупчення (*Polyphemidae*) вони є хорошим і доступним кормом для зоопланктофагів.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Алимов А. Ф. Элементы теории функционирования водных экосистем. СПб.: Наука, 2000. 147 с.
2. Андроникова И. Н. Структурно-функциональная организация зоопланктона озерных экосистем разных трофических типов: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Л., 1989. 39 с.

3. Андроникова И. Н. Структурно-функциональная организация зоопланктона озерных экосистем разных трофических типов. СПб.: Наука, 1996. 189 с.
4. Бигон М., Харпер Дж., Таунсенд К. Экология. Особи, популяції и сообщества. М.: Мир, 1989. Т. 1. 667 с.; Т. 2. 477 с.
5. Буторина Л. Г. Наблюдения над поведением *Polyphemus pediculus* и функций его конечностей в процессе питания // Тр. Ин-та биол. внутр. вод АН СССР. 1965. Вып. 8 (11). С. 44–53.
6. Буторина Л. Г. Экологические аспекты поведения водных беспозвоночных на примере *Polyphemus pediculus* (L.), Cladocera: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М.: МГУ, 1990. 50 с.
7. Гиляров А. М. Динамика численности пресноводных планктонных ракообразных. М.: Наука, 1987. 192 с.
8. Джеффри Ч. Биологическая номенклатура. М.: Мир, 1980. 120 с.
9. Іванець О. Р. До характеристики зоопланктону водойм урбанізованих ландшафтів // Урбанізація як фактор змін біогеоценотичного покриву: тези міжнар. конф. Львів, 1994. С. 81–82.
10. Іванець О. Р. Біоценотичні комплекси зоопланктону в умовах антропогенного впливу // Наук. вісн. Укр. держ. лісотехн. ун-ту. 2000. Вип. 10.3. С. 275–279.
11. Іванець О. Р. Зоопланктон як об'єкт екологічного моніторингу водойм Розточчя // Розточанський збір – 2000: матеріали міжнар. наук.-практ. конф. (с. Старичі, Яворівський р-н, Львівська обл., 17–18 листопада 2000 р.). Кн. 2. Львів: Меркатор, 2001а. С. 115–118.
12. Іванець О. Р. Структурно-функціональні характеристики зоопланктонних угруповань як критерій оцінки екологічного стану малих антропогенно трансформованих водних екосистем // Структура і функціональна роль тваринного населення в природних і трансформованих екосистемах: тези I Міжнар. наук. конф. (м. Дніпропетровськ, 17–20 вересня 2001 р.). Дніпропетровськ, 2001б. С. 25–26.
13. Іванець О. Р. Динаміка популяцій планктонних організмів у антропогенно трансформованих гідроекосистемах // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2003. Вип. 32. С. 157–164.
14. Іванець О. Р. Зоопланктон водойм м. Львів // Наук. записки Тернопіль. нац. пед. ун-ту ім. В. Гнатюка. Спец. випуск гідроекол. 2010. №2 (43). С. 210–213
15. Іванець О. Р. Фауна гіллястовусих раків (Crustacea, Cladocera) Українського Розточчя // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2013. Вип. 63. С. 110–117.
16. Іванець О. Р., Гілецький І. Г. Екологічний стан малих водойм урбанізованого ландшафту за структурно-функціональними показниками зоопланктонних угруповань // Молодь і поступ біології: матеріали IV Міжнар. наук. конф. (Львів, 7–10 квітня 2008 р.). Львів, 2008а. С. 256–257.
17. Іванець О. Р., Рокецька М. М. Зоопланктоценози водойм басейну р. Шкло // Молодь і поступ біології: матеріали IV Міжнар. наук. конф. (Львів, 7–10 квітня 2008 р.). Львів, 2008б. С. 257–258.
18. Иванова М. Б. Продукция планктонных ракообразных в пресных водах. Л.: Зоол. ин-т АН СССР, 1985. 222 с.
19. Киселев И. А. Планктон морей и континентальных водоемов. Л.: Наука. Ленингр. отделение, 1969. Т. 1. С. 80–150.
20. Ковальчук І., Петровська М. Геоєкологія Розточчя: монографія. Львів: Вид. центр ЛНУ ім. І. Франка, 2003. 192 с.

21. *Коровчинский Н. М.* Ветвистоусые ракообразные отряда Stenopoda мировой фауны (морфология, систематика, экология, зоогеография). М.: Т-во науч. изд. КМК, 2004. 410 с.
22. *Коровчинский Н. М.* Краткий очерк истории систематико-фаунистических исследований ракообразных внутренних водоемов России // Актуальные проблемы изучения ракообразных континентальных вод: сб. лекций и докладов Междунар. школы-конф. Ин-т биологии внутр. вод им. И.Д. Папанина РАН (Борок, 5–9 ноября 2012 г.). Кострома: ООО Костромской печатный дом, 2012. С. 38–54.
23. *Котов А.А., Синев А.Ю., Глаголев С.М., Смирнов Н.Н.* Ветвистоусые ракообразные (Cladocera) // Определитель зоопланктона и зообентоса пресных вод Европейской России. Т. 1. Зоопланктон / под ред. В.Р. Алексеева, С.Я. Цалолихина. М.: Тов-во науч. изд. КМК, 2010. С. 151–276.
24. *Крючкова Н. М.* Трофические взаимоотношения зоо- и фитопланктона. М.: Наука, 1989. 128 с.
25. *Майр Э.* Популяции, виды и эволюция. М.: Мир, 1974. 460 с.
26. *Мануйлова Е.Ф.* Ветвистоусые рачки фауны СССР. Л.: Наука, 1964. 327 с.
27. *Мегарран Э.* Экологическое разнообразие и его измерение. М.: Мир, 1992. 184 с.
28. Методи гідроекологічних досліджень поверхневих вод / О.М. Арсан, О.А. Давидов, Т. М. Дяченко та ін.; за ред. В. Д. Романенка. НАН України. Ін-т гідробіології. К.: Логос, 2006. 408 с.
29. Методика изучения биогеоценозов внутренних водоемов / ред. Ф.Д. Мордухай-Болтовской. М.: Наука, 1975. 240 с.
30. Методические рекомендации по сбору и обработке материалов при гидробиологических исследованиях на пресноводных водоемах. Зоопланктон и его продукция / под. ред. Г. Г. Винберга, Г. М. Лаврентьевой. Л., 1982. 33 с.
31. Міжнародний кодекс зоологічної номенклатури. Вид. 4-е. Ухвалений Міжнар. союзом біол. наук / пер. з англ. і фр. Ю.П. Некрутенко. К.: Бібліотека офіційних видань, 2003. XLIII + 175 с.
32. *Монаков А. В.* Питание пресноводных беспозвоночных. М.: Изд-во Россельхозакадемии, 1998. 320 с.
33. *Мордухай-Болтовской Ф.Д., Ривьер И. К.* Хищные ветвистоусые Podonidae, Polyphemidae, Sercoragidae і Leptodoridae фауны мира. Л.: Наука, 1987. 182 с.
34. *Одум Ю.* Экология. М.: Мир, 1986. Т. 1. 328 с.; Т. 2. 376 с.
35. Определитель пресноводных беспозвоночных России и сопредельных стран. Т. 2. Ракообразные. 1995. СПб.: Зоол ин-т РАН, 627 с.
36. *Песенко Ю. А.* Принципы и методы количественного анализа в фаунистических исследованиях. М.: Наука, 1982. 287 с.
37. *Петровська М. А.* Еколого-геоморфологічний аналіз Розточчя і прилеглої території: автореф. дис. ... канд. геогр. наук. Львів, 2001. 17 с.
38. *Полищук Л. В.* Динамические характеристики популяций планктонных животных. М.: Наука, 1986. 128 с.
39. *Риклефс Р.* Основы общей экологии. М.: Мир, 1979. 424 с.
40. *Смирнов Н. Н.* Chydoridae фауны мира // Фауна СССР. Ракообразные. 1971. Т. 1. Вып. 2. Л.: Наука, 531 с.
41. *Смирнов Н. Н.* Macrothricidae и Moinidae фауны мира // Фауна СССР. Ракообразные. 1976. Т. 1. Вып. 3. Л.: Наука, 237 с.
42. *Смирнов Н. Н., Коровчинский Н. М., Котов А. А., Синев А. Ю.* Систематика Cladocera: современное состояние и перспективы развития // В кн.: Ветвистоусые ракообразные: систематика и биология. Н. Новг.: Вектор ТиС, 2007. С. 5–73.

43. Царик Й. В., Іванець О. Р., Яворський І. П. та ін. Сучасний стан деяких зооценозів Розточчя // Проблеми і перспективи розвитку природоохоронних об'єктів на Розточчі: матеріали міжнар. наук.-практ. конф. (с. Шкло, 6–7 липня 2000 р.). Львів: Логос, 2000. С. 185–190.
44. Чуйков Ю. С. Методы экологического анализа состава и структуры сообществ водных животных // Экология. 1981. № 3. С. 71–77.
45. Щербак В. І., Ковальчук Л. А., Майстрова Н. В. Методологічні основи моніторингу біоти природних вод // Гідрологія, гідрохімія і гідроекологія. К.: НікаЦентр, 2001. Т. 2. С. 137–145.
46. Buraczyński J. Funkcjonowanie chronionych obiektów przyrodniczych na Roztoczu // Проблеми і перспективи розвитку природоохоронних об'єктів на Розточчі: матеріали Міжнар. наук.-практ. конф. (с. Шкло, 6–7 липня 2000 р.). Львів: Логос, 2000. С. 76–80.
47. Dokulil M., Hamm A., Kohl J.-G. Ökologie und Schutz von Seen. Wien: Facultas-Univ.-Verl., 2001. 499 S.
48. Flössner D. Die Naupoda und Cladocera (ohne Bosminidae) Mitteleuropas. Backhuys Publishers, Leiden, 2000. 428 s.
49. Forró L., Korovchinsky N. M., Kotov A. A., Petrusek A. Global diversity of cladocerans (Cladocera, Crustacea) in freshwater. Hydrobiologia. 2008. 595. P. 177–184.
50. Ivanets O. R. Zooplankton of the water vegetation in the ponds of the west forest-steppe of Ukraine // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. Вип. 56. 2011. С. 148–156.
51. Ivanets O., Gorban I. Small storages of the western Ukraine: hydrobiological characteristics and Peculiarities of the waterfowl (Ornitofauna) // Limnology and waterfowl. Monitoring, modelling and management. Sandor Farago, Josef Kerekes. Sarrod-Sopron 21-23. November, 1994. Societas Internationalis Limnologiae (SIL), Working Group on Aquatic birds, 1994. P. 26.
52. Jurasz W. Fauna Cladocera Polski – aktualny stan wiedzy. Przegląd zoologiczny XLVII, 1–2, 2003. S. 7–17.
53. Jurasz W. Wióslarki (Cladocera) zbiorników śródpólnych i jezior południowych Kujaw. Łódź: Wydawnictwo Uniwersytetu Łódzkiego, 2005. 124 s.
54. Korovchinsky N. M. How many species of Cladocera are there? // Hydrobiologia. 1996. P. 191–204.
55. Lampert W., Sommer U. Limnoökologie. Stuttgart: Thieme, 1993. 440 s.
56. Roztocze. Środowisko przyrodnicze / pod red. J. Buraczyńskiego. Lublin: Wydawnictwo Lubelskie, 2002. 341 s.
57. Schwoerbel J. Einführung in die Limnologie. Stuttgart; Jena; Lübeck; Ulm: G. Fischer, 1999. 465 s.
58. Šrámek-Hušek R., Straškraba M., Brtek J. Lupenožci – Branchiopoda. Fauna ČSSR. Nakladatelství Československé Akademie Věd. Praha. 1962. 470 s.
59. Webster K. E., Peters R.H. Some size-dependent inhibitions of larger cladoceran filterers in filamentous suspensions // Limnol. and Oceanogr. 1978. Vol. 23. N 6. P. 1238–1245.
60. Wetzel R., Likens G. Limnological Analyses. Philadelphia; London; Toronto: W.B. Saunders Company. 1979. 357 p.

Стаття: надійшла до редакції 16.10.13

прийнята до друку 16.01.14

## THE TAXONOMIC STRUCTURE OF CLADOCEROCENOSES OF UKRAINIAN ROZTOCHYA

O. Ivanets

*Ivan Franko Lviv National University  
4, Hrushevskiy St., Lviv 79005, Ukraine  
e-mail: oleh\_ivanets@mail333.com*

*Cladocera* is an important component of the zooplankton. Basis of work makes 1548 tests in 1992–2012. Taxonomy structure of *Cladocera* of Ukrainian Roztochya natural region has been studied. *Chydoridae* (43%), *Daphniidae* (41%) were the best represented, followed by *Bosminidae* (5%), *Sididae* (5%) and *Leptodoridae* (2%), *Polyphemidae* (2%), *Macrothricidae* (2%). It is shown, that the trophic net of reservoirs was well formed. In reservoirs of the region there are presented widespread groups of the types being holarctic and palearctic.

*Keywords:* zooplankton, *Cladocera*, Ukrainian Roztochya.

## ТАКСОНОМИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА КЛАДОЦЕРОЦЕНОЗОВ УКРАИНСКОГО РАСТОЧЬЯ

О. Иванец

*Львовский национальный университет имени Ивана Франко  
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина  
e-mail: oleh\_ivanets@mail333.com*

*Cladocera* – важный компонент зоопланктона. Основой работы послужили 1548 проб, собранных в 1992–2012 гг. Изучали таксономическую структуру ветвистоусых раков Украинского Расточья. Наивысшую презентабельность имеют семейства *Chydoridae* (43%) и *Daphniidae* (41%). Более низкими показателями характеризуются *Bosminidae* (5%), *Sididae* (5%) и *Leptodoridae* (2%), *Polyphemidae* (2%), *Macrothricidae* (2%). Показано, что трофическая сеть водоемов хорошо развита. В водоемах региона представлены, прежде всего, формы, распространенные в Голарктике и Палеарктике.

*Ключевые слова:* зоопланктон, *Cladocera*, Украинское Расточье.



УДК: 579.266.4

**ІНТЕНСИВНІСТЬ ПРОЦЕСІВ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ  
І ПОКАЗНИКИ СИСТЕМИ АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ КЛІТИН  
*DESULFUROMONAS ACETOXIDANS* IMB B-7384  
ЗА ВПЛИВУ ФЕРУМ (III) ЦИТРАТУ**

**О. Масловська, С. Гнатуш**

*Львівський національний університет імені Івана Франка  
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна  
e-mail: Sosnovska.olga@yandex.ua*

За впливу ферум (III) цитрату спостерігали зростання вмісту продуктів ліпопероксидації у клітинах бактерій *Desulfuromonas acetoxidans* IMB B-7384, що свідчить про вільнорадикальний механізм пошкодження ліпідів. За цих умов питома активність каталази та вміст відновленого глутатіону зростали на другу добу. Подальше культивування бактерій у присутності ферум (III) цитрату спричиняло зниження питомої активності каталази та вмісту відновленого глутатіону. Нагромадження продуктів ліпопероксидації може бути однією з причин зниження питомої активності каталази та вмісту відновленого глутатіону у клітинах *D. acetoxidans* IMB B-7384 за впливу ферум (III) цитрату.

*Ключові слова:* перекисне окиснення ліпідів, каталаза, відновлений глутатіон, *Desulfuromonas acetoxidans* IMB B-7384.

Іони металів зі змінною валентністю спричиняють утворення активних метаболітів кисню (АМК). Іони феруму в середовищі культивування бактерій стимулюють утворення пероксидних радикалів та органічних активних метаболітів, таких як пероксил ( $\text{ROO}^\cdot$ ) і алкоксил ( $\text{RO}^\cdot$ ) радикали [12]. АМК можуть призводити до модифікації амінокислотних залишків і окиснення сульфгідрильних груп у білках, розриву пептидних зв'язків, втрати металу в металопротеїнах, деполімеризації нуклеїнових кислот, точкових мутацій та окиснення полісахаридів і ненасичених жирних кислот. Однією з основних причин пошкодження і загибелі клітин унаслідок дії АМК вважають перекисне окиснення ліпідів. Цим шляхом окиснюються ненасичені жирні кислоти, що може бути причиною порушення цілісності та властивостей біологічних мембран. Продукти ліпопероксидації є мембранотоксичними – вони деформують мембрани клітин і можуть пошкоджувати транспортні системи [1].

Щоби протидіяти шкідливому впливу АМК, у багатьох анаеробних мікроорганізмів функціонують ферментативні й неферментативні системи захисту, зокрема супероксиддисмутазу і каталазу активність виявляють у облигатно анаеробних сульфатредуквальних мікроорганізмів *Desulfovibrio gigas* [8].

Зазвичай оксидативний стрес у анаеробних мікроорганізмів спричинений впливом супероксид аніон-радикала ( $\text{O}_2^\cdot$ ) та  $\text{H}_2\text{O}_2$ , тому одним із ключових ферментів антиоксидантного захисту є каталаза [5]. Іншою важливою ланкою антиоксидантного захисту анаеробних мікроорганізмів є глутатіонзалежна антиоксидантна система, яка об'єднує три глутатіонзалежні ферменти: глутатіонпероксидазу, глутатіонредуктазу і глутатіонтрансферазу. Центральне місце системи займає трипептид глутатіон, що має і власну антиоксидантну активність [7, 8].

Бактерії *D. acetoxidans* ІМВ В-7384 розглядають як високоефективний біокаталізатор для мікробно-анодних паливних елементів, що забезпечують формування електричного струму при окисненні органічного карбону, внаслідок переміщення електронів при процесах відновлення перехідних металів 3d-типу, зокрема феруму та мангану. Бактерії *D. acetoxidans* ІМВ В-7384 як мікробно-анодні паливні елементи можуть використовуватись як альтернативний матеріал для виготовлення зарядних пристроїв у побутових і промислових масштабах [14]. Тому дослідження змін біохімічних властивостей клітин *D. acetoxidans* ІМВ В-7384 за впливу сполук Fe (III), залежно від їхньої концентрації у середовищі, є важливим для оптимізації процесів екзоелектрогенезу.

Метою роботи було дослідити інтенсивність процесів перекисного окиснення ліпідів і зміни показників антиоксидантної системи клітин *D. acetoxidans* ІМВ В-7384 за впливу ферум (III) цитрату.

#### Матеріали та методи

Для досліджень використовували бактерії *Desulfuromonas acetoxidans* ІМВ В-7384, виділені з озера Яворівське, одержані в чистій культурі й ідентифіковані на кафедрі мікробіології Львівського національного університету імені Івана Франка.

Бактерії вирощували у модифікованому середовищі Постгейта С. Донором електронів та карбону був ацетат натрію (54 мМ), акцептором електронів – фумарат натрію (31 мМ). Для дослідження впливу ферум (III) цитрату на фізіолого-біохімічні властивості бактерій *D. acetoxidans* ІМВ В-7384 у культуральне середовище вносили 5–20 мМ солі металу. У контроль солі металу не вносили. Біомасу визначали фотометруванням [13]. На другу, третю й четверту доби клітини руйнували ультразвуком і отримували безклітинний екстракт раніше описаним методом [4]. Концентрацію білків у безклітинних екстрактах визначали за методом Лоурі [10]. Вміст відновленого глутатіону та питому активність каталази визначали, як описано в роботі [4].

Вміст гідропероксидів ліпідів у клітинах визначали за методом, принцип якого полягає в осадженні протеїну трихлороцтовою кислотою (ТХО) з подальшим внесенням у середовище тіоціанату амонію [6].

Для визначення вмісту дієнових кон'югатів до 0,2 мл безклітинного екстракту додавали 1,8 мл суміші н-гептану й ізопропілового спирту у співвідношенні 1:1, струшували і залишали в закритих пробірках на 15 хв, після чого центрифугували при 6000 об/хв 10 хв. Супернатант відбирали у пробірки, в які попередньо вносили по 2 краплі води. Одержану гептанову фазу (0,5 мл) змішували з 2,0 мл етанолу і вимірювали абсорбцію при  $\lambda=233$  нм проти контролю, що містив 0,5 мл н-гептану і 2,0 мл етанолу. Концентрацію дієнових кон'югатів у зразку визначали, використовуючи коефіцієнт молярної екстинції  $28000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  і виражали в мкмоль/мг білка [6].

Концентрацію ТБК-активних продуктів (ТБКАП) вимірювали за допомогою кольорової реакції малонового діальдегіду (МДА) з тіобарбітуровою кислотою (ТБК) за умов високої температури та кислого середовища, що приводить до утворення триметинового комплексу, який містить одну молекулу МДА і дві молекули ТБК [6]. Для визначення вмісту ТБКАП до 0,5 мл безклітинного екстракту додавали 1 мл ТХО до кінцевої концентрації 10% і центрифугували 10 хв при 5000 g. Одержаний супернатант змішували з 1,5 мл насиченого розчину ТБК в 0,1 М HCl, до якого додавали 10 мМ бутилгідрокситолуолу, попередньо розчиненого в невеликому об'ємі етанолу. Суміш кип'ятили на водяній бані 20 хв. Бутилгідрокситолуол, який є синтетичним антиоксидантом, додавали в середовище для запобігання окисненню ліпідів під час кип'ятіння проб. У контрольну пробу замість супернатанту вводили воду. Після швидкого охолодження до проб додавали 3 мл бутанолу,

суміш інтенсивно перемішували і центрифугували в попередньому режимі. Екстракція бутанолом забарвлених комплексів продуктів пероксидного окиснення ліпідів із ТБК значно підвищує специфічність методу. Концентрацію ТБК-активних продуктів у бутанольному шарі визначали на спектрофотометрі СФ-46 при довжині хвилі 535 нм, використовуючи коефіцієнт молярного поглинання  $156\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  [3].

Статистичне опрацювання результатів проводили з використанням програмних пакетів Microsoft Excel та Origin [2].

### Результати і їхнє обговорення

Для дослідження впливу ферум (III) цитрату на інтенсивність процесів перекисного окиснення ліпідів і показники системи антиоксидантного захисту бактерій *D. acetoxidans* ІМВ В-7384 необхідно було підібрати концентрації, які спричиняють інгібування росту культури на 20–50%. З цією метою досліджено вплив ферум (III) цитрату в концентраціях від 5 до 20 мМ на ріст бактерій *D. acetoxidans* ІМВ В-7384 протягом шести діб культивування (рис. 1). За внесення ферум (III) цитрату в концентраціях 5–9 мМ ріст бактерій майже не відрізнявся від контролю протягом шести діб культивування.

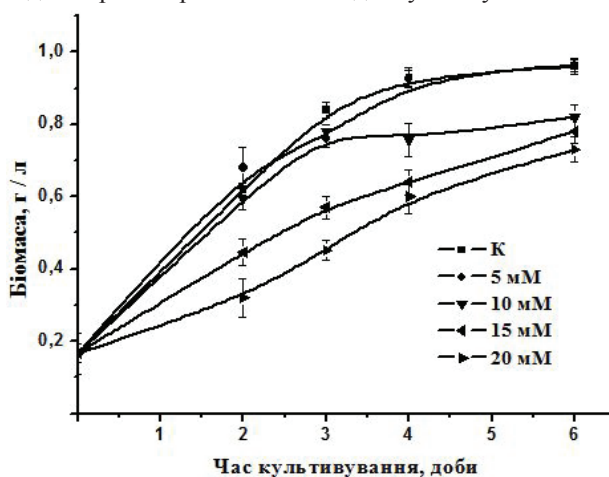


Рис. 1. Ріст бактерій *D. acetoxidans* ІМВ В-7384 за впливу ферум (III) цитрату ( $P > 0,95$ ).

Внесення ферум (III) цитрату в концентрації 10 мМ на другу і третю доби культивування також не спричиняло суттєвого інгібування росту культури, однак за збільшення часу культивування до шести діб спостерігали зниження нагромадження біомаси на 19%, порівняно з контролем. За внесення 12 мМ ферум (III) цитрату зафіксовано зниження біомаси на 13% на другу добу культивування. Зі збільшенням часу культивування за впливу 12 мМ солі металу до третьої та четвертої діб спостерігали зниження нагромадження біомаси відповідно на 23 та 25%. Найбільше інгібування росту бактерій спостерігали за внесення ферум (III) цитрату в концентрації 20 мМ. На другу добу культивування за внесення цієї концентрації солі металу нагромадження біомаси зменшилося на 49%, порівняно з контролем. Для досліджень впливу ферум (III) цитрату на інтенсивність процесів перекисного окиснення ліпідів і показники системи антиоксидантного захисту бактерій *D. acetoxidans* ІМВ В-7384 використовували концентрації 10–20 мМ. Оцінку впливу ферум (III) цитрату здійснювали протягом другої, третьої та четвертої діб культивування.

Пероксидація поліненасичених жирних кислот (ПНЖК) призводить до утворення перекисних сполук (гідроперекиси, ендоперекиси, діалкілперекиси, епоксиди) ліпідів і

дієнових кон'югатів. Дієнові кон'югати утворюються за рахунок перерозподілу електронної густини у молекулах лінолевої, ліноленової й арахідонової кислот. Оскільки дієнова кон'югація з'являється на стадії утворення вільних радикалів, то її наявність у продуктах перекисного окиснення свідчить про утворення вільних радикалів, а отже, засвідчує вільнорадикальний механізм окиснення ПНЖК. Вторинні продукти вільнорадикального окиснення утворюються при деструкції гідроперекисів ПНЖК, утворюючи значну кількість карбонільних сполук (н-алкенали, МДА, кетони, алкани, алкени тощо), які завдяки своїй хімічній природі (стабільність) є основними біомаркерами вільнорадикального окиснення [1, 9, 11].

Під час дослідження вмісту дієнових кон'югатів і гідроперексидів ліпідів у клітинах *D. acetoxidans* ІМВ В-7384, вирощених без внесення ферум (III) цитрату, виявлено зростання їх вмісту зі збільшенням часу культивування (рис. 2). Вміст дієнових кон'югатів на третю і четверту доби культивування збільшився відповідно у 1,5 і 3 рази, порівняно з вмістом цих продуктів ПОЛ на другу добу культивування. Значне зростання вмісту гідроперексидів ліпідів також спостерігали на третю і четверту доби культивування. Отримані результати можна пояснити тим, що ПОЛ не є винятково деструктивним процесом. Пероксидне окиснення ліпідів має важливе значення для оновлення біологічних мембран, ротації їх білкового й ліпідного компонентів, регуляції фізико-хімічних властивостей мембран клітин і субклітинних структур [1].

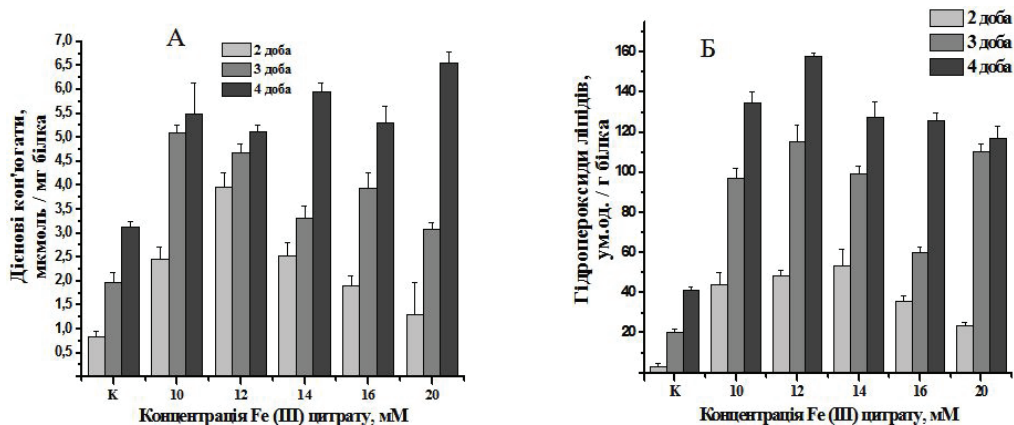


Рис. 2. Вміст дієнових кон'югатів (А) та гідроперексидів ліпідів (Б) у клітинах *D. acetoxidans* ІМВ В-7384 за впливу ферум (III) цитрату протягом чотирьох діб культивування ( $P > 0,95$ ).

Внесення різних концентрацій ферум (III) цитрату в середовище культивування спричиняло зростання вмісту дієнових кон'югатів у клітинах *D. acetoxidans* ІМВ В-7384, порівняно з контролем (рис. 2, А). Так, вже на другу добу культивування за внесення 10 мМ ферум (III) цитрату вміст дієнових кон'югатів у клітинах *D. acetoxidans* ІМВ В-7384 зростав утричі, порівняно з контролем. Вміст дієнових кон'югатів у клітинах бактерій, вирощених за впливу ферум (III) цитрату, зростав зі збільшенням часу культивування. Найвищий вміст дієнових кон'югатів спостерігали на четверту добу культивування за впливу всіх досліджуваних концентрацій солі металу. Також вміст досліджуваних продуктів ліпопероксидації змінювався залежно від концентрації ферум (III) цитрату в культуральному середовищі. Максимальний вміст дієнових кон'югатів на другу добу культивування зафіксовано за внесення 12 мМ ферум (III) цитрату. За подальшого збільшення концентрації солі металу до 20 мМ спостерігали зниження вмісту досліджених сполук у клітинах бактерій, однак ці показники були вищими, ніж у контрольному зразку. Подібні зміни вмісту дієно-

вих кон'югатів спостерігали і на третю добу вирощування. На четверту добу вирощування вміст дієнових кон'югатів у клітинах бактерій за впливу 10–16 мМ ферум (III) цитрату залишався на рівні 5,2–5,8 мкмоль/мг білка. Внесення 20 мМ ферум (III) цитрату зумовлювало підвищення вмісту дієнових кон'югатів порівняно з вмістом цих сполук у клітинах бактерій, вирощених за впливу 10–16 мМ солі металу.

За внесення різних концентрацій ферум (III) цитрату вміст гідропероксидів ліпідів збільшувався вже на другу добу культивування (рис. 2, Б). Так, внесення ферум (III) цитрату у концентрації 10 мМ спричиняло збільшення вмісту гідропероксидів ліпідів у 12 разів, порівняно з контролем, на другу добу культивування. Зі збільшенням тривалості впливу солі металу помітно збільшувався вміст гідропероксидів ліпідів у клітинах *D. acetoxidans* ІМВ В-7384. На четверту добу культивування бактерій у середовищі з ферум (III) цитратом спостерігали значну інтенсифікацію процесів ліпопероксидації, порівняно з другою і третьою добою за усіх досліджуваних концентрацій.

Вміст ТБКАП у клітинах *D. acetoxidans* ІМВ В-7384, вирощених без внесення ферум (III) цитрату в середовище культивування, зростав зі збільшенням часу культивування (рис. 3). На четверту добу культивування вміст ТБКАП у клітинах бактерій перевищував досліджений показник на другу добу культивування в 4,2 разу. За внесення ферум (III) цитрату в середовище культивування спостерігали зростання вмісту ТБКАП у клітинах бактерій. Вміст ТБКАП у клітинах бактерій змінювався залежно від тривалості культивування та концентрації ферум (III) цитрату в середовищі культивування. Вміст даних продуктів ліпопероксидації у клітинах бактерій за впливу ферум (III) цитрату зростав зі збільшенням часу культивування. За впливу всіх досліджуваних концентрацій солі металу найвищий вміст ТБКАП спостерігали на четверту добу вирощування. Внесення ферум (III) цитрату в концентрації 10 мМ на другу добу культивування спричиняло зростання вмісту ТБКАП у 4,5 разу, порівняно з контролем. За подальшого збільшення концентрації солі металу вміст ТБКАП знижувався, порівняно з вмістом цієї сполуки у клітинах, вирощених у середовищі з додаванням 10 мМ ферум (III) цитрату, однак суттєво перевищував вміст ТБКАП у контрольному зразку. Так, за внесення солі металу в концентрації 12, 14 та 16 мМ вміст ТБКАП становив відповідно  $72,5 \pm 2,52$ ,  $55,8 \pm 3,63$  та  $33,2 \pm 1,55$  нмоль/мг білка. За внесення 20 мМ ферум (III) цитрату спостерігали підвищення вмісту ТБКАП, порівняно з вмістом цих продуктів перекисного окиснення ліпідів у клітинах, вирощених за впливу 16 мМ ферум (III) цитрату.

Подібні зміни вмісту ТБКАП у клітинах *D. acetoxidans* ІМВ-В7384 за впливу ферум (III) цитрату спостерігали на третю добу культивування. На четверту добу вирощування вміст ТБКАП у клітинах бактерій зростав за впливу 10–14 мМ ферум (III) цитрату. Подальше збільшення концентрації солі металу до 20 мМ зумовлювало зниження вмісту ТБКАП порівняно з даним показником у клітинах, вирощених за впливу 14 мМ ферум (III) цитрату. Отже, нагромадження значних кількостей гідропероксидів ліпідів, дієнових кон'югатів і МДА у клітинах *D. acetoxidans* ІМВ-В7384 за впливу ферум (III) цитрату свідчить про вільнорадикальний механізм пошкодження ліпідів мембран.

Захист клітин від деструктивної дії АМК забезпечує система антиоксидантного захисту. Антиоксидантну систему захисту умовно поділяють на дві ланки: ферментативну і неферментативну. До ферментативної ланки належать супероксиддисмутаза, каталаза, глутатіонпероксидаза тощо, до неферментативної – відновлений глутатіон, токоферолі, убіхінони тощо. Для досліджень впливу ферум (III) цитрату на показники системи антиоксидантного захисту питому активність каталази обрали маркером ферментативної ланки, а вміст відновленого глутатіону – маркером неферментативної. Каталаза є основним первинним антиоксидантом системи захисту. Вона каталізує розщеплення пероксиду вод-



ню до води [7]. Глутатіон відіграє важливу роль в антиоксидантному захисті й підтриманні окисно-відновного балансу клітин [8]. Основний антиоксидантний ефект цього трипептиду реалізується внаслідок його участі як донора електронів у функціонуванні ферментів, зокрема глутатіонпероксидази та глутатіон-S-трансферази. Дефіцит глутатіону, за умов підвищеного утворення АМК чи токсичного впливу високих концентрацій іонів перехідних металів, зумовлює пригнічення синтезу білків і ДНК [5].

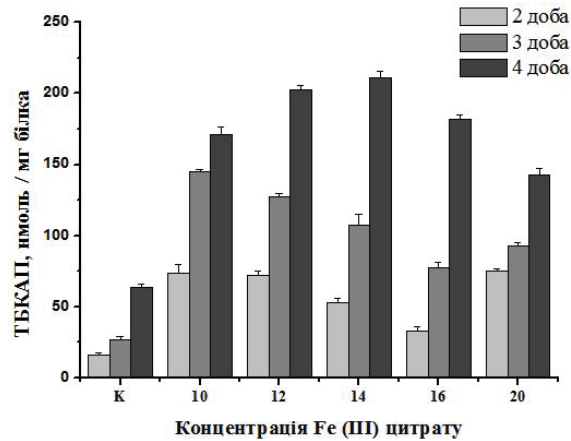


Рис. 3. Вміст ТБКАП у клітинах *D. acetoxidans* ІМВ В-7384 за впливу ферум (III) цитрату протягом чотирьох діб культивування ( $P>0,95$ ).

Вміст відновленого глутатіону в клітинах *D. acetoxidans* ІМВ В-7384, вирощених у середовищі без внесення ферум (III) цитрату, незначно змінювався протягом чотирьох діб культивування (рис. 4). За внесення ферум (III) цитрату спостерігали зростання вмісту відновленого глутатіону в клітинах бактерій. За впливу всіх досліджених концентрацій ферум (III) цитрату найвищий вміст відновленого глутатіону спостерігали на другу добу культивування. На третю і четверту доби культивування вміст відновленого глутатіону суттєво знижувався, порівняно з другою добою. Так, за впливу ферум (III) цитрату в концентрації 14 мМ вміст відновленого глутатіону на четверту добу культивування був нижчим у 3 рази, порівняно з даним показником на другу добу культивування.

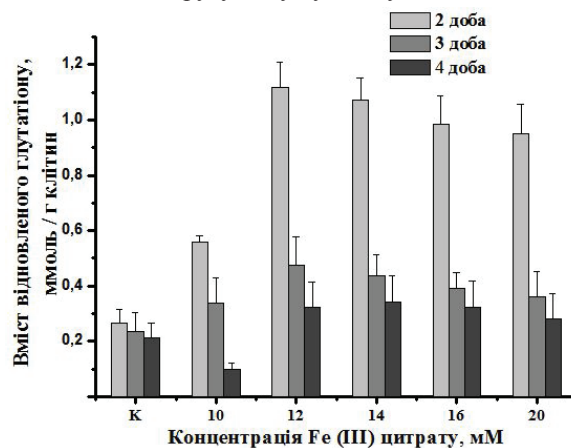


Рис. 4. Вміст відновленого глутатіону в клітинах *D. acetoxidans* ІМВ В-7384 за впливу ферум (III) цитрату протягом чотирьох діб культивування ( $P>0,95$ ).



Варто відзначити, що за внесення ферум (III) цитрату у концентрації від 12 до 20 мМ вміст відновленого глутатіону на третю добу культивування практично не змінювався. На четверту добу культивування за впливу цих концентрацій ферум (III) цитрату вміст відновленого глутатіону дещо знижувався, порівняно з даним показником на третю добу культивування. Максимальний вміст відновленого глутатіону спостерігали на другу добу культивування за внесення 14 мМ ферум (III) цитрату. За збільшення концентрації солі металу до 20 мМ на другу добу культивування спостерігали зниження вмісту відновленого глутатіону.

Відомо, що відновлений глутатіон може безпосередньо взаємодіяти з продуктами ліпопероксидації. Зниження вмісту відновленого глутатіону в клітинах *D. acetoxidans* IMB B-7384 може бути спричинене взаємодією трипептиду з продуктами ліпопероксидації з утворенням адуктів глутатіону з активними інтермедіатами ліпопероксидації. У результаті такої взаємодії знешкоджуються високотоксичні продукти перекисного окиснення ліпідів – 4-гідрокси-2-ноненаль та 4-оксо-2-ноненаль [9]. Іншою причиною зниження вмісту відновленого глутатіону може бути ушкодження ферментів глутатіонзалежної антиоксидантної системи продуктами перекисного окиснення ліпідів, унаслідок чого не оновлюється пул відновленого глутатіону.

Досліджено питому активність каталази клітин *D. acetoxidans* IMB B-7384 за впливу різних концентрацій ферум (III) цитрату протягом 4 дбб культивування (рис. 5).

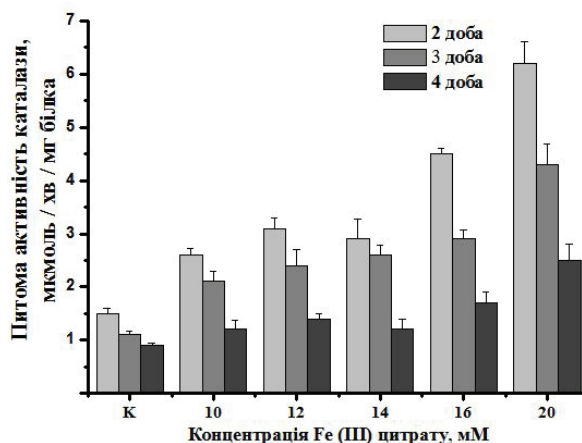


Рис. 5. Питомо активність каталази клітин *D. acetoxidans* IMB B-7384 за впливу ферум (III) цитрату протягом чотирьох дбб культивування ( $P > 0,95$ ).

Питомо активність каталази клітин *D. acetoxidans* IMB B-7384, вирощених у середовищі без внесення металу, трохи знижувалася протягом чотирьох дбб культивування. Внесення ферум (III) цитрату зумовлювало зростання питомої активності каталази за всіх досліджених концентрацій. Найвищу питому активність каталази спостерігали на другу добу культивування за усіх досліджуваних концентрацій ферум (III) цитрату. Зі збільшенням часу культивування до чотирьох дбб спостерігали зниження питомої активності каталази. Питомо активність каталази також змінювалася залежно від концентрації солі металу. На другу і третю доби культивування питома активність каталази зростала зі зростанням концентрації ферум (III) цитрату. Внесення ферум (III) цитрату в концентрації 10 мМ спричиняло зростання питомої активності каталази в 2 рази, а 16 мМ і 20 мМ – у 3 і 4,5 разу, порівняно з контролем на другу добу культивування. На четверту добу культивування за внесення ферум (III) цитрату в концентраціях 10–14 мМ питома активність каталази незначно відрізнялася від контрольного зразка. Внесення 16 і 20 мМ ферум (III) цитрату зумовлювало зростання питомої активності каталази відповідно у 2 та 2,8 разу.

Таким чином, за внесення ферум (III) цитрату в концентрації 10–20 мМ відбувається значне зростання вмісту продуктів перекисного окиснення ліпідів у клітинах *D. acetoxidans* IMB В-7384. Зростання вмісту ТБКАП, дієнових кон'югатів і гідропероксидів за впливу різних концентрацій ферум (III) цитрату свідчить про значну інтенсифікацію процесів ліпопероксидації та вільнорадикальний механізм пошкодження жирних кислот. За цих умов спостерігали підвищення активності антиоксидантної системи захисту клітин *D. acetoxidans* IMB В-7384, зокрема зростання питомої активності каталази та вмісту відновленого глутатіону вже на другу добу. За збільшення тривалості впливу ферум (III) цитрату питомою активністю каталази та вміст відновленого глутатіону знижувалися. Отже, наявність іонів феруму в середовищі культивування бактерій спричиняє накопичення у клітинах токсичних продуктів ліпопероксидації – гідропероксидів ліпідів, дієнових кон'югатів і малонового діальдегіду (рис. 2, 3). Відомо, що гідропероксиди ліпідів здатні інактивувати каталазу шляхом утворення неактивного комплексу [15]. Також встановлено здатність високотоксичного продукту ліпопероксидації малонового діальдегіду утворювати комплекси з ДНК, що унеможливує процес транскрипції [9]. Тому зниження питомої активності каталази може бути зумовлене як зниженням синтезу ферменту, так і зниженням його активності.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Головач Н. П., Тарновська А. В., Коцюмбас Г. І., Санагурський Д. І. Процеси перекисного окиснення ліпідів у живих організмах. Л.: ЛНУ імені Івана Франка, 2012. 250 с.
2. Лакін Г. Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1990. 352 с.
3. Луцак В. І., Багнюкова Т. В., Луцак О. В. Показники оксидативного стресу. 1. Тіобарбітуратактивні продукти і карбонільні групи білків // Укр. біохім. журнал. 2004. Т. 76. № 3. С. 136–141.
4. Масловська О. Д., Гнатуш С. О., Білий О. І. та ін. Показники системи антиоксидантного захисту клітин *Desulfuromonas acetoxidans* за впливу ферум (III) цитрату й аргентум нітрату // Біологічні студії / *Studia Biologica*. 2013. Т. 7. № 1. С. 89–96.
5. Меньшикова Е. Б., Ланкин В. З., Зенков Н. К. и др. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты. М.: Слово, 2006. 556 с.
6. Олексюк Н. П., Янович В. Г. Активність про- і антиоксидантних систем у печінці прісноводних риб у різні пори року // Укр. біохім. журнал. 2010. Т. 82. № 3. С. 41–48.
7. Brioukhanov A. L., Thauer R. K., Netrusov A. I. Catalase and superoxide dismutase in the cells of strictly anaerobic microorganisms // *Microbiol.* 2002. Vol. 71. N 3. P. 281–285.
8. Fareleira P., Santos B. Response of a strict anaerobe to oxygen: survival strategies in *Desulfovibrio gigas* // *Microbiol.* 2003. Vol. 149. P. 1513–1522.
9. Gueraud F., Atalay M., Bresgen N. et. al. Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products // *Free Radic. Res.* 2010. Vol. 44. N 10. P. 1098–124.
10. Lowry O., Rosebrough N., Farr L., Randall R. Protein measurement, with the Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* 1951. N 193. P. 265–275.
11. Marnett L. J. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde // *Mutation Research.* 1999. Vol. 424. N 2. P. 83–95.
12. Papanikolaou G., Pantopoulos K. Iron metabolism and toxicity // *Toxicol. and Applied Pharmacol.* 2005. Vol. 202. P. 199–211.
13. Vasylyv O., Hnatysh S. Effect of transition metal compounds on catalase activity of sulfur-reducing bacterial *Desulfuromonas acetoxidans* cells // *Visnyk of the Lviv University / Series Biology.* 2011. Vol. 57. P. 207–215.
14. Vasylyv O., Bilyy O., Ferensovich Ja., Hnatysh S. Electric current generation by sulfur-reducing bacteria in microbial-anode fuel cell // *Proc. SPIE.* 2012. Vol. 8472. P. 84720Z-1-7.
15. Wang Ge, Conover R., Benoit S. et al. Role of a bacterial organic hydroperoxide detoxification system in preventing catalase inactivation // *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 279. N 50. P. 51908–51914.

**THE INTENSITY OF LIPID PEROXIDATION AND PARAMETERS  
OF ANTIOXIDATIVE DEFENCE SYSTEM OF *DESULFUROMONAS ACETOXIDANS*  
IMV B-7384 UNDER THE INFLUENCE OF FERRIC (III) CITRATE**

**O. Maslovska, S. Hnatysh**

*Ivan Franko National University of Lviv  
4, Hrushevskiyi St., Lviv 79005, Ukraine  
e-mail: Sosnovska.olga@yandex.ua*

Under the influence of ferric (III) citrate an increase in the content of lipid peroxidation products in bacteria *Desulfuromonas acetoxidans* IMV B-7384 was observed. It indicates the free radical damage mechanism of lipids. Under these conditions, the specific activity of catalase and reduced glutathione content increased on the second day. Further bacterial cultivation under the presence of ferric (III) citrate caused decrease of specific catalase activity and reduced glutathione content. The storage of lipid peroxidation products may be one of the reasons of decrease of specific catalase activity and reduced glutathione content in *D. acetoxidans* IMV B-7384 under the influence of ferric (III) citrate.

*Keywords:* lipid peroxidation, catalase, reduced glutathione, *Desulfuromonas acetoxidans* IMB B-7384.

**ИНТЕНСИВНОСТЬ ПРОЦЕССОВ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ  
ЛИПИДОВ И ПОКАЗАТЕЛИ СИСТЕМЫ АТИОКСИДАНТНОЙ  
ЗАЩИТЫ КЛЕТОК *DESULFUROMONAS ACETOXIDANS* ИМВ В-7384  
ПРИ ВЛИЯНИИ ФЕРРУМ (III) ЦИТРАТА**

**О. Масловская, С. Гнатуш**

*Львовский национальный университет имени Ивана Франко  
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина  
e-mail: Sosnovska.olga@yandex.ua*

При влиянии феррум (III) цитрата наблюдали рост содержания продуктов липопероксидации в клетках бактерий *Desulfuromonas acetoxidans* ИМВ В-7384, что свидетельствует о свободнорадикальном механизме повреждения липидов. В этих условиях удельная активность каталазы и содержание восстановленного глутатиона увеличивалась на вторые сутки. Дальнейшее культивирование бактерий в присутствии феррум (III) цитрата сопровождалось снижением удельной активности каталазы и содержания восстановленного глутатиона. Накопление продуктов липопероксидации может быть одной из причин снижения удельной активности каталазы и содержания восстановленного глутатиона в клетках *D. acetoxidans* ИМВ В-7384 под влиянием феррум (III) цитрата.

*Ключевые слова:* перекисное окисления липидов, каталаза, восстановленный глутатион, *Desulfuromonas acetoxidans* ИМВ В-7384.

## АНТАГОНІСТИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ АКТИНОМІЦЕТІВ, ВИДІЛЕНИХ ІЗ РИЗОСФЕРИ ЧИСТОТІЛУ ВЕЛИКОГО *CHELIDONIUM MAJUS* L.

О. Громико

Львівський національний університет імені Івана Франка  
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна  
e-mail: o\_gromyko@franko.lviv.ua

З ризосфери чистотілу великого *Chelidonium majus* L. виділено 248 штамів актиноміцетів. Досліджено антибактерійні та фунгіцидні властивості виділених штамів по відношенню до бактерій і грибів, представників родів *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Candida*, *Aspergillus*. Виявлено, що 85% досліджених штамів актиноміцетів пригнічували розвиток того чи іншого мікроорганізму. Описані штами, які пригнічували ріст майже усіх використаних тест-культур, за винятком грибів роду *Aspergillus*, близько 10% ізолятів затримували ріст тільки однієї тест-культури. Деякі ізоляти, зокрема штам Lv 28-52, Lv 28-110, Lv28-142, Lv 28-145, Lv 28-202, на високому рівні пригнічували розвиток дріжджів і фітопатогенних бактерій. Описані в роботі штами актиноміцетів можуть бути потенційними продуцентами нових біологічно активних речовин.

*Ключові слова:* актиноміцети, фітопатогенні бактерії, антагоністичні властивості, чистотіл великий *Chelidonium majus* L.

Актиноміцети – один із головних об'єктів мікробних біотехнологій. Як продуценти широкого спектра біологічно активних сполук (антибіотиків, ферментів, вітамінів, фітогормонів, сидерофорів та ін.) вони мають велике значення для фармацевтичної промисловості й сільського господарства [9, 21, 28]. Дві третини відомих на сьогодні природних антибіотиків мікробного походження синтезують актиноміцети [7, 21, 31].

Актиноміцети широко розповсюджені у природі: в ґрунтах різних типів, солених і прісних водоймах, травній системі безхребетних тощо [13, 16, 17, 29]. Багато видів цих бактерій є симбіонтами рослин, які розвиваються в їхній ризосфері або судинній системі (так звані ендofітні актиноміцети) [8, 21]. Коренева система рослин формує особливе середовище, збагачене поживними речовинами, легкодоступними для мікроорганізмів [8]. Тісні симбіотичні зв'язки надзвичайно вигідні й актиноміцетам, і рослинам. Синтезуючи комплекс біологічно активних сполук, вони сприяють росту і захисту рослин від фітопатогенної мікрофлори [27]. У свою чергу, рослини постачають їм необхідні джерела живлення.

У літературі є дані про те, що актиноміцети з ризосфери лікарських рослин можуть бути продуцентами нових біологічно активних сполук [14, 21, 31]. Чистотіл великий *C. majus* L. – лікарська рослина, яка широко застосовується у традиційній і народній медицині [10]. Фармакологічна активність більшості препаратів із чистотілу обумовлена перш за все алкалоїдами, яким властивий широкий спектр активностей: антимікробна, фунгіцидна, противірусна, антипаразитарна [18–20]. Хелідонін – один із основних алкалоїдів чистотілу, а також протоберберин і бензофенантридини, здатні затримувати розвиток різних ліній пухлинних клітин, у тому числі полірезистентних [11].

Мікроорганізми-симбіонти *C. majus* L. вивчені недостатньо. Опубліковані дані про ендofітні бактерії чистотілу роду *Bacillus* і їхні фунгіцидні властивості [12]. Однак немає даних про актиноміцети із ризосфери цієї рослини.

Метою цього дослідження було виділення та вивчення антагоністичних властивостей актиноміцетів із ризосфери рослин чистотілу великого *C. majus* L., зібраних на території м. Львова.

#### Матеріали та методи

Рослини чистотілу великого *C. majus* L. в кількості 10 екземплярів збрали у червні-жовтні 2011 р. вздовж покинутої дороги на ділянці довжиною 50 м у північно-західній частині Львова. Зразки коренів із ґрунтом транспортували у стерильних пергаментних пакетах і зберігали при температурі 4°C.

Для виділення актиноміцетів 1 г коренів із ґрунтом вносили в колбу зі 100 мл стерильної водопровідної води й інтенсивно струшували протягом 15 хв. Корені виймали стерильним пінцетом, робили 10-кратні розведення отриманої суспензії та висівали (розведення  $10^{-2}$ – $10^{-4}$ ) на чашки Петрі з такими агаризованими середовищами: Гаузе 1 [2], ZSSE [30], крохмально-аміачне, гліцериново-аспарагінове, гліцериново-пептонне [6], вівсяне [2]. Для пригнічення росту інших бактерій і грибів у середовища додавали налідиксову кислоту (25 мкг/мл) і ністатин (50 мкг/мл).

Ідентифікацію актиноміцетів здійснювали за морфологічними і культуральними ознаками на середовищі Гаузе 1 [5]. Для визначення їхніх антагоністичних властивостей як тест-культури використовували бактерії *Bacillus subtilis* ATCC 31324, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (F-51), *Erwinia amylovora* Mi2, *Pseudomonas syringae* Mi1, *Pseudomonas piri* Mi9, дріжджі *Candida famata* VKM Y9 і гриби *Aspergillus awamori* NF142. Штами фітопатогенних бактерій виділені з уражених дерев черешні та груші на території агрофірми «Сади України» в Нікопольському р-ні Дніпропетровської області науковими співробітниками Нікітського ботанічного саду – Національного наукового центру проф. О. В. Митрофановою і проф. І. В. Митрофановою. Усі використані тест-культури зберігаються в Колекції культур мікроорганізмів – продуцентів антибіотиків Львівського національного університету імені Івана Франка. Бактерії вирощували на L-агарі [15], дріжджі – на середовищі Бенета [15], гриби – на середовищі Чапека [2].

Вивчення антагоністичних властивостей виконували таким чином. Ізоляти висівали уколком по 6 шт. на чашку зі середовищем Бенета. На 7 добу росту при 28°C поверхню агару з колоніями актиноміцетів заливали 0,7% L-агаром, у який попередньо вносили  $10^9$  клітин/мл тест-культур. Після цього продовжували інкубування: чашки з бактеріями – при 37°C протягом 24 год, дріжджами – 30°C протягом 24–48 год, грибами – при 22°C протягом 48–72 год. Рівень пригнічення розвитку тест-культур позначали як індекс активності – ІА (відношення діаметра зони пригнічення росту тест-культури до діаметра колонії актиноміцета).

#### Результати і їхнє обговорення

Шляхом прямого посіву водної суспензії змивів з коренів *C. majus* L. виділено 248 штамів актиноміцетів. Найбільше ізолятів отримано на таких середовищах: вівсяне – 81 штам, крохмально-аміачне – 64 штами і ZSSE – 32 штами. На середовищі Гаузе 1, гліцериново-аспарагіновому і гліцериново-пептонному виділили від 20 до 27 штамів.

Вивчення антибіотичної активності виявило, що розвиток грампозитивних бактерій пригнічувало від 37,1 (*S. aureus*) до 46,6% (*B. subtilis*) досліджених штамів актиноміцетів (рис. 1).

Рівень ІА більшості з цих штамів варіював від 1,0 до 3,9 (33,2% активних проти *S. aureus*, 37,8% – *B. subtilis*). Максимальний ІА 7,0–9,9 мало 0,4% ізолятів, які пригнічували розвиток *S. aureus*. Штами, активні проти *B. subtilis*, мали максимальний ІА 10,0–20,0 (0,4%).

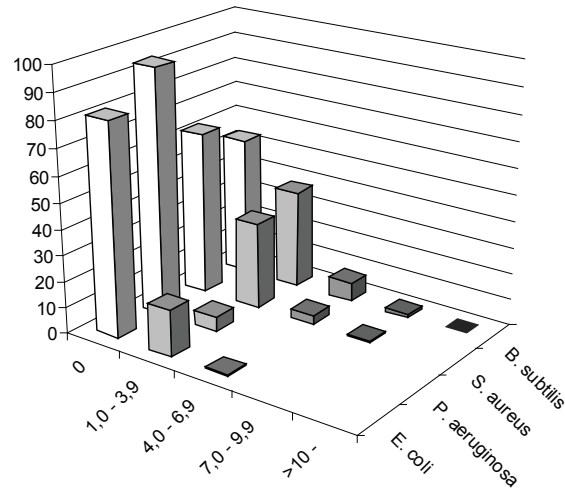


Рис. 1. Рівень антибіотичної активності актиноміцетів із ризосфери *C. majus* L. За віссю абсцис – індекс активності. За віссю ординат – кількість ізолятів, %.

Ріст грамнегативних бактерій пригнічувала менша кількість штамів актиноміцетів (18,4% – *E. coli* і 5,6% – *P. aeruginosa*). Найбільший ІА був у 0,4% ізолятів, які затримували ріст *E. coli*, і коливався в межах 4,0–6,9. ІА штамів, активних проти *P.aeruginosa*, не перевищував 3,9.

Вивчені антагоністичні властивості виділених штамів актиноміцетів проти грамнегативних фітопатогенних бактерій *P. syringae*, *P. piri*, *E. amylovora* (рис. 2).

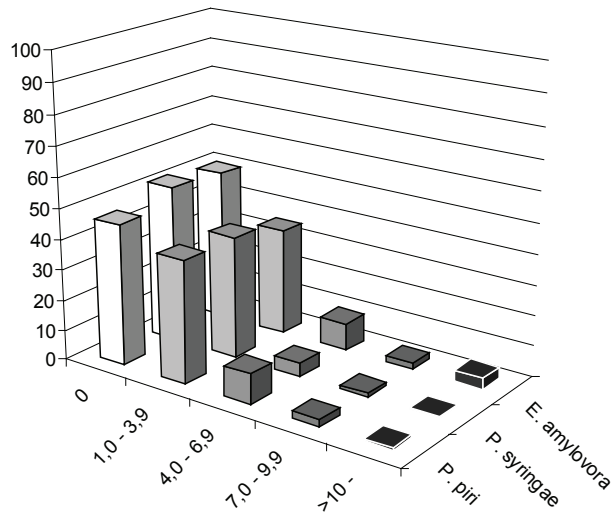


Рис. 2. Рівень пригнічення росту фітопатогенних бактерій актиноміцетами, виділеними з ризосфери *C. majus* L. За віссю абсцис – ІА. За віссю ординат – кількість ізолятів, %.

Половина досліджуваних ізолятів пригнічували розвиток вказаних тест-культур. Більшість із них мали ІА 1,0–3,9. Близько 10% ізолятів – антагоністів *P. piri* і *E. amylovora*, – мали ІА 4,0–6,9. Удвічі менше досліджених штамів актиноміцетів мали такі ж ІА проти *P. syringae*.



Найбільший ІА 10,0–11,7 проти *P. piri* мали 0,8% штамів, порівняно з іншими дослідженими ізолятами. Стільки ж ізолятів мали ІА 10,0–13,6 проти *P. syringae*. Щодо *E. amylovora* виділено найбільше високоактивних штамів (3,7%) з максимальними ІА 10,0–15,0.

Серед досліджених актиноміцетів виявлені антагоністи грибів (рис. 3). Зокрема, майже 10% штамів актиноміцетів затримували ріст дріжджів *C. famata*, половина з них мали ІА 1,0–3,9. Решта штамів більшою мірою пригнічували цю тест-культуру, деякі з них (1,6%) мали ІА від 10,0 до 15,5. Всього 4 штами актиноміцетів з усіх досліджених (1,6%) затримували ріст *A. awamori*, а їхній ІА не перевищував 3,9.

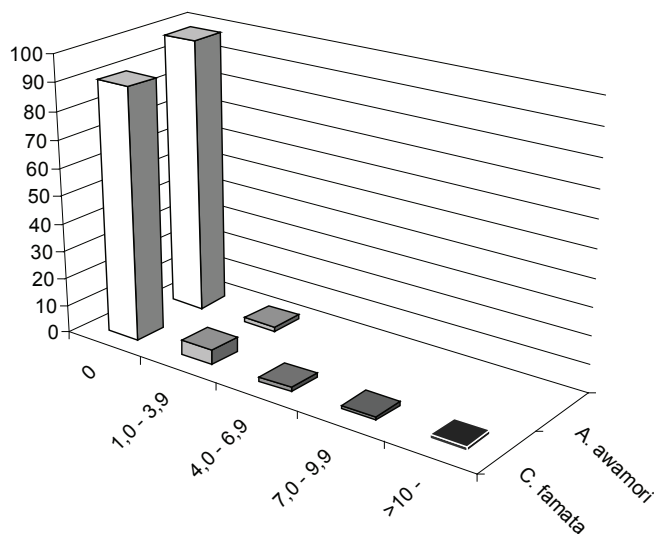


Рис. 3. Рівень фунгіцидної активності штамів актиноміцетів, виділених із ризосфери *C. majus* L. За всією абсцис – ІА. За всією ординат – кількість ізолятів, %.

Близько 15% досліджених штамів актиноміцетів не виявляли активності щодо використаних тест-культур. 10,5% штамів затримували ріст тільки одного збудника. Наприклад, штам Lv 28-52 пригнічує ріст тільки *A. awamori*, а штам Lv 28-78 є сильним антагоністом *E. amylovora* з ІА 14,5 (див. таблицю). Три штами (Lv 28-19, Lv 28-70 і Lv 28-77) пригнічували ріст усіх використаних тест-культур, за винятком *A. awamori*. У деяких штамів був виявлений високий ІА тільки щодо фітопатогенних бактерій і дріжджів *C. famata* (Lv 28-110, Lv 28-143, Lv 28-145, Lv 28-202) (див. таблицю).

Актиноміцетна мікрофлора на території України досліджена слабо. Наявні лише дані про розповсюдження актиноміцетів у ґрунтах південних регіонів України й АР Крим і деякі їхні властивості – протеолітичні активності, здатність утворювати вітаміни, амінокислоти і ферменти [1].

У наших попередніх роботах, присвячених дослідженню актиноміцетів із ризосфери дикорослих лікарських рослин Криму (ялівець високий *Juniperus excelsa* Bieb.) та інтродукованих у Нікітському ботанічному саду (Юкка алоелиста *Yucca aloiofolia*, маслина європейська *Olea europaea* L. та ін.) показано, що багато з них були антагоністами до широкого спектра патогенних бактерій і грибів [3, 4]. Деякі з них виявилися джерелом нових; раніше не описаних біологічно активних сполук, зокрема ліополінової кислоти [24], юніпероліду А [26], пімпринолів А-С [25], рубіміцинону А [23]. Отримані дані послугували поштовхом до вивчення властивостей актиноміцетів, виділених з інших лікарських рослин, що ростуть у різних екоотопах України.

Індекс активності окраних штамів актиноміцетів із ризосфери *C. majus* L.

Штам	Тест-культура								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Lv 28-78	–	–	–	–	–	–	–	14,5	–
Lv 28-52	–	–	–	–	–	–	–	–	2,0
Lv 28-84	8,3	–	–	–	–	–	2,5	–	–
Lv 28-99	–	–	–	–	–	6,8	–	15,0	–
Lv 28-19	1,6	1,6	2,0	3,8	2,7	4,0	2,7	4,0	–
Lv 28-70	1,1	1,1	2,0	2,7	1,3	2,7	3,8	1,6	–
Lv 28-77	1,3	1,3	1,8	3,6	2,0	3,3	3,3	6,7	–
Lv 28-1	–	–	9,0	1,2	–	11,4	8,9	5,7	–
Lv 28-25	3,3	2,9	2,0	5,3	–	4,3	3,1	6,0	–
Lv 28-26	–	1,3	–	2,9	5,1	4,5	2,6	9,6	–
Lv 28-32	1,6	–	2,0	4,0	2,0	3,8	3,2	3,8	–
Lv 28-43	–	1,2	1,5	3,0	2,1	3,8	2,6	3,3	–
Lv 28-59	–	–	1,8	2,7	1,7	3,7	2,9	2,6	–
Lv 28-94	–	–	4,0	–	–	8,6	4,1	8,8	–
Lv 28-110	3,0	1,6	–	5,7	9,8	4,2	3,3	10,0	–
Lv 28-133	3,0	–	5,7	8,8	5,7	7,9	4,7	8,3	–
Lv 28-143	–	2,0	–	5,0	11,0	5,0	5,3	10,0	–
Lv 28-145	–	–	1,1	4,8	13,3	6,4	6,0	10,0	–
Lv 28-182	3,4	–	3,2	–	9,3	7,5	13,6	4,2	–
Lv 28-202	–	–	3,5	5,6	11,0	6,6	9,0	5,3	–
Lv 28-235	2,6	–	2,2	20,0	–	2,2	–	1,8	–

**Примітка.** 1 – *E. coli* ATCC 25922; 2 – *P. aeruginosa* ATCC 27853 (F-51); 3 – *S. aureus* ATCC 25923; 4 – *B. subtilis* ATCC 31324; 5 – *C. famata* VKM Y9; 6 – *P. piri* Mi 9; 7 – *P. syringae* Mi 1; 8 – *E. amylovora* Mi2; 9 – *A. awamori* NF142.

Актиноміцети з ризосфери чистотілу великого, препарати якого мають широкий спектр біологічної дії, цікаві як потенційні продуценти важливих як для медицини, так і для сільського господарства сполук. Крім протипухлинних властивостей, алкалоїди цієї рослини є потужними антибактерійними і фунгіцидними агентами [10, 11, 18–20]. Наприклад, деякі ізохінолінові алкалоїди цієї рослини пригнічують розвиток полірезистентних грибів, а також низки грамнегативних бактерій, які синтезують β-лактамази розширеного спектра [32]. Наявні на сьогодні дані вказують на високу імовірність виділення продуцентів нових біологічно активних сполук серед актиноміцетів, асоційованих з лікарськими рослинами [21]. Серед штамів актиноміцетів, виділених із ризосфери *C. majus* L., виявлена велика кількість антагоністів *S. aureus*, *E. coli*, *C. famata*, а також фітопатогенних бактерій і грибів. Від 1 до 4% досліджених ізолятів мали підвищену активність стосовно *B. subtilis*, *P. piri*, *P. syringae*, *C. famata* (ІА 10,0–20,0). Виходячи з цього, ми припускаємо, що серед штамів актиноміцетів, виділених із ризосфери *C. majus* L., можуть бути продуценти нових біологічно активних сполук.

Дані, отримані в цій роботі, а також результати попередніх наших досліджень, вказують на перспективність подальшого вивчення виділених штамів актиноміцетів, зокрема хімічного аналізу метаболітів, які вони синтезують.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Андреев Е. И., Владимиров Е. В., Коган С. Б. Актиномицеты почв юга Европейской части СССР и их биологическая активность. К.: Наукова думка, 1974. 143 с.
2. Гаузе Г. Ф., Преображенская Т. П., Свешникова М. А. и др. Определитель актиномицетов. Род Streptomyces. М.: Наука, 1983. 245 с.
3. Громико О. Фунгіцидна й антибактерійна активність актиноміцетів, виділених із ризосфери ялівця високого *Juniperus excelsa* Vieb. // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2010. Вип. 53. С. 156–160.

4. Громико О. Антагоністичні властивості актиноміцетів прикореневої зони маслини європейської *Olea europaea* L. // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2012. Вип. 59. С. 209–215.
5. Зенова Г. М. Почвенные актиномицеты редких родов: метод. руководство. М.: Изд-во МГУ, 2000. 81 с.
6. Семенов С. М. Лабораторные среды для актиномицетов и грибов: справочник. М.: Агропромиздат, 1990. 240 с.
7. Berdy J. Bioactive microbial metabolites // J. Antibiot. 2005. Vol. 58. N 1. P. 1–26.
8. Berg G., Smalla K. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere // FEMS Microbiol. Ecol. 2009. Vol. 68. P. 1–13.
9. Crawford D. L., Lynch J. M., Whipps J. M., Ousley M. A. Isolation and characterization of actinomycete antagonists of a fungal root pathogen // Appl. Environ. Microbiol. 1993. Vol. 59. P. 3899–3905.
10. Colombo M. L., Bosisio E. Pharmacological activities of *Chelidonium majus* L. (Papaveraceae) // Pharm. Res. 1996. Vol. 33. Is. 2. P. 127–134.
11. El-Readi M. Z., Eid S., Ashour M. L. et al. Modulation of multidrug resistance in cancer cells by chelidonine and *Chelidonium majus* alkaloids // Phytomedicine. 2013. Vol. 20. P. 282–294.
12. Goryluk A., Rekosz-Burlaga H., Błaszczuk M. Isolation and characterization of bacterial endophytes of *Chelidonium majus* L. // Pol. J. Microbiol. 2009. Vol. 58. N 4. P. 355–361.
13. Jensen P. R., Mincer T. J., Williams P. G., Fenical W. Marine actinomycete diversity and natural product discovery // Antonie Van Leeuwenhoek. 2005. Vol. 87. P. 43–48.
14. Khamna S., Yokota A., Lumyong S. Actinomycetes isolated from medicinal plant rhizosphere soils: diversity and screening of antifungal compounds, indole-3-acetic acid and siderophore production // World J. Microbiol. Biotechnol. 2009. Vol. 25. Is. 4. P. 649–655.
15. Kieser T., Bibb M., Buttner M. et al. Practical Streptomyces genetics. Norwich: John Innes Foundation. 2000. 634 p.
16. Kumar V., Bharti A., Kumar Gupta V. et al. Actinomycetes from solitary wasp mud nest and swallow bird mud nest: isolation and screening for their antibacterial activity // World J. Microbiol. Biotechnol. 2012. Vol. 28. P. 871–880.
17. Lee L.-H., Cheah Y.-K., Sidik S. et al. Molecular characterization of Antarctic actinobacteria and screening for antimicrobial metabolite production // World J. Microbiol. Biotechnol. 2012. Vol. 28. Is. 5. P. 2125–2137.
18. Li X. L., Yao J. Y., Zhou Z. M. et al. Activity of the chelerythrine, a quaternary benzo[c]phenanthridine alkaloid from *Chelidonium majus* L. on *Dactylogyrus intermedius* // Parasitol Res. 2011. Vol. 109. N 1. P. 247–252.
19. Matos O. C., Baeta J., Silva M. J., Pinto Ricardo C. Sensitivity of *Fusarium* strains to *Chelidonium majus* L. extracts // J. Ethnopharmacol. 1999. Vol. 66. N 2. P. 151–158.
20. Meng F., Zuo G., Hao X. et al. Antifungal activity of the benzo[c]phenanthridine alkaloids from *Chelidonium majus* Linn against resistant clinical yeast isolates // J. Ethnopharmacol. 2009. Vol. 125. N 3. P. 494–496.
21. Oldroyd G. Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants // Nature Rev. Microbiol. 2013. Vol. 11. P. 252–263.
22. Qin S., Xing K., Jiang J. H. et al. Biodiversity, bioactive natural products and biotechnological potential of plant-associated endophytic actinobacteria // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2011. Vol. 89. N3. P. 457–473.
23. Raju R., Gromyko O., Fedorenko V. et al. Rubimycinone A, a new anthraquinone from a terrestrial *Streptomyces* sp. // Tetrahedron Letters. 2013. Vol. 54. Is. 8. P. 900–902.

24. Raju R., Gromyko O., Fedorenko V. et al. Leopolic acid A, isolated from a terrestrial actinomycete, *Streptomyces* sp. // *Tetrahedron Letters*. 2012. Vol. 53. Is. 46. P. 6300–6301.
25. Raju R., Gromyko O., Fedorenko V. et al. Pimprinols A–C, from the terrestrial actinomycete, *Streptomyces* sp. // *Tetrahedron Letters*. 2012. Vol. 53. Is. 24. P. 3009–3011.
26. Raju R., Gromyko O., Fedorenko V. et al. Juniperolide A: A New Polyketide Isolated from a Terrestrial Actinomycete, *Streptomyces* sp. // *Organic Lett.* 2012. Vol. 14. Is. 23. P. 5860–5863.
27. Rungin S., Indananda C., Suttiviriya P. et al. Plant growth enhancing effects by a siderophore-producing endophytic streptomycete isolated from a Thai jasmine rice plant (*Oryza sativa* L. cv. KDML105) // *Antonie van Leeuwenhoek*. 2012. Vol. 102. P. 463–472.
28. Strobel G., Daisy B., Castillo U., Harper J. Natural products from endophytic microorganisms // *J. Nat. Prod.* 2004. Vol. 67. P. 257–268.
29. Terkina I. A., Drukker V. V., Parfenova V. V., Kostornova T. Ya. The Biodiversity of Actinomycetes in Lake Baikal // *Microbiol.* 2002. Vol. 71. N 3. P. 346–349.
30. Zhang J. Improvement of an Isolation Medium for Actinomycetes // *Mod. Appl. Sci.* 2011. Vol. 5. N 2. P. 124–127.
31. Zhao K., Penttinen P., Chen Q. et al. The rhizospheres of traditional medicinal plants in Panxi, China, host a diverse selection of actinobacteria with antimicrobial properties // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2012. Vol. 94. N 5. P. 1321–1335.
32. Zuo G.Y., Meng F.Y., Han J. et al. *In vitro* activity of plant extracts and alkaloids against clinical isolates of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing strains // *Molecules*. 2011. Vol. 16. N 7 P. 5453–5459.

Стаття: надійшла до редакції 06.06.13

доопрацьована 06.11.13

прийнята до друку 19.11.13

## ANTAGONISTIC PROPERTIES OF ACTINOMYCETES ISOLATED FROM THE RHIZOSPHERE CELANDINE *CHELIDONIUM MAJUS* L.

O. Gromyko

Ivan Franko National University of Lviv  
4, Hrushevskiyi St., Lviv 79005, Ukraine  
e-mail: o\_gromyko@franko.lviv.ua

With the rhizosphere celandine *Chelidonium majus* L. isolated 248 strains of actinomycetes. Investigated antibacterial and fungicidal properties of selected strains against bacteria and fungi of the genera *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Candida*, *Aspergillus*. We found that 85% of strains of actinomycetes inhibited the development of an organism. Described strains that inhibit the growth of almost all used test cultures, except fungi of the genus *Aspergillus*, about 10% of isolates delayed growth of only one test culture. Some isolates, including strain Lv 28-52, Lv 28-110, Lv28- 142, Lv 28-145, Lv 28-202, at a high level inhibited growth of yeast and pathogenic bacteria. Described in the actinomycetes strains may be potential producers of new bioactive substances.

*Keywords:* actinomycetes, phytopathogenes, antagonistic activity, *Chelidonium majus* L.

**АНТАГОНИСТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА АКТИНОМИЦЕТОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ РИЗОСФЕРЫ ЧИСТОТЕЛА БОЛЬШОГО *CHELIDONIUM MAJUS* L.****А. Громыко**

*Львовский национальный университет имени Ивана Франко  
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина  
e-mail: o\_gromyko@franko.lviv.ua*

Из ризосферы чистотела большого *Chelidonium majus* L. выделено 248 штаммов актиномицетов. Исследованы антибактериальные и фунгицидные свойства выделенных штаммов против бактерий и грибов, представителей родов *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Candida*, *Aspergillus*. Выявлено, что 85% исследованных штаммов актиномицетов угнетали развитие того или иного микроорганизма. Описанные штаммы, которые угнетали рост почти всех использованных тест-культур, за исключением грибов рода *Aspergillus*, около 10% изолятов задерживали рост только одной тест-культуры. Некоторые изоляты, в частности, штаммы Lv 28-52, Lv 28-110, Lv28-142, Lv 28-145, Lv 28-202, на высоком уровне угнетали рост дрожжей и фитопатогенных бактерий. Описанные в работе штаммы актиномицетов могут быть потенциальными продуцентами новых биологически активных соединений.

*Ключевые слова:* актиномицеты, фитопатогенные бактерии, антагонистические свойства, чистотел большой *Chelidonium majus* L.

ФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИН

УДК 581.1: 57.044: 582.683.2

**РАННЄ ЗБІЛЬШЕННЯ ВМІСТУ  $H_2O_2$  І АКТИВНОСТІ ПЕРОКСИРЕДОКСИНУ  
Й ТІОРЕДОКСИНУ В КУЛЬТУРІ ТКАНИНИ *ARABIDOPSIS THALIANA*  
ПРИ ОСМОТИЧНОМУ СТРЕСІ РІЗНОЇ ІНТЕНСИВНОСТІ**

**С. Жадько**

*Інститут ботаніки імені М. Г. Холодного НАН України  
вул. Терещенківська, 2, Київ 01601, Україна  
e-mail: ukrkiev55@mail.ru*

При дії м'якого осмотичного стресу (10% ПЕГ) в культурі тканини *A. thaliana* відбувається поступове збільшення вмісту  $H_2O_2$  і активності пероксиредоксину (ПР) й тіоредоксину (ТР), і ці зміни не можна віднести до ефектів раннього стресового оксидативного спалаху та  $H_2O_2$ -індукованого сигналінгу. Проте при дії сильного осмотичного стресу (25% ПЕГ) відбувається раннє та високоамплітудне збільшення вмісту  $H_2O_2$  з подальшим  $H_2O_2$ -залежним збільшенням активності ПР і ТР і формуванням  $H_2O_2$ -ПР-ТР стресової сигнальної системи. При цьому ПР і ТР, окрім їх антиоксидантної функції, також беруть участь у сприйнятті і трансдукції  $H_2O_2$  редокс сигналів.

*Ключові слова:* культура тканини, осмотичний стрес,  $H_2O_2$  сигналінг, пероксиредоксин, тіоредоксин.

Активні форми кисню (АФК), зокрема  $H_2O_2$ , пероксиредоксини (ПР) і тіоредоксини (ТР) можуть утворювати в клітинах так звану  $H_2O_2$ -ПР-ТР сенсорно-трансдукторну сигнальну систему, яка має важливе значення в розвитку стрес-реакції рослин при різних діях [1, 2, 7, 5]. При цьому АФК утворюються в перші хвилини стресу в процесі раннього стресового оксидативного спалаху (СОС), і потім ці АФК як вторинні месенджери, за участю ПР, викликають збільшення активності ТР у рослин [1, 7]. Це приводить відповідно до ТР-залежного збільшення відновлення дисульфідів у різних білках до сульфгідридів, змінюючи таким чином структуру та функцію багатьох сигнальних білків і беручи участь у регуляції метаболізму клітин. У даному випадку ПР виконують роль акцепторів, а ТР -трансдукторів редокс сигналів від АФК СОС до інших редокс чутливих білків клітин [2, 7, 15].

Раніше нами було показано, що при оксидативному й осмотичному стресах у клітинах культури тканини *A. thaliana* в перші хвилини відбувається раннє стресове збільшення вмісту АФК, які як вторинні месенджери викликають АФК-залежне збільшення активності ПР і ТР. Було висловлено припущення, що в досліджуваній культурі тканини, яка росла у темряві, такі процеси відбуваються в основному в мітохондріях за участю мітохондріальних ПР і ТР, і молекулярний механізм такої відповіді повинен мати свою стрес-специфічність як за дії  $H_2O_2$  (оксидативного стресу), так і за впливу ПЕГ-індукованого осмотичного стресу [1].

Разом із цим, також становить інтерес вивчення дозозалежного характеру прояву  $H_2O_2$ -ПР-ТР сенсорно-трансдукторної системи в реакції рослин при розвитку осмотичного стресу. Проте такі дослідження не проводилися.



Метою даних досліджень було вивчення особливостей ранніх змін вмісту  $H_2O_2$  й активності ПР і ТР у клітинах культури тканини *A. thaliana* при дії низьких і високих концентрацій поліетиленгліколю (ПЕГ) для індукції осмотичного стресу різної інтенсивності.

#### Матеріали та методи

Досліджували 12–14-денну калюсну культуру тканини *A. thaliana*, екотип Columbia, отриману з листків рослин *A. thaliana* в нашій лабораторії Т.В. Воробйовою. Культуру вирощували на середовищі Мурасиге і Скуга в темряві при 24°C. Для створення відносно м'якого або сильного осмотичного стресу, 1000–1500 мг культури тканини поміщали в розчин 10% і 25% ПЕГ-6000 відповідно. Через 30, 60, 90 і 240 хв дії визначали вміст  $H_2O_2$  й активність ПР і ТР спектрофотометричним методом.

Для отримання супернатанту культуру тканини швидко гомогенізували в охолоджених ступках з охолодженим розчином, що містив 50 мМ  $Na_2HPO_4/KH_2PO_4$  (рН 7,0), 0,8% тритон X-100 і 1% полівініл піролідону (ПВП). Потім гомогенат центрифугували при 17000 g протягом 17 хв і в отриманому супернатанті одразу визначали вміст  $H_2O_2$  й активність ПР і ТР. Усі дії проводили на холоді при 4°C [12].

Вміст  $H_2O_2$  визначали за методом Pick, модифікованим за [12]. Реакційна суміш (1 мл) містила 50 мМ калій фосфатного буфера (рН 7,0), 0,6 М фенол-сульфогалейну (phenol red) натрієвої солі, 20 мкл пероксидази хрину (40 одиниць) і 100 мкл екстракту. Через 10 хв інкубації при 37°C аліквоту 450 мкл суміші центрифугували, і реакцію зупиняли додаванням 1 мл 1М NaOH, після чого вимірювали оптичну густина при 600 нм.

Активність ПР визначали спектрофотометрично за окисненням NADPH [10]. Реакційна суміш містила 200 мкМ НАДФН, 3 мкМ ТР, 1,5 мкМ ТР редуктази, 1 мМ ЕДТА в 50 мМ HEPES-NaOH буфера (рН 7,0). Реакцію запускали додаванням  $H_2O_2$  або супернатанту і окислювання НАДФН визначали за 3 хв спектрофотометрично при 340 нм [10].

Активність ТР визначали за допомогою мікрометоду, заснованого на відновленні інсуліну з модифікацією [11]. Реакційна суміш містила 0,26 М HEPES (рН 7,6), 10 мМ ЕДТА, 2 мМ НАДФН, 1 мМ інсуліну і 100 нМ ТР редуктази, супернатант або буфер 100 мкл. Реакцію запускали додаванням супернатанту. Після інкубації при 37°C протягом 20 хв реакцію зупиняли додаванням суміші 0,5 мл 6М гуанідин-HCl, 0,2М Tris-HCl, рН 8,0 та 1 мМ DTNB і вимірювали оптичну густина при 412 нм [11].

Вміст білка визначали за методом Бредфорда [4]. Повторність експериментів 3–5-кратна. Отримані дані опрацьовували статистично [3].

#### Результати і їхнє обговорення

Контрольні зразки культури тканини *A. thaliana* характеризувалися такими середніми даними: вміст  $H_2O_2$  – 19–22 ум. од. на мг білка; активність ПР – 37–42 та ТР – 400–450 ум. од. на мг білка відповідно. Зміни вмісту  $H_2O_2$  і активності ПР і ТР за впливу ПЕГ представлені у відсотках до відповідних контролів.

За дії 10% ПЕГ у культурі тканини відбувалося повільне збільшення вмісту  $H_2O_2$  і активності ПР і ТР з достовірними відмінностями в  $H_2O_2$  і ТР на 24% та 26% лише на 240-й хв (рис. 1, А–3, А).

Проте за дії вищої концентрації ПЕГ (25%) відбувалося швидке і достовірне зростання вмісту  $H_2O_2$  на 37% вже на 30-ту хв і до 240-й хв досліді вміст  $H_2O_2$  значно не змінювався (рис. 1, Б). Раннє збільшення вмісту  $H_2O_2$  індукувало достовірне збільшення активності ПР і ТР на 90-й і 240-й хв дії стресового чинника (рис. 2, Б, 3, Б).

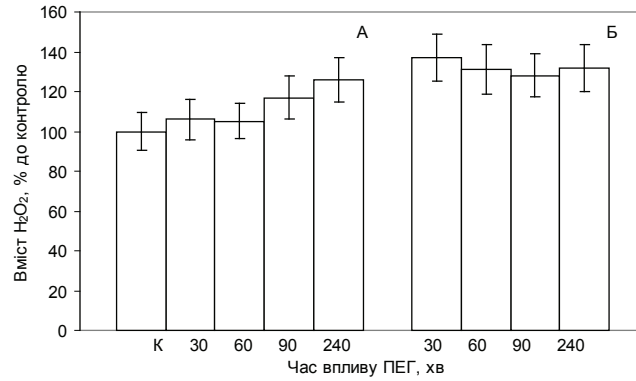


Рис. 1. Динаміка вмісту  $H_2O_2$  в культурі тканини *A. thaliana* за короткострокової дії ПЕГ: А – 10% ПЕГ, Б – 25% ПЕГ, К – контроль.

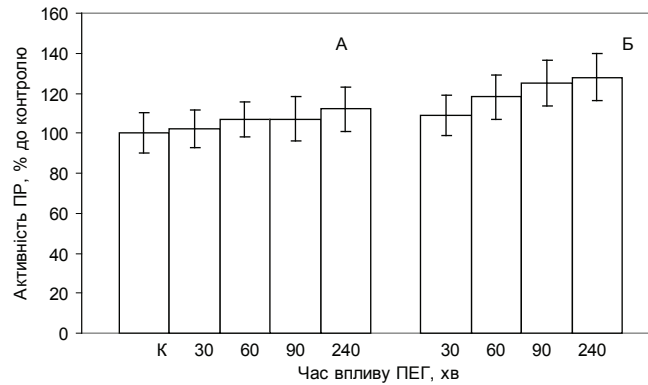


Рис. 2. Динаміка активності пероксиредоксину (ПР) в культурі тканини *A. thaliana* за короткострокової дії ПЕГ. Позначення, як на рис. 1.

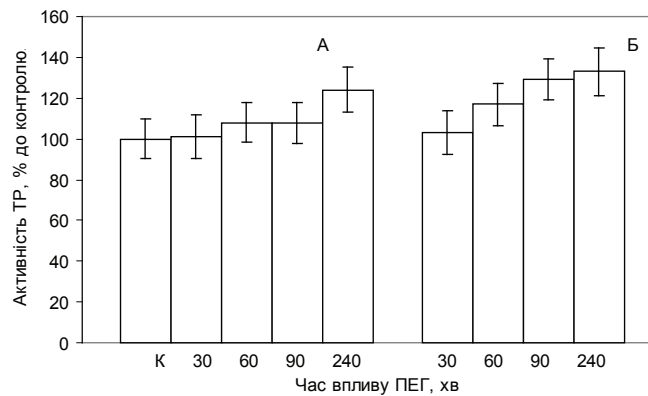


Рис. 3. Динаміка активності тіоредоксину (ТР) в культурі тканини *A. thaliana* за короткострокової дії ПЕГ. Позначення, як на рис. 1.

Отримані дані свідчать, що за дії відносно низької концентрації ПЕГ (10%) у культурі тканини *A. thaliana* на початкових етапах відбувається поступове зростання вмісту  $H_2O_2$  і активності ПР і ТР, зафіксоване нами впродовж 240 хв. Проте за дії вищої концентрації

ПЕГ (25%) раннє стресове збільшення вмісту  $H_2O_2$  відбувається вже в перші хвилини, яке індукує чітке  $H_2O_2$ -залежне зростання активності ПР і ТР (рис. 1–3).

Відомо, що за дії різних стресів, особливо сильних, у рослин вже в перші хвилини відбувається раннє збільшення вмісту активних форм кисню та  $H_2O_2$  у процесі стресового оксидативного спалаху, що зазвичай спричиняє розвиток оксидативної деструкції. При цьому активні форми кисню виконують у метаболізмі клітин подвійну функцію, оксидативно-деструктивну і сигнальну [1, 6, 7, 13, 14]. Для сигнальної функції характерна АФК-залежна активація антиоксидантної системи клітин, особливо швидко збільшується активність антиоксидантних ферментів, зокрема супероксиддисмутази, аскорбат пероксидази, каталази [12, 13], а також ПР і ТР [1, 11, 15]. При цьому якщо супероксиддисмутаза, аскорбат пероксидаза, каталаза та інші ферменти можуть виконувати лише антиоксидантну функцію, пов'язану з відновленням активних форм кисню до нейтральних молекул, то інші антиоксидантні ферменти, ПР і ТР, можуть виступати акцепторами і трансдукторами АФК редокс сигналів, утворюючи так звану редокс сенсорно-трансдукторну  $H_2O_2$ -ПР-ТР сигнальну систему [1, 7, 8].

Слід зазначити, що для активації  $H_2O_2$ -ПР-ТР системи необхідно, щоб у клітинах утворилися надпорогові кількості активних форм кисню, достатні для запуску  $H_2O_2$ -ПР-ТР сигнальної системи, що нами і було виявлено на ранніх стадіях розвитку сильного осмотичного стресу при дії 25% ПЕГ (рис. 1,Б–3,Б). Тому механізм ранньої реакції культури тканини *A. thaliana* на розвиток сильного осмотичного стресу можна представити так: за дії вищої концентрації ПЕГ (25%) відбувається швидкий і високоамплітудний розвиток стресового оксидативного спалаху зі значним накопиченням  $H_2O_2$ , який потім викликає  $H_2O_2$ -залежне збільшення активності ПР і ТР та подальше ТР-індуковане збільшення активності ферментів антиоксидантного захисту [15].

Отже, за дії низької концентрації ПЕГ (10%) і розвитку м'якого осмотичного стресу в культурі тканини *A. thaliana* відбувається поступове збільшення вмісту  $H_2O_2$  й активності ПР і ТР, проте ці зміни не можна віднести до ефектів раннього стресового оксидативного спалаху й АФК-індукованого сигналіну. Проте за дії вищих концентрацій ПЕГ (25%) і розвитку сильного осмотичного стресу відбувається раннє та високоамплітудне збільшення вмісту  $H_2O_2$ , за яким настає раннє і чітко виражене  $H_2O_2$ -залежне зростання активності ПР і ТР з формуванням  $H_2O_2$ -ПР-ТР стресової сигнальної системи. При цьому ПР і ТР, окрім їхньої антиоксидантної функції, також беруть участь у сприйнятті та трансдукції редокс сигналів активних форм кисню.

*Автор висловлює свою вдячність Т. В. Воробійовій за надану культуру тканини A. thaliana і допомогу в проведенні експериментів.*

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Жадько С. И. Стрессорное АФК–зависимое увеличение активности пероксиредоксина, тиоредоксина и тиоредоксин редуктазы в клетках культуры ткани *Arabidopsis thaliana* при действии полиэтиленгликоля и пероксида водорода // Доп. НАН України. 2010. № 1. С. 159–163.
2. Калинина Е. В., Чернов Н. Н., Саприн А. Н. Участие тио-, перокси- и глутаредоксинов в клеточных редокс-зависимых процессах // Успехи биологической химии. 2008. Т. 48. С. 319–358.
3. Плехинский Н. А. Биометрия. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1970. 367 с.

4. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* 1976. Vol. 72. P. 248–254.
5. Brehelin C., Laloi C., Setterdahl A. T. et al. Cytosolic, mitochondrial thioredoxins and thioredoxin reductases in *Arabidopsis thaliana* // *Photosynthesis Research.* 2004. Vol. 79. P. 295–304.
6. Breusegem F. V., Bailey-Serres J., Mittler R. Unraveling the Tapestry of Networks Involving Reactive Oxygen Species in Plants // *Plant Physiol.* 2008. Vol. 147. P. 978–984.
7. Dietz K.-J. Redox signal integration: from stimulus to networks and genes // *Physiologia Plantarum.* 2008. Vol. 133. P. 459–468.
8. Dietz K.-J., Jacob S., Oelze M.-L. et al. The function of peroxiredoxins in plant organelle redox metabolism // *J. Exp. Bot.* 2006. Vol. 57. N 8. P. 1697–1709.
9. Finkemeier I., Goodman M., Lamkemeyer P. et al. The mitochondrial type II peroxiredoxin F is essential for redox homeostasis and root growth of *Arabidopsis thaliana* under stress // *J. Biol. Chem.* 2005. Vol. 280. N 13. P. 12168–12180.
10. Kim J.-A., Park S., Kim K. et al. Activity assay of mammalian 2-cys peroxiredoxins using yeast thioredoxin reductase system // *Analytical Biochem.* 2005. Vol. 338. P. 216–223.
11. Kumar S., Holmgren A. Induction of thioredoxin, thioredoxin reductase and glutaredoxin activity in mouse skin by TPA, a calcium ionophore and other tumor promoters // *Carcinogenesis.* 1999. Vol. 20. N 9. P. 1761–1767.
12. Maksymiec W., Krupa Z. The effects of short-term exposition to Cd, excess Cu ions and jasmonate on oxidative stress appearing in *Arabidopsis thaliana* // *Environmental and Exp. Bot.* 2006. Vol. 57. P. 187–194.
13. Miller G., Shulaev V., Mittler R. Reactive oxygen signaling and abiotic stress // *Physiologia Plantarum.* 2008. Vol. 133. P. 481–489.
14. Mittler R., Vanderauwera S., Suzuki N. et al. ROS signaling: the new wave? // *Trends in Plant Sci.* 2011. Vol. 16. N 6. P. 300–309.
15. Santos C.V.D., Rey P. Plant thioredoxins are key actors in the oxidative stress response // *TRENDS in Plant Science.* 2006. Vol. 11. N 7. P. 329–334.

Стаття: надійшла до редакції 08.04.13

доопрацьована 30.07.13

прийнята до друку 09.09.13

**EARLY INCREASING OF H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> CONTENT AND PEROXIREDOXIN AND THIOREDOXIN ACTIVITIES IN THE TISSUE CULTURE OF *ARABIDOPSIS THALIANA* UNDER OSMOTIC STRESS OF DIFFERENT INTENSITY**

**S. Jadko**

*M.G. Kholodny Institute of Botany, NAS of Ukraine  
2, Tereschenkivska St., Kyiv 01601, Ukraine  
e-mail: ukrkiev55@mail.ru*

Under the mild osmotic stress (10% PEG) in the tissue culture of *A. thaliana* the gradual increasing of the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content and the peroxiredoxin (PR) and thioredoxin (TR) activities take place. These changes can not be relate to effects of an early stress oxidative burst and a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induction signaling. However, under the acute osmotic stress (25% PEG),

there is the early and high peak increasing of the  $H_2O_2$  content with subsequent the  $H_2O_2$ -dependent increasing of the PR and TR activities and forming of the  $H_2O_2$ -PR-TR stress signal system. At the same time the PR and TR, besides their antioxidant function, also participate in the acceptance and transduction of the  $H_2O_2$  redox signals.

*Keywords:* tissue culture, osmotic stress,  $H_2O_2$  signaling, peroxiredoxin, thioredoxin.

**РАННЕЕ УВЕЛИЧЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ  $H_2O_2$  И АКТИВНОСТИ ПЕРОКСИРЕДОКСИНА И ТИОРЕДОКСИНА В КУЛЬТУРЕ ТКАНИ *ARABIDOPSIS THALIANA* ПРИ ОСМОТИЧЕСКОМ СТРЕССЕ РАЗЛИЧНОЙ ИНТЕНСИВНОСТИ**

**С. Жадько**

*Институт ботаники имени М.Г. Холодного НАН Украины  
ул. Терещенковская, 2, Киев 01601, Украина  
e-mail: ukrkiev55@mail.ru*

При действии мягкого осмотического стресса (10% ПЭГ) в культуре ткани *A. thaliana* происходит постепенное увеличение содержания  $H_2O_2$  и активности пероксиредоксина (ПР) и тиоредоксина (ТР), и эти изменения нельзя отнести к эффектам ранней стрессорной оксидативной вспышки и  $H_2O_2$ -индуцируемого сигналинга. Однако при действии острого осмотического стресса (25% ПЭГ) происходит раннее и высокоамплитудное увеличение содержания  $H_2O_2$  с последующим  $H_2O_2$ -зависимым увеличением активности ПР и ТР и с формированием  $H_2O_2$ -ПР-ТР стрессорной сигнальной системы. При этом ПР и ТР, кроме их антиоксидантной функции, также участвуют в акцепции и трансдукции  $H_2O_2$  редокс сигналов.

*Ключевые слова:* культура ткани, осмотический стресс,  $H_2O_2$  сигналинг, пероксиредоксин, тиоредоксин.

## ЗМІНИ АКТИВНОСТІ ФЕРМЕНТІВ АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ В ВЕГЕТАТИВНИХ ОРГАНАХ *POPULUS NIGRA* L. В УМОВАХ АЕРОТЕХНОГЕННОГО ЗАБРУДНЕННЯ СЕРЕДОВИЩА

**В. Більчук, Г. Россихіна-Галича**

*Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара  
пр. Гагаріна, 72, Дніпропетровськ 49010, Україна  
e-mail: anna-rossihina@rambler.ru*

Досліджено зміни активності основних оксидоредуктаз у вегетативних органах *Populus nigra* L. в умовах дії полікомпонентних забруднювачів у процесі онтогенезу. Встановлено, що за хронічної дії поллютантів відбувається активація супероксиддисмутази (СОД), каталази та пероксидази на різних етапах фенологічного циклу. При цьому активність СОД дослідних рослин перевищувала контроль в 1,5–1,7 разу; пероксидази – в 1,3–1,5 разу; каталази – 1,4–2,1 разу залежно від фази розвитку і тривалості дії стрес-фактора. Підвищення активності оксидоредуктаз підтверджує факт газостійкості *Populus nigra* L. в умовах аерогенного забруднення. Виявлено кореляційні зв'язки між активністю антиоксидантів вегетативних органів рослин у процесі онтогенетичного розвитку. Наведені рівняння регресії.

*Ключові слова:* *Populus nigra* L., вегетативні органи, аеротехногенне забруднення, антиоксидантні ферменти, супероксиддисмутаза, каталаза, пероксидаза.

Аеротехногенне забруднення середовища є однією з найскладніших і важко вирішуваних проблем. У результаті дії цього фактора відбувається зниження біорізноманіття рослинних організмів як на міжвидовому, так і на внутрішньовидовому рівнях за рахунок елімінації найменш стійких індивідуумів [9]. Аеротоксиканти, які надходять до асиміляційних органів, викликають зміни в інтенсивності біохімічних процесів, фотосинтезі, диханні, біосинтезі білків та інших речовин, функціонуванні системи антиоксидантного захисту. Участь антиоксидантних ферментів у процесах формування захисних реакцій деревних порід в умовах дії багатокомпонентної системи забруднень атмосфери вивчено недостатньо [6, 10].

Для об'єктивної оцінки адаптаційної здатності деревних порід у процесі онтогенезу можна використовувати активність антиоксидантних ферментів як діагностичні критерії. У зв'язку з цим метою роботи було дослідження індивідуальної мінливості показників оксидоредуктаз, особливості ферментативних окисно-відновних реакцій, ступеня їх взаємозв'язку в листках стійких рослин на прикладі *Populus nigra* L. в умовах аеротехногенного забруднення.

### **Матеріали та методи**

Об'єктами натурних досліджень були листки *Populus nigra* L. (тополі чорної), яка зростає вздовж автотраси Донецьк-Київ, що проходить через смт Петропавлівка Дніпропетровської області. Поблизу дослідної ділянки розміщена вугільна шахта «Степова». Як умовний контроль вибрана територія зони відпочинку поблизу хвойного лісу та р. Самари (на відстані 17 км. від забрудненої території), де росла *Populus nigra* L. Вибір насаджень проведено згідно з ступенем забруднення ґрунту й атмосферного повітря.

Оцінку онтогенетичного стану *Populus nigra* L. проводили у фази активного (травень), пасивного росту (липень) та початку фізіологічного спокою (серпень).



Наважку листків розтирали при 4°C у порцеляновій ступці з буферними розчинами у співвідношенні 1:10, при визначенні активності СОД застосовували 0,1 М фосфатний буфер (рН 7,8), а при визначенні активності каталази і пероксидази – 0,2 М ацетатний буфер (рН 5,4). Одержаний гомогенат центрифугували протягом 20 хв при 15000 g при 4°C. Супернатант переносили в чисті сухі пробірки і використовували як ферментний препарат при проведенні реакцій.

Стан антиоксидантної системи рослин оцінювали за активністю основних ферментів-детоксикантів активних форм кисню. Активність СОД визначали за рівнем гальмування процесу відновлення нітросинього тетразолію (НСТ) у присутності НАДН і феназинметасульфату (ФМС) згідно з [13]. Реакційна суміш містила 1,2 мл 0,15 М Na-фосфатного буферу (рН 7,8), 0,1 мл 0,160 мМ ФМС, 0,3 мл 0,610 мМ НСТ, 0,3 мл супернатанту. Реакцію ініціювали додаванням 0,2 мл 1 мМ НАДН і зупиняли 1 мл льодяної оцтової кислоти.

Каталазну активність оцінювали за титриметричним методом [14] і виражали в ммоль перекису водню, розкладеного за хвилину.

Активність пероксидази визначали за швидкістю реакції окиснення бензидину згідно з [12] й виражали в умовних одиницях.

Статистичну обробку даних і кореляційно-регресивний аналіз здійснено за допомогою програми Microsoft Statistica 6.0, розбіжності між вибірками вважали значущими при  $p < 0,05$ .

### Результати і їхнє обговорення

Одним із найважливіших ферментів антиоксидантної системи є СОД, яка каталізує дисмутацію супероксидних радикалів і забезпечує обрив ланцюга киснезалежних вільнорадикальних реакцій у клітинах [6, 15, 20]. Активність СОД є показником неспецифічної резистентності рослинного організму до стресових чинників.

Як свідчать результати даної роботи, в ході онтогенезу у вегетативних органах *Populus nigra* L. спостерігається широке варіювання значень активності супероксиддисмутази (рис. 1). Вегетативний період для *Populus nigra* L., який починається з кінця квітня і триває до початку вересня, супроводжується зростанням активності ферменту. Максимум активності зафіксовано в середині липня, що, очевидно, пов'язано з підвищеною інтенсивністю росту в міжфазний період. Деяке зниження показника ферментативної активності збігається з кінцем вегетаційного періоду. При цьому величина активності супероксиддисмутази становить  $25,8 \pm 1,4$  ум.од./хв·г наважки і близька до значень рівня ензиму в період активного росту (травень-червень). Дія антропогенних викидів призводила до підвищення активності ферменту в усі фенотипічні фази. На початку росту пагонів і цвітіння цей показник перевищував контроль в 1,5 разу, а в період інтенсивного росту – в 2,1 разу.

У кінці серпня, в фазу переходу рослин до фізіологічного спокою, в умовах забруднення середовища спостерігали зниження активності СОД порівняно з іншими фенофазами, але її рівень перевищував контрольні зразки в 1,4 разу. Згідно з літературними даними, за дії хронічного техногенного навантаження активність СОД у нестійких рослин знижується [1, 4], тобто *Populus nigra* L. за цим показником належить до стійкого виду проти умов аеротехногенного забруднення, що узгоджується з даними Н.Г. Лук'янчук [11].

Відомо, що активація СОД за дії техногенного навантаження на рослини призводить до посилення накопичення пероксиду водню, який, у свою чергу, є сильним окиснювачем і негативно впливає на метаболічні процеси рослин [5, 15, 16, 19].

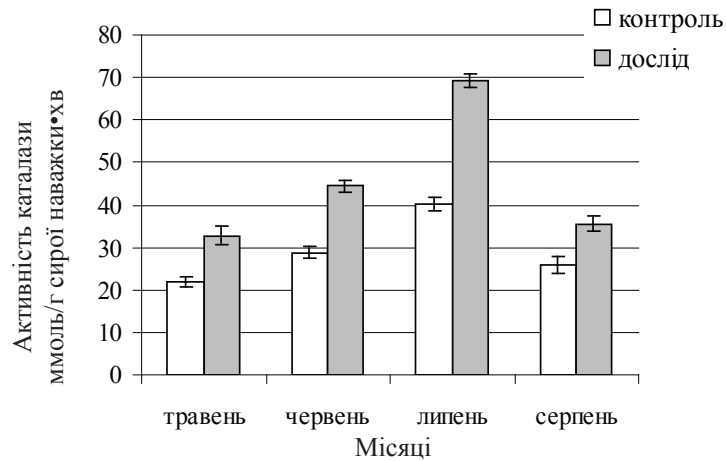


Рис. 1. Вплив аеротехногенного забруднення на активність супероксиддисмутаз у вегетативних органах *Populus nigra* L. у процесі онтогенезу. Похибка вибірки не перевищує 5% від середніх значень.

Важлива роль в обміні речовин, у процесах адаптації організму до стрес-факторів відводиться каталазі (КАТ), яка є одним із найбільш активних ферментів у рослинах [21] і каталізує процес розкладу пероксиду водню на воду та молекулярний кисень. Нами було встановлено, що вегетативні органи проявляють різну каталазну активність, як у процесах онтогенетичного розвитку, так і в залежності від забруднення середовища (рис. 2). Аналіз показав, що листки *Populus nigra* L. мали найбільший рівень активності у фазу вторинного росту (липень), що узгоджується з високим рівнем активності супероксиддисмутаз. Дія забруднювачів призводила до підвищення активності каталази у всі фази фенотипічного розвитку. У фазу активного росту (травень) за дії стрес-факторів активність каталази дослідних зразків становила 0,83 ммоль  $H_2O_2$ /г сирової наважки\*хв, що перевищувало контроль в 1,4 разу. В період вторинного росту вегетативних органів забруднювачі повітря викликали зростання активності ферменту в 1,6 разу порівняно з контролем. Найбільші відмінності за активністю ферменту контрольних і дослідних листків спостерігали в період інтенсивного росту *Populus nigra* L. За дії токсикантів рівень активності каталази підвищувався удвічі. Тривала дія забруднювачів на рослини *Populus nigra* L. викликала інтенсифікацію каталазної реакції. При цьому рівень активності ферменту дослідних зразків перевищував контроль в 1,6 разу.

Зафіксоване нами підвищення активності каталази за умов дії аерополлютантів узгоджується з даними М. Г. Половникової та О. Л. Воскресенської [17]. Така зміна активності ферменту свідчать про стійкість рослинних організмів до техногенного забруднення.

У реакціях знешкодження пероксиду водню, який утворюється в результаті функціонування СОД, бере участь і пероксидаза. Як свідчать результати в ході вегетаційного періоду *Populus nigra* L., спостерігається широке варіювання значень активності ферменту. Динаміка пероксидазної активності при переході від фази активного росту до початку фізіологічного спокою у вегетативних органах *Populus nigra* L. контрольних і дослідних рослин, була спрямована в бік її підвищення (рис. 3). Дія багатоконпонентних токсичних викидів призводила до зростання активності ферменту у процесі онтогенезу від 20 до 50%. При цьому найбільший рівень активності ферменту був притаманний вегетативним органам

*Populus nigra* L. в умовах дії полутантів у період їх максимального росту. Одержані дані корелюють із підвищеним рівнем активності СОД і узгоджуються з результатами робіт інших авторів [2, 3, 7, 8, 18]. Тобто максимальна активність антиоксидантів збігається з періодом інтенсивного росту вегетативних органів.

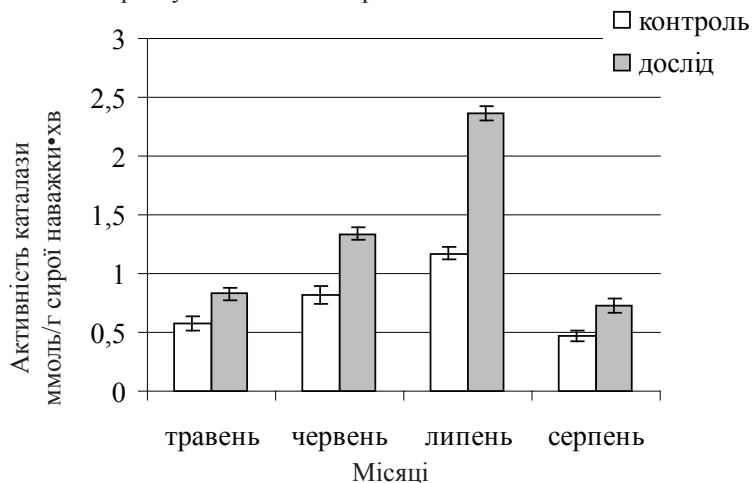


Рис. 2. Вплив аеротехногенного забруднення на активність каталази у вегетативних органах *Populus nigra* L. у процесі онтогенезу. Похибка вибірки не перевищує 5% від середніх значень.

Таким чином, підвищення активності трьох ферментів системи антиоксидантного захисту забезпечує виживання рослинних організмів за тривалої дії стрес-факторів.

Подальший аналіз отриманих даних спрямовано на встановлення закономірностей функціональних зв'язків між компонентами антиоксидантного захисту в листках *Populus nigra* L. контрольних і дослідних зразків у зв'язку з дією аерогенного забруднення. Методом кореляційно-регресивного аналізу встановлена достовірна кореляція активності СОД із підвищеним рівнем пероксидази та каталази, що свідчить про ефективність антиоксидантного захисту і збалансованість реакції антиоксидантів. При цьому коефіцієнти кореляції мають високі значення ( $r=0,94\div 0,98$ ) (табл. 1).

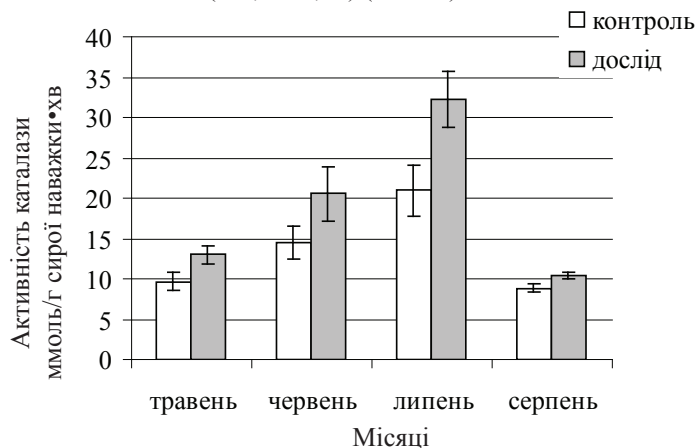


Рис. 3. Вплив аеротехногенного забруднення на активність пероксидази у вегетативних органах *Populus nigra* L. у процесі онтогенезу. Похибка вибірки не перевищує 5% від середніх значень.

Таблиця 1

Кореляційні залежності між активністю оксидоредуктаз у листках *Populus nigra* L. в умовах аеротехногенного забруднення

Показник	СОД	Каталаза	Пероксидаза
СОД	–	0,98	0,94
Каталаза	0,98	–	0,98
Пероксидаза	0,94	0,98	–

Між активністю СОД та інших оксидоредуктаз вегетативних органів встановлена лінійна залежність, яка описується рівняннями регресії (табл. 2). Високі значення коефіцієнтів детермінації (0,89–0,96) вказують на тісний зв'язок між рівнем супероксиддисмутази й активностями каталази і пероксидази, які каталізують розкладання продуктів перетворення супероксидного радикала. Наявність взаємозв'язку між активністю пероксидази та каталази в умовах аерогенного забруднення, можливо, пояснюється необхідністю їх сумісної участі в детоксикації активних форм кисню у процесі адаптації рослинних організмів. Одержані рівняння регресії статистично достовірні та дають змогу прогнозувати величини антиоксидантів у даних умовах.

Особливістю стійкого виду *Populus nigra* L. є практично незмінні взаємозв'язки між компонентами антиоксидантного захисту контрольних і дослідних рослин.

Таблиця 2

Регресійні залежності між активністю оксидоредуктаз у листках *Populus nigra* L. в умовах аеротехногенного забруднення

Взаємозв'язок між ферментами	Коефіцієнт детермінації	F	p<0,05	Рівняння регресії
СОД(y)–ПЕР(x) контроль	0,91	96,15	1,9E-06	$y=1,33x+11,2$
СОД(y)–ПЕР(x) дослід	0,95	184,99	8,9E-08	$y=1,66x+13,9$
СОД(y)–КАТ(x) контроль	0,86	60,32	1,5E-05	$y=23,38x+11,5$
СОД(y)–КАТ(x) дослід	0,98	561,12	4,1E-10	$y=22,12x+16,3$
ПЕР(y)–КАТ(x) контроль	0,99	827,72	5,9E-11	$y=17,90x-0,098$
ПЕР(y)–КАТ(x) дослід	0,99	887,75	4,2E-11	$y=13,03x+1,58$
КАТ(y)–ПЕР(x) контроль	0,99	827,73	5,9E-11	$y=0,055x+0,015$
КАТ(y)–ПЕР(x) дослід	0,99	887,75	4,24E-11	$y=0,076x-0,13$

Встановлено, що за дії поллютантів, які індукують оксидативний стрес, відбувається активація ферментів антиоксидантного захисту СОД, каталази, пероксидази у вегетативних органах *Populus nigra* L. в процесі онтогенезу, що забезпечує його стійкість до аеротехногенного забруднення.

Процес адаптації рослин *Populus nigra* L. до стрес-чинників відбувається за рахунок підвищення активності СОД в 1,5–1,7 разу, пероксидази – в 1,3–1,5 разу та каталази – в 1,4–2,1 разу залежно від фази розвитку й терміну дії токсикантів.

Встановлено наявність тісних кореляційних зв'язків між активністю СОД і каталази, СОД і пероксидази у листках *Populus nigra* L. у процесі онтогенетичного розвитку за стресових умов.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Бессонова В. П. Цитофизиологические эффекты воздействия тяжелых металлов на рост и развитие растений. Запорожье: Запор. гос. ун-т, 1999. 208 с.
2. Виноградова Е. Н. Кинетические свойства и компонентный состав пероксидазы листьев *Populus deltoids* Marsh и *Fraxinus lanceolata* Borkh в условиях техногенного загрязнения // Промышленная ботаника. 2007. Вып. 7. С. 63–68.
3. Виноградова Е. Н. Пероксидазная активность в клетках листьев древесных растений в связи с их устойчивостью к выбросам коксохимического предприятия // Промышленная ботаника. 2006. Вып. 6. С. 35–40.
4. Гуральчук Ж. З. Фітотоксичність важких металів та стійкість рослин до їх дії. К.: Логос, 2006. 208 с.
5. Квеситадзе Г. И., Хатисаишвили Г. А., Садунишвили Т. А., Евстегнеева З. Г. Метаболизм антропогенных токсикантов в высших растениях. М.: Наука, 2005. 199 с.
6. Кордюм Е. Л., Сытник К. М., Бараненко В. В. и др. Клеточные механизмы адаптации растений к неблагоприятным воздействиям экологических факторов в естественных условиях. К.: Наукова думка, 2005. 278 с.
7. Коршиков И. И. Адаптация растений к условиям техногенно загрязненной среды. К.: Наукова думка, 1996. 237 с.
8. Коршиков И. И., Котов В. С., Михеенко И. П. и др. Взаимодействие растений с техногенно-загрязненной средой: монография. К.: Наукова думка, 1995. 190 с.
9. Коршиков И. И., Терлыга Н. С., Бычков С. А. Популяционно-генетические проблемы дендротехногенной интродукции. Донецк: Лебедь, 2002. 328 с.
10. Косаківська І. В. Екологічний напрям у фізіології рослин: досягнення й перспективи // Физиология и биохимия культурных растений. 2007. Т. 39. № 4. С. 279–290.
11. Лук'янчук Н. Г., Чмир Р. М. Вплив автомобільного транспорту на паркові фітоценози м. Львова // Наук. вісн. нац. лісотехн. ун-ту України. 2007. Вип. 17.7. С. 71–76.
12. Методы биохимического исследования растений / под ред. А.И. Ермакова, 3-е изд. Л.: Агропромиздат, 1987. 430 с.
13. Персегина И. А. Активность антиоксидантных ферментов слюны здоровых детей // Лаб. дело. 1989. № 11. С. 20–23.
14. Плешков Б. П. Практикум по биохимии растений. М.: Колос, 1968. 183 с.
15. Поберезкина Н. Б., Осинская Л. Ф. Биологическая роль супероксиддисмутазы // Укр. биохим. журнал. 1989. Т. 61. № 2. С. 14–27.
16. Полесская О. Г. Изменение активности антиоксидантных ферментов в листьях и корнях пшеницы в зависимости от форм и дозы азота в среде // Физиология растений. 2004. Т. 51. № 5. С. 686–691.
17. Половникова М. Г., Воскресенская О. Л. Активность компонентов антиоксидантной защиты и полифенолоксидазы у газонных растений в онтогенезе в условиях городской среды // Физиология растений. 2008. Т. 55. № 5. С. 777–785.
18. Стороженко В. О. Ключові антиоксидантні ферменти фотосинтетичного апарату вищих рослин за стресових чинників // Физиология и биохимия культ. растений. 2004. Т. 36. № 1. С. 36–47.
19. Таран Н. Ю., Оканенко О. А., Боцманова Л. М. та ін. Вторинний оксидний стрес як елемент адаптивної відповіді рослин на дію несприятливих факторів довкілля // Физиология и биохимия культ. растений. 2004. Т. 36. № 1. С. 3–14.
20. Трач В. В., Стороженко А. В. Супероксиддисмутаза как компонент антиоксидантной системы при абиотических стрессовых воздействиях // Физиология и биохимия культ. растений. 2007. Т. 39. № 4. С. 291–302.
21. Чиркова Т. В. Физиологические основы устойчивости растений. СПб.: Изд-во СПбГУ, 2002. 244 с.

Стаття: надійшла до редакції 01.06.13

доопрацьована 20.01.14

прийнята до друку 21.01.14

## CHANGES IN THE ACTIVITY OF ANTIOXIDANT ENZYMES IN VEGETATIVE ORGANS *POPULUS NIGRA* L. IN THE MATTER OF ENVIRONMENTAL CONTAMINATION

V. Bilchuck, A. Rossikhina-Galycha

Oles Gonchar Dnipropetrovsk National University  
72, Gagarin Ave., Dnipropetrovsk 49010, Ukraine  
e-mail: anna-rossihina@rambler.ru

The changes in the activity of the main oxidoreductases in vegetative organs of *Populus nigra* L. under the action of multicomponent pollutants during ontogenesis are revealed. It is established, that at chronic action of pollutants an activation of superoxide dismutase (SOD), catalase and peroxidase in different stages of phenological cycle is occurred. Thus SOD activity of the investigated plants exceeds the control in 1.5–1.7; peroxidase – in 1.3–1.5, catalase – to 1.4–2.1 times depending on the development phase and duration of stress factor. Increased activity of oxidoreductases confirms the gas resistance of *Populus nigra* L. in conditions of aerogenic contamination. The presence of correlation between the antioxidant activity of the vegetative organs of plants in the process of ontogenetic development is revealed. The equations of regression are adduced.

*Keywords:* *Populus nigra* L., vegetative organs, environmental contamination, anti-oxidant enzymes, superoxide dismutase, catalase, peroxidase.

## ИЗМЕНЕНИЯ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ В ВЕГЕТАТИВНЫХ ОРГАНАХ *POPULUS NIGRA* L. В УСЛОВИЯХ АЭРОТЕХНОГЕННОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ СРЕДЫ

В. Бильчук, А. Россихина-Галыча

Днепропетровский национальный университет имени Олеса Гончара  
пр. Гагарина, 72, Днепропетровск 49010, Украина  
e-mail: anna-rossihina@rambler.ru

Исследованы изменения активности основных оксидоредуктаз в вегетативных органах *Populus nigra* L. в условиях действия поликомпонентных загрязнителей в процессе онтогенеза. Установлено, что при хроническом действии поллютантов происходит активация супероксиддисмутазы (СОД), каталазы и пероксидазы на разных этапах фенологического цикла. При этом активность СОД опытных растений превышает контроль в 1,5–1,7 раза; пероксидаза – в 1,3–1,5 раза; каталаза – в 1,4–2,1 раза в зависимости от фазы развития и продолжительности действия стресс-фактора. Повышение активности оксидоредуктаз подтверждает факт газоустойчивости *Populus nigra* L. в условиях аэрогенного загрязнения. Выявлено наличие корреляционных связей между активностью антиоксидантов вегетативных органов растений в процессе онтогенетического развития. Приведены уравнения регрессии.

*Ключевые слова:* *Populus nigra* L., вегетативные органы, аэротехногенное загрязнение, антиоксидантные ферменты, супероксиддисмутаза, каталаза, пероксидаза.



## ВПЛИВ *MICROCOCCUS LUTEUS* ЛБК1 НА РІСТ РОСЛИН СОРТІВ/ГІБРИДІВ ОГІРКА І ПЕРЦЮ СОЛОДКОГО

А. Парфенюк, О. Стерлікова, І. Безноско\*

*Інститут агроєкології і природокористування НААН України*  
*вул. Метрологічна, 12, Київ 03143, Україна*  
*e-mail: beznosko.ira@mail.ru*

Вивчено вплив бактеріальної культури *M. luteus* ЛБК1 на ріст рослин сортів/гібридів огірка та перцю солодкого. Встановлено її здатність стимулювати ріст кореня, наземної частини рослин і їх маси. Це є підставою допускати, що досліджуваний штам може бути застосований у виробництві як стимулятор росту зазначених культур і підвищувати їхню продуктивність у агрофітоценозах.

*Ключові слова:* *M. luteus* ЛБК1, сорти/гібриди огірка і перцю солодкого, ріст рослин, агрофітоценоз.

Використання різноманітних засобів хімічного контролю фітопатогенних грибів призводить до значного накопичення в агроценозах залишків пестицидів та інших токсичних сполук, які забруднюють природне середовище, знижують якість продукції сільського господарства [3]. Необхідність відтворювати і берегти біологічне різноманіття фітоценозів на рівні, що забезпечує стабільність природного середовища, лежить в основі органічного землеробства.

У сучасних аграрних технологіях дедалі більшого поширення набувають біотехнологічні засоби вирощування рослин. За допомогою створення асоціацій рослин із мікроорганізмами отримують безпечні для довкілля та здоров'я людини мікробіологічні препарати захисту і підвищення продуктивності рослин. Біологічні засоби можуть частково або повністю замінити хімічні пестициди і добрива та слугувати для отримання екологічно чистої продукції. Найбільш перспективним є використання саме ендofітних мікроорганізмів, оскільки, порівняно з вільноіснуючими бактеріями, вони утворюють стабільніші асоціації з рослиною і виживають у тканинах рослин протягом вегетації [5].

Різні види ендofітних бактерій контамінують рослинні тканини і виконують певні функції. Одні з них можуть брати участь у захисті рослин від захворювань, спричинених патогенними мікроскопічними грибами та бактеріями, а також комахами та нематодами, інші – постачають рослинам поживні речовини (біологічний азот, мінеральні речовини тощо) [7, 10].

Як свідчить аналіз літератури, *M. luteus* характеризується високою антигрибною і стимулювальною активністю, а її культуральна рідина значно пригнічує ріст фітопатогенних грибів [6]. Є чимало фактів, які свідчать про можливість бактерій стимулювати ріст рослин шляхом постачання їм біологічного азоту, фітогормонів, а також виділення метаболітів з антимікробною дією, здатних захищати рослини від захворювань, спричинених патогенними мікроорганізмами [7].

В аграрному виробництві важливе місце займають овочеві культури, такі як перець солодкий та огірок, – вони характеризуються високим вмістом фізіологічно активних речовин. Ці овочі цінні завдяки великій кількості вітамінів В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>, Р, А, РР, Е, цукрів, органічних кислот (лимонна, яблучна та щавлева), ліпідів і сирової клітковини. Також

вони відзначаються різноманітним складом мінеральних солей. У складі золи плодів є солі калію, натрію, кальцію, магнію, заліза, алюмінію, фосфору, сірки, хлору, марганцю, міді, цинку, фтору, йоду [2]. Останніми роками дедалі частіше овочеві культури зазнають негативного впливу як від біотичних, так і від абіотичних факторів, що пригнічує ріст і розвиток рослин, впливаючи на урожайність даних культур. Зниження урожаю перцю солодкого та огірка стало наслідком падіння загальної культури землеробства.

Тому метою досліджень було вивчити вплив ендоефітної асоційованої бактерії *M. luteus* ЛБК1 на ріст рослин сортів/гібридів огірка та перцю солодкого.

#### Матеріали та методи

Для досліджень впливу ендоефітної бактерії *M. luteus* ЛБК1 на ріст рослин сортів/гібридів огірка та перцю солодкого було відібрано сорти/гібриди огірка Лінія П-1, СМФ-795 F1, Далекосхідний 27/17, Сквирський 1/27 П F1 та перцю солодкого Валюша, Надія, Обрій, Данко. В експериментах з інокуляції використовували штам *M. luteus* ЛБК1 із колекції Інституту молекулярної біології та генетики НААН України.

Для отримання робочої суспензії бактеріальний штам вирощували на рідкому поживному середовищі протягом 2-х діб при температурі 20–26°C на шейкері при 120 об/хв. [8]. Бактеріальні клітини осаджували в епіндорфах по 1,5 мл суспензії при 3000 об/хв протягом 6 хв. Отримували бактеріальну суспензію концентрацією  $10^8$  кл/мл, розбавляючи отриманий осад у стерильній воді та підраховуючи бактеріальні клітини в камері Горяєва-Тома [1].

Насіння сортів/гібридів огірка та перцю солодкого стерилізували за ДСТУ 4138:2002, промивали проточною водою протягом години, потім у етиловому спирті (70%) протягом 1 хв, у соляній кислоті (10%) 3 хв, у гіпохлориді натрію (50%) протягом 5 хв [4]. Після цього відмивали шестикратно по 20 хв у стерильній дистильованій воді.

Простерилізоване насіння по 100 шт. кожного сорту/гібриду в асептичних умовах розкладали у стерильні чашки Петрі й інокулювали бактеріальною суспензією протягом 5 хв. У контрольному варіанті використовували стерильну воду. Після цього насіння просушували протягом 30 с на стерильному фільтрувальному папері й переносили у стерильні банки з кришками, що мають отвори для повітря. Дослід закладали у трьох повтореннях. Інокульовані рослини культивували при 16-годинному світловому фотоперіоді, температурі 24°C, освітленості 4 тис. люкс до появи проростків (огірок – 15 діб, перець – 28 діб). Аналіз схожості результатів виражали у відсотках. Схожість насіння сортів/гібридів огірка становила 87%, перцю солодкого – 80%. Для досліджень використовували всі пророслі насінини.

Для визначення ефективності контамінації інокульовані рослини розтирали у ступці. Отриману суміш розводили стерильною водою та висівали на поживне агарове середовище за відомою методикою [9]. Визначали кількість рослин, із яких виділялися бактеріальні колонії *M. luteus* ЛБК1.

Вплив ендоефітних бактерій на ріст сортів/гібридів огірка та перцю солодкого проводили за морфометричними вимірами висоти пагона, кореня, корневих волосків і визначення сухої та сирої маси.

#### Результати і їхнє обговорення

За результатами дослідження встановлено позитивний вплив штаму *M. luteus* ЛБК1 на ріст рослин сортів перцю солодкого Данко, Обрій, Валюша, Надія (табл. 1).

В усіх варіантах досліді було відзначено істотний приріст показників при інокуляції ендоефітною бактерією порівняно з контролем. Суха та сира маси збільшувались у середньо-

му вдвічі порівняно з контролем. Наприклад, рослини сорту Данко за інокуляції їх ендоефітною бактерією збільшували суху та сиру маси в середньому вдвічі, а рослини сорту Надія – майже у 1,5 разу. Штам *M. luteus* ЛБК1 істотно стимулював розвиток морфометричних показників сортів перцю солодкого порівняно з контролем. Так, якщо висота 28-ми добових рослин сортів у контролі становила у середньому  $1,1 \pm 0,02$  см, то висота рослин такого ж віку, інокульованих суспензією спор *M. luteus* ЛБК1 сягала  $2,5 \pm 0,05$  см. Подібний взаємозв'язок спостерігали за морфометричних вимірів висоти пагону, довжини кореня, кореневих волосків на інших тестованих сортах. Отримані результати досліджень підтверджуються тим, що контамінація рослин сортів перцю солодкого бактеріальним штамом *M. luteus* ЛБК1 була високою і становила на сортах: Данко – 78%, Надія – 80%, Обрій – 75% і Валюша – 60%. Це дає можливість припускати значну ефективність дії штаму *M. luteus* ЛБК1 на ріст рослин перцю солодкого.

Визначено вплив штаму *M. luteus* ЛБК1 на ріст рослин сортів/гібридів огірка Лінія П-1, СМФ-795 F1, Далекосхідний 27/17 і Сквирський 1/27 П F1 (табл. 2).

Таблиця 1

Вплив штаму ендоефітної бактерії *M. luteus* ЛБК1 на ріст рослин перцю солодкого

Сорт	Висота пагону, см	Довжина кореня, см	Довжина кореневих волосків, см	Маса рослин, мг		
				сира	суха	
Данко	варіант	$2,5 \pm 0,05$	$2,8 \pm 0,06$	$0,09 \pm 0,01$	$304 \pm 6,08$	$48 \pm 0,96$
	контроль	$1,1 \pm 0,02$	$1,3 \pm 0,02$	$0,03 \pm 0,006$	$158 \pm 3,16$	$25 \pm 0,50$
Обрій	варіант	$2,7 \pm 0,05$	$1,5 \pm 0,03$	$0,07 \pm 0,01$	$284 \pm 5,68$	$46 \pm 0,92$
	контроль	$1,0 \pm 0,02$	$0,5 \pm 0,01$	$0,02 \pm 0,004$	$164 \pm 3,28$	$20 \pm 0,40$
Валюша	варіант	$2,1 \pm 0,04$	$1,2 \pm 0,02$	$0,05 \pm 0,01$	$324 \pm 6,48$	$48 \pm 0,96$
	контроль	$0,9 \pm 0,01$	$0,4 \pm 0,008$	$0,02 \pm 0,004$	$194 \pm 3,88$	$29 \pm 0,58$
Надія	варіант	$2,8 \pm 0,06$	$1,9 \pm 0,03$	$0,06 \pm 0,01$	$344 \pm 6,88$	$56 \pm 1,12$
	контроль	$1,2 \pm 0,02$	$0,8 \pm 0,01$	$0,03 \pm 0,006$	$210 \pm 4,20$	$36 \pm 0,72$

Таблиця 2

Вплив штаму ендоефітної бактерії *M. luteus* ЛБК1 на ріст рослин огірка

Сорти/гібриди		Висота пагону, см	Довжина кореня, см	Довжина кореневих волосків, см	Сира маса, г	Суша маса, г
Лінія П-1	варіант	$6,8 \pm 0,1$	$8,6 \pm 0,1$	$0,5 \pm 0,01$	$4,8 \pm 0,09$	$0,25 \pm 0,005$
	контроль	$4,5 \pm 0,09$	$3,8 \pm 0,07$	$0,1 \pm 0,002$	$2,7 \pm 0,05$	$0,10 \pm 0,002$
СМФ-795 F1	варіант	$5,3 \pm 0,1$	$5,0 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,006$	$3,5 \pm 0,07$	$0,15 \pm 0,003$
	контроль	$4,0 \pm 0,08$	$4,5 \pm 0,09$	$0,3 \pm 0,006$	$2,5 \pm 0,05$	$0,12 \pm 0,002$
Далекосхідний 27/17	варіант	$5,2 \pm 0,1$	$4,6 \pm 0,09$	$0,3 \pm 0,006$	$2,8 \pm 0,05$	$0,13 \pm 0,002$
Сквирський 1/27	контроль	$4,8 \pm 0,09$	$4,3 \pm 0,08$	$0,2 \pm 0,004$	$2,4 \pm 0,04$	$0,10 \pm 0,002$
П F1	варіант	$5,0 \pm 0,1$	$4,5 \pm 0,09$	$0,2 \pm 0,004$	$3,4 \pm 0,06$	$0,16 \pm 0,003$
	контроль	$4,8 \pm 0,09$	$3,5 \pm 0,07$	$0,2 \pm 0,004$	$3,2 \pm 0,06$	$0,14 \pm 0,002$

Як свідчать результати досліджень, бактеріальна культура *M. luteus* ЛБК1 істотно покращує морфометричні показники рослин огірка порівняно з контролем. Так, якщо висота 15-денних рослин Лінії П1 у контролі становила у середньому  $4,5 \pm 0,09$  см, то

висота рослин такого ж віку, інокульованих бактеріальною культурою сягала  $6,8 \pm 0,1$  см. Суха маса рослин Лінії П1 збільшувалася на  $0,15 \pm 0,003$  г порівняно з контролем, а сира маса – на  $2,1 \pm 0,04$  г. Суха маса гібриду Сквирський 1/27 F1 порівняно з контролем зростала тільки на  $0,2 \pm 0,004$  г, як і сира маса. Подібний взаємозв'язок спостерігали за морфометричних вимірів висоти пагону, довжини кореня та кореневих волосків. Отримані результати досліджень підтверджуються тим, що контамінація рослин сортів/гібридів огірка бактеріальним штамом *M. luteus* ЛБК1 була високою і становила на сортах СМФ-795 F1 – 65%, Далекосхідний 27/17 – 55% і Сквирський 1/27 П F1 – 40%. Найбільшу кількість рослин, контамінованих бактерією, спостерігали на Лінії П-1, де вона становила 70%.

Отримані дані демонструють позитивний вплив штаму *M. luteus* ЛБК1 на ріст рослин сортів/гібридів огірка. Це свідчить, що можливість використання зазначеного штаму сприяє збільшенню висоти пагону, довжини кореня та кореневих волосків рослин сортів/гібридів огірка.

Отже, отримані результати дають підстави припускати, що досліджуваний штам ендоефітної бактерії *M. luteus* ЛБК1 може бути застосований у виробництві для поліпшення росту рослин різних сортів/гібридів огірка, перцю солодкого та підвищувати їх продуктивність в агрофітоценозах.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Аникиев В. В., Лукомська К. А. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. [2-е изд.]. М.: Просвещение, 1983. 52 с.
2. Гродзінський А. М. Основи хімічної взаємодії рослин. К.: Наукова думка, 1973. 204 с.
3. Кавецький В. М. Екотоксикологічне обґрунтування застосування засобів хімізації // Агроекол. журнал. 2002. № 2. С. 24–30.
4. ДСТУ 4138:2003. Насіння сільськогосподарських культур. Методи визначення якості. – введ. 01.01.2004.
5. Овчаренко Л. П. Використання послідовності *pts*-гену для ідентифікації ендоефітних бактерій і визначення їхньої локалізації у нативних клітинах рослин // Електронний журнал. 2012. Режим доступу: [ua.convdocs.org](http://ua.convdocs.org)
6. Парфенюк А. І. Формування грибного фітопатогенного фону в агрофітоценозах: автореф. дис. ... д-ра біол. наук. К., 2012. 320 с.
7. Chaves N. P., Pocasangre L. E., Elango F. Combining endophytic fungi and bacteria for the biocontrol of *Radopholus similis* (Cobb) Thorne and for effects on plant growth // *Scientia Horticulturae*. 2009. Vol. 122. Issue 3. P. 472–478.
8. King, E. O., Ward M. K., Raney D. E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein // *J. Lab. Clin. Med.* 1954. Vol. 44. P. 301–307.
9. Kovalchuk M. V., Lytvynenko T. L., Kononuchenko O. V. Colonization, capacity and persistence on wheat roots of a biocontrol agent *Pseudomonas* sp. IMBG163 // Біополімери і клітина. 2004. № 6. С. 530–534.
10. Lacava P. T., Li W. B., Araújo W. L. Rapid, specific and quantitative assays for the detection of the endophytic bacterium *Methylobacterium mesophilicum* in plants // *J. Microbiol. Methods*. 2006. Vol. 65. Issue 3. P. 535–541.

Стаття: надійшла до редакції 18.05.13

доопрацьована 08.01.14

прийнята до друку 10.01.14

**INFLUENCE *MICROCOCCUS LUTEUS* LBK1 ON GROWTH OF  
PLANTS VARIETIES / HYBRIDS CUCUMBER AND SWEET PEPPER****A. Parfenyuk, O. Sterlikova, I. Beznosko**

*Institute of Agroecology and Natural Management, NAAS of Ukraine  
12, Metrologichna St., Kyiv 03143, Ukraine  
e-mail: beznosko.ira@mail.ru*

Studied the influence of bacterial culture *M. luteus* LBK1 on the growth of plant varieties / hybrids cucumber and sweet pepper. Established its ability stimulate root growth, parts of plants and their mass. This is the reason suppose that the investigated strain can be used for an improvement in production the growth of the crops and to improve their performance in agrophytocenoses.

*Keywords: M. luteus* LBK1, varieties / hybrids of cucumber and sweet pepper, plant growth, agrophytocenoses.

**ВЛИЯНИЕ *MICROCOCCUS LUTEUS* ЛБК1 НА РОСТ РАСТЕНИЙ  
СОРТОВ/ГИБРИДОВ ОГУРЦА И ПЕРЦА СЛАДКОГО****А. Парфенюк, О. Стерлікова, І. Безноско**

*Институт агроэкологии и природопользования НААН Украины  
ул. Метрологическая, 12, Киев 03143, Украина  
e-mail: beznosko.ira@mail.ru*

Изучено влияние бактериальной культуры *M. luteus* ЛБК1 на рост растений сортов/гибридов огурца и перца сладкого. Установлена его способность стимулировать рост корня, наземной части растений и их массы. Эта способность дает основания предполагать, что исследуемый штамм может быть применен в производстве для улучшения роста указанных культур и повышать их производительность в агрофитоценозах.

*Ключевые слова: M. luteus* ЛБК1, сорта/гибриды огурца и перца сладкого, рост растений, агрофитоценоз.

## АНІОННІ ЖИРНІ КИСЛОТИ В ЗЕРНІ КУКУРУДЗИ У ПЕРІОД ЙОГО ДОЗРІВАННЯ ЗА ВПЛИВУ ЗЕАСТИМУЛІНУ ТА РІВНЯ ГРУНТОВОГО ЖИВЛЕННЯ

В. Федак<sup>1</sup>, О. Мамчур<sup>2</sup>, Й. Ривіс<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Інститут сільського господарства Карпатського регіону НААН України  
вул. Грушевського, 5, с. Оброшино, Пустомитівський р-н  
Львівська обл. 81115, Україна

<sup>2</sup>Львівський національний університет імені Івана Франка  
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна  
e-mail: oksanamatczur@mail.ru

У зерні кукурудзи в період дозрівання качанів підвищується рівень аніонних форм ненасичених і, особливо, насичених жирних кислот. Відбувається зростання вмісту аніонних форм насичених, мононенасичених і поліненасичених жирних кислот за впливу мінеральних нутрієнтів ( $N_{60}P_{45}K_{45}$ ) та зменшення – за впливу регулятора росту Зеастимулін. Зміна балансу аніонних форм жирних кислот загальних ліпідів покращує продуктивні ознаки досліджуваної кукурудзи: за впливу мінеральних нутрієнтів і Зеастимуліну виявлено зростання кількості качанів на стеблі, їх довжини й маси 1000 зерен кукурудзи.

*Ключові слова:* зерно кукурудзи, аніонні форми жирних кислот загальних ліпідів, мінеральні нутрієнти, регулятор росту рослин.

Одною з багатьох складових успішного використання інтенсивних технологій вирощування сільськогосподарських рослин є забезпечення рослинам достатнього збалансованого рівня живлення та застосування ефективних, екологічно безпечних регуляторів росту, що дає змогу реалізувати потенційні можливості рослин, підвищувати їх стійкість до захворювань, регулювати строки дозрівання, поліпшувати якість продукції та підвищувати врожай сільськогосподарських культур [3, 4, 9].

Особливістю застосування регуляторів росту є те, що в малих концентраціях вони здатні призводити до значних змін у рості й розвитку рослин. Потрапляючи в рослину, фізіологічно активні сполуки відразу включаються в обмін речовин, активізуючи біохімічні процеси, що призводить до покращення рівня життєдіяльності рослин, а це дає змогу реалізувати її потенційні продуктивні (підвищення врожайності й покращення якості врожаю) та адаптаційні можливості (зростання стійкості рослин до хвороб і несприятливих чинників довкілля) [4, 9].

Даних про вплив нутрієнтів і біологічно активних речовин різних класів на метаболізм ліпідів і жирних кислот у рослинах в літературі представлено небагато. Ліпіди та жирні кислоти виконують у рослинних організмах низку функцій, а саме – беруть участь у процесах формування стійкості рослин до несприятливих умов навколишнього середовища, зокрема дії важких металів, гербіцидів [1, 2, 11, 15, 16]. Проте даних, котрі пояснюють зміну ліпідного балансу рослини у процесі онтогенезу за впливу фітогормонів і їхніх аналогів, практично немає. Показано вплив азотно-фосфорно-калійних нутрієнтів і регуляторів росту Метіуру та Івіну на метаболізм фосfolіпідів у плазматичній мембрані проростків кукурудзи [7]. Є одиничні повідомлення про метаболізм жирних кислот за впливу фізіологічно активних речовин в онтогенезі пшениці [11]. Тому дослідження рівня



жирних кислот, зокрема, їхніх аніонних форм, у зерні кукурудзи в період дозрівання качанів за впливу різних екзогенних чинників є актуальним.

Метою нашої роботи є дослідження вмісту аніонних жирних кислот у зерні кукурудзи в період дозрівання качанів та за дії азотно-фосфорно-калійних нутрієнтів і стимулятора росту Зеастимуліну.

#### Матеріали та методи

Дослідження проводили на сірих лісових поверхнево оглеєних ґрунтах. На контрольну, I і II дослідні ділянки квадратно-гніздовим способом (50 x 50 см) висівали насіння кукурудзи середньостиглого сорту Збруч (ФАО 300–400) у розрахунку 63 тис. шт/га. Під час передпосівної культивування на I дослідну ділянку вносили мінеральні добрива у формі нітроамофоски з розрахунку  $N_{60}P_{45}K_{45}$ . На II дослідній ділянці рослини на стадії появи 7–8 листків обробляли водним розчином регулятора росту Зеастимулін, згідно з рекомендаціями виробника. Зеастимулін – вітчизняний композиційний регулятор росту для підвищення врожайності кукурудзи, дозволений до використання в Україні, розроблений ДП «Міжвідомчий науково-технологічний центр «Агробіотех» НАН України і Міністерства освіти і науки України. До його складу входить комплекс 2,6-диметилпіридин-1 оксиду з мурашиною кислотою – 50 г/л, Емістим С – 1 г/л.

У фази молочної, молочно-воскової, воскової та повної стиглості качанів відбирали зразки зерна, у яких загальноприйнятим методом визначали вміст аніонних жирних кислот [5, 8, 10]. У кінці досліджень визначали кількість качанів на стеблі, довжину одного качана та масу 1000 зерен [5].

Для визначення аніонних форм жирних кислот ліпідні екстрагували в одному випадку хлороформ-метанольною сумішшю (2:1 за об'ємом), а в другому – сумішшю хлороформ-метанол-соляної кислоти (200:100:1 за об'ємом). Одержані ліпідні екстракти обміляли, а виділені після цього жирні кислоти метилювали. Метиллові ефіри жирних кислот вводили у випарувач газорідного хроматографічного апарату. Вміст аніонних жирних кислот визначали за різницею між двома екстрактами. Для отримання кількісних даних щодо аніонних форм жирних кислот користувалися методами внутрішнього нормування та внутрішнього стандарту. Індекс ненасиченості ліпідів (ІНЛ) визначали як співвідношення суми насичених жирних кислот до суми ненасичених [10].

Отриманий цифровий матеріал оброблено методом варіаційної статистики з використанням критерію Стьюдента. Визначали середні арифметичні величини та їх помилки. Зміни вважали вірогідними за  $p < 0,05$ . Для розрахунків використано комп'ютерну програму Origin 6.0, Excel (Microsoft, USA).

#### Результати і їхнє обговорення

Забезпечення оптимальних умов метаболізму впродовж вегетаційного періоду рослин кукурудзи є запорукою формування повноцінного зерна як основи врожаю. Особливо важливим це є у критичні періоди онтогенезу, наприклад, при проростанні насіння, коли рослинний організм змінює тип живлення з гетеротрофного на автотрофний, при формуванні генеративних органів тощо. Для рослин кукурудзи одною з таких фаз є період дозрівання качанів. Раніше було показано позитивні зміни вмісту окремих форм жирних кислот у рослинах кукурудзи, зокрема, в період їх інтенсивного росту [13] й у процесі дозрівання качанів [14].

Встановлено, що в зерні контрольних рослин кукурудзи у процесі дозрівання качанів поступово підвищується рівень аніонних форм жирних кислот. Таке зростання відбувається здебільшого за рахунок насичених жирних кислот, про що свідчить індекс ненасиченості ліпідів, який у фази молочної, молочно-воскової, воскової та повної стиглості качанів

становить відповідно 0,28, 0,38, 0,45 і 0,54. Переважаюче підвищення рівня аніонних форм жирних кислот у зерні контрольних рослин кукурудзи в процесі дозрівання качанів виявлено серед жирних кислот із парною (у досліджувані фази відповідно 145,3, 176,6, 241,0 і 315,2 г<sup>-3</sup>/кг натуральної маси) та непарною (15,3, 14,4, 16,2 і 18,0 г<sup>-3</sup>/кг) кількістю атомів Карбону в ланцюгу (табл. 1–4).

Також у зерні контрольних рослин кукурудзи в процесі дозрівання качанів спостерігається поступове зростання вмісту аніонних форм мононенасичених жирних кислот: незначне (від 7,2 до 8,0 г<sup>-3</sup>/кг натуральної маси) збільшення вмісту пальмітоолеїнової (n-7) та двократне – олеїнової (n-9) (від 69,3 до 143,3 г<sup>-3</sup>/кг). При цьому в зерні контрольних рослин кукурудзи поступово зменшується кількість аніонних форм поліненасичених жирних кислот, зокрема, за рахунок лінолевої кислоти (n-3).

Таблиця 1

Рівень аніонних жирних кислот у зерні кукурудзи у фазу молочної стиглості качанів, г<sup>-3</sup>/кг натуральної маси (M±m, n=3)

Жирні кислоти та їх код	Контроль	Дослід	
		N <sub>60</sub> P <sub>45</sub> K <sub>45</sub>	Зеастимулін
Капринова, 10:0	7,5±0,12	8,1±0,12*	6,9±0,12*
Лауринова, 12:0	14,6±0,78	17,4±0,66	12,4±0,35
Міристинова, 14:0	22,3±0,98	25,6±0,65*	19,1±0,40*
Пентадеканова, 15:0	15,3±0,60	17,2±0,43	13,6±0,29
Пальмітинова, 16:0	64,3±1,50	69,0±0,69*	60,2±0,36
Пальмітоолеїнова, 16:1	7,2±0,17	7,9±0,15*	6,4±0,17*
Стеаринова, 18:0	36,6±0,98	40,0±0,75	33,5±0,41*
Олеїнова, 18:1	69,3±1,88	75,5±1,44	62,6±1,47*
Лінолева, 18:2	203,7±5,80	235,5±5,70	176,0±3,10
Ліноленова, 18:3	301,5±8,60	328,9±4,70	271,8±12,10
Загальний рівень жирних кислот	742,3	825,1	662,5
у т. ч.:			
насичені	160,6	177,3	145,7
мононенасичені	76,5	83,4	69,0
поліненасичені	505,2	564,4	447,8
n-3/n-6 (ліноленова/лінолева)	1,48	1,40	1,54
ІНЛ	0,28	0,27	0,28

На цьому тлі в зерні контрольних рослин кукурудзи у процесі дозрівання качанів поступово збільшується концентрація аніонних форм поліненасичених жирних кислот родини n-6, зокрема, лінолевої – на 59%. Це призводить до поступового зниження в зерні контрольних рослин кукурудзи відношення аніонних форм поліненасичених жирних кислот родини n-3 до таких же родини n-6 (табл. 1–4). Зазначимо, що підвищення рівня різних форм жирних кислот загальних ліпідів у зерні в період наливу і дозрівання зерна характерне, зокрема, для олійних культур [12].

Серед екзогенних чинників, які впливають на метаболізм сільськогосподарських рослин, а отже, і на їхню продуктивність, важливе місце займають фізіологічно активні речовини та рівень ґрунтового живлення. Оптимальний режим ґрунтового удобрення рослин кукурудзи в процесі дозрівання качанів у нашому випадку забезпечено внесенням у ґрунт мінеральних нутрієнтів складу N<sub>60</sub>P<sub>45</sub>K<sub>45</sub> у вигляді нітроамофоски.

Показано, що внесення у ґрунт мінеральних нутрієнтів призвело до зростання вмісту аніонних форм жирних кислот у зерні рослин кукурудзи в період дозрівання качанів як за рахунок насичених, так і за рахунок ненасичених жирних кислот. Про це свідчить індекс ненасиченості ліпідів, який у фази молочної, молочно-воскової, воскової та повної стиглості качанів становить 0,27, 0,39, 0,44 і 0,54 проти 0,28, 0,38, 0,45 і 0,54 у контролі відповідно.

Таблиця 2

Вміст аніонних жирних кислот у зерні кукурудзи у фазу молочно-воскової стиглості качанів, г<sup>-3</sup>/кг натуральної маси (M±m, n=3)

Жирні кислоти та їх код	Контроль	Дослід	
		N <sub>60</sub> P <sub>45</sub> K <sub>45</sub>	Зеастимулін
Капринова, 10:0	7,2±0,17	8,0±0,17*	6,5±0,17*
Лауринова, 12:0	13,8±0,50	15,6±0,40*	12,3±0,30
Міристинова, 14:0	21,5±0,80	24,8±0,70*	19,2±0,40
Пентадеканова, 15:0	14,4±0,60	16,8±0,40*	12,7±0,30
Пальмітинова, 16:0	84,6±1,70	91,2±1,70	77,6±1,90*
Пальмітоолеїнова, 16:1	6,7±0,20	7,4±0,10*	6,0±0,20*
Стеаринова, 18:0	49,5±1,18	54,6±0,70	44,9±0,60
Олеїнова, 18:1	76,8±1,60	82,1±1,20	71,2±2,20
Лінолева, 18:2	209,0±8,90	224,7±2,50	194,1±2,40
Ліноленова, 18:3	210,2±3,30	221,3±2,30*	198,2±2,50*
Загальний вміст жирних кислот	693,7	746,5	642,7
у т. ч.:			
насичені	191,0	211,0	173,2
мононенасичені	83,5	89,5	77,2
поліненасичені	419,2	446,0	392,3
n-3/n-6 (ліноленова/лінолева)	1,01	0,98	1,02
ІНЛ	0,38	0,39	0,37

Виявлено, що зростання вмісту аніонних форм насичених жирних кислот у зерні кукурудзи в період дозрівання качанів за впливу мінеральних нутрієнтів спостерігається з боку жирних кислот із парною (160,1, 194,2, 261,8 і 350,0 г<sup>-3</sup>/кг відповідно) та непарною (17,2, 16,8, 18,2 і 19,9 г<sup>-3</sup>/кг) кількістю атомів Карбону в ланцюгу.

Зафіксоване підвищення рівня аніонних форм ненасичених жирних кислот у зерні рослин кукурудзи впродовж дозрівання качанів за впливу мінеральних нутрієнтів відбувається, зокрема, за рахунок таких мононенасичених жирних кислот, як пальмітоолеїнова (n-7) (від 7,9 до 8,9 г<sup>-3</sup>/кг) та олеїнова (n-9) (від 75,5 до 162,7 г<sup>-3</sup>/кг). Вміст поліненасичених жирних кислот, зокрема, ліноленової (n-3) зростає на 5–12% щодо контролю, а лінолевої (n-6) – на 7–15%.

Слід відзначити, що співвідношення аніонних форм поліненасичених жирних кислот родини n-3 до аніонних форм поліненасичених жирних кислот родини n-6 у процесі дозрівання качанів змінюється: так, у фази молочної та молочно-воскової стиглості качанів зменшується, у фазу воскової стиглості зростає, а у фазу повної стиглості зерна залишається без змін (табл. 1–4).

Відомо, що використання у сільському господарстві фізіологічно активних речовин, зокрема, регуляторів росту, сприяє інтенсифікуванню метаболізму рослин, збільшує їхню врожайність і стійкість до несприятливих чинників навколишнього середовища [3, 4]. Показано, що обробка рослин кукурудзи регулятором росту Зеастимулін призводить до зменшення загального вмісту аніонних форм жирних кислот у зерні кукурудзи в період дозрівання качанів (табл. 1–4).

Виявлено, що зменшення концентрації аніонних форм жирних кислот у зерні кукурудзи у період дозрівання качанів відбувається однаковою мірою як за рахунок насичених, так і за рахунок ненасичених жирних кислот. Про це свідчить зміна індексу ненасиченості ліпідів, який упродовж процесу досягання качанів зростає і у фази молочної, молочно-воскової, воскової та повної стиглості качанів становив відповідно 0,28, 0,37, 0,45 і 0,53 у контрольних рослин проти 0,28, 0,38, 0,45 і 0,54 у оброблених Зеастимуліном відповідно.

Таблиця 3

Концентрація аніонних жирних кислот у зерні кукурудзи у фазу воскової стиглості качанів, г<sup>-3</sup>/кг натуральної маси (M±m, n=3)

Жирні кислоти та їх код	Контроль	Дослід	
		N <sub>60</sub> , P <sub>45</sub> , K <sub>45</sub>	Зеастимулін
Капринова, 10:0	8,3±0,35	9,2±0,30*	7,6±0,25*
Лауринова, 12:0	17,1±1,05	19,2±0,91	15,4±0,45
Міристинова, 14:0	24,6±1,40	27,7±0,91*	22,2±0,60*
Пентадеканова, 15:0	16,2±0,80	18,2±0,65*	14,5±0,55*
Пальмітинова, 16:0	116,4±4,15	124,9±1,86*	108,1±3,35
Пальмітоолеїнова, 16:1	8,9±0,45	9,8±0,35*	7,9±0,30*
Стеаринова, 18:0	74,6±3,35	80,8±1,91	69,0±1,75
Олеїнова, 18:1	109,1±7,85	121,6±2,20	97,9±2,32
Лінолева, 18:2	291,0±17,17	317,3±6,90	261,8±8,01
Ліноленова, 18:3	166,9±11,07	186,9±7,00	157,2±7,10
Загальна концентрація жирних кислот	833,1	915,6	761,6
у т. ч.:			
насичені	257,2	280,0	236,8
мононенасичені	118,0	131,4	105,8
поліненасичені	457,9	504,2	419,0
n-3/n-6 (ліноленова/лінолева)	0,57	0,59	0,60
ІНЛ	0,45	0,44	0,45

Таблиця 4

Кількість аніонних жирних кислот у зерні кукурудзи у фазу повної стиглості качанів, г<sup>-3</sup>/кг натуральної маси (M±m, n=3)

Жирні кислоти та їх код	Контроль	Дослід	
		N <sub>60</sub> , P <sub>45</sub> , K <sub>45</sub>	Зеастимулін
Капринова, 10:0	9,3±0,40	10,1±0,30	8,4±0,30*
Лауринова, 12:0	19,2±1,43	21,7±0,55*	17,4±0,45
Міристинова, 14:0	28,4±1,87	31,9±0,90*	25,6±0,55
Пентадеканова, 15:0	18,0±0,85	19,9±0,50*	16,5±0,45
Пальмітинова, 16:0	152,4±7,45	164,7±3,73	136,6±5,70*
Пальмітоолеїнова, 16:1	8,0±0,35	8,9±0,30*	7,2±0,25*
Стеаринова, 18:0	105,9±9,79	121,6±3,86	89,8±4,52
Олеїнова, 18:1	143,3±12,45	162,7±6,25	124,1±4,05
Лінолева, 18:2	324,7±17,9	354,1±7,95	297,3±7,10
Ліноленова, 18:3	142,9±8,02	156,7±4,10	126,7±5,50*
Загальна кількість жирних кислот	952,2	1052,4	849,9
у т. ч.:			
насичені	333,2	369,9	294,4
мононенасичені	151,3	171,6	131,4
поліненасичені	467,6	510,8	424,0
n-3/n-6 (ліноленова/лінолева)	0,44	0,44	0,43
ІНЛ	0,54	0,54	0,53

Встановлено, що зменшення концентрації аніонних форм насичених жирних кислот у зерні рослин кукурудзи, оброблених Зеастимуліном, у період дозрівання качанів відбувається за рахунок жирних кислот із парною (від 132,1 до 277,9 г<sup>-3</sup>/кг) та непарною (від 13,6 до 16,5 г<sup>-3</sup>/кг) кількістю атомів Карбону в ланцюгу.

Зазначимо, що за умов обробки рослин Зеастимуліном зменшення кількості аніонних форм ненасичених жирних кислот спостерігається з боку мононенасичених жирних кислот, зокрема, пальмітоолеїнової (n-7) (від 6,4 до 7,2 г<sup>-3</sup>/кг) та олеїнової (n-9) (від 62,6 до 124,1 г<sup>-3</sup>/кг), а також з боку поліненасичених жирних кислот: ліноленової (n-3) (від 271,8 до 126,7 г<sup>-3</sup>/кг) і лінолевої (n-6) (від 176,0 до 297,3 г<sup>-3</sup>/кг). При цьому виявлено, що співвідношення аніонних форм поліненасичених жирних кислот родини n-3 до аніонних форм

поліненасичених жирних кислот родини n-6 у фази молочної та воскової стиглості качанів у зерні рослин кукурудзи після обробки Зеастимуліном зростає, тоді як у фази молочно-воскової та повної стиглості практично не змінюється (табл. 1–4).

Зміни вмісту аніонних форм насичених, мононенасичених і поліненасичених жирних кислот у зерні рослин кукурудзи за умов внесення у ґрунт мінеральних нутрієнтів і обробки рослин регулятором росту Зеастимулін спричинили інтенсифікування метаболічних процесів у рослинах кукурудзи, що призвело до покращення продуктивних ознак досліджуваної кукурудзи (табл. 5).

Таблиця 5

Продуктивні ознаки рослин кукурудзи ( $M \pm m$ ,  $n=10$ )

Досліджувані показники та одиниці виміру	Контроль	Дослід	
		$N_{60}, P_{45}, K_{45}$	Зеастимулін
Кількість качанів на стеблі, шт.	$2,4 \pm 0,1$	$3,2 \pm 0,4^*$	$2,9 \pm 0,3^*$
Довжина качана, см	$25,4 \pm 1,5$	$30,5 \pm 2,7^*$	$29,3 \pm 2,3^*$
Маса 1000 зерен, г	$220,0 \pm 6,8$	$245,5 \pm 8,6^*$	$240,0 \pm 7,9^*$

Встановлено, що за умов внесення у ґрунт мінеральних нутрієнтів і обробки рослин регулятором росту Зеастимулін кількість качанів на стеблі зростає до 3,2 і 2,9 шт. відповідно проти 2,4 шт. у контрольних рослин. Довжина качана в цьому випадку теж зростає. Загальноприйнятною кількісною продуктивною ознакою врожайності зерна сільськогосподарських культур, зокрема, кукурудзи, є маса 1000 зерен. Показано, що за умов внесення у ґрунт мінеральних нутрієнтів і обробки рослин регулятором росту Зеастимулін маса 1000 зерен зростає з 220,0 г у контролі до 245,5 та 240,0 г відповідно.

Отримані дані свідчать про те, що рівень аніонних форм жирних кислот у зерні контрольних рослин кукурудзи в період дозрівання качанів поступово закономірно підвищується, що, ймовірно, пов'язано зі зростанням вмісту сухої речовини в зерні кукурудзи у цей період. Відомо, що аніонні форми насичених жирних кислот є менш розчинними, порівняно з аніонними формами ненасичених жирних кислот [5, 12].

За умов внесення у ґрунт мінеральних нутрієнтів у зерні кукурудзи в період дозрівання качанів вміст аніонних форм насичених, мононенасичених і поліненасичених жирних кислот зростає. Ймовірно, їх нагромадження у цьому випадку пов'язане з можливістю катіонів у складі мінеральних нутрієнтів перетворювати частину високоактивних неетерифікованих форм жирних кислот у малоактивні аніонні форми [12, 17].

Зменшення вмісту аніонних форм насичених, мононенасичених і поліненасичених жирних кислот у зерні кукурудзи в період дозрівання качанів за дії регулятора росту Зеастимулін, ймовірно, зумовлене інтенсивним використанням цих речовин. Одним із ймовірних механізмів дії екзогенних біорегуляторів є ініціювання неферментативних окисно-відновних реакцій, які можуть переходити у ланцюгові реакції окиснення поліненасичених карбонових кислот. Важливу роль в активації біологічно активних речовин відіграє також цитохром P-450, а одним із первинних ефектів регуляторів росту є зростання проникності клітинних мембран, спричинене активуванням специфічних мембранних рецепторів [4].

Отже, вміст аніонних форм жирних кислот у зерні контрольних рослин кукурудзи в процесі дозрівання качанів зростає, особливо за рахунок аніонних форм мононенасичених жирних кислот. Застосування мінеральних нутрієнтів посилює нагромадження аніонних форм жирних кислот, тоді як за дії Зеастимуліну їх вміст у зерні кукурудзи знижується, що свідчить про відмінності у фізіологічній дії мінеральних добрив і фізіологічно активних речовин, якими є регулятори росту рослин, на рослинний організм. Зміни концентрації

аніонних форм насичених, мононенасичених і поліненасичених жирних кислот за дії мінеральних нутрієнтів і Зеастимуліну супроводжуються покращенням кількісних продуктивних ознак кукурудзи на зерно.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Винниченко А. Н., Штеменко Н. И., Заморуєва Л. Ф. и др. Жирные кислоты поверхностных липидов зерна кукурузы обычных и высоколизиновых форм // Химия природных соединений. 1990. № 3. С. 262–264.
2. Глубока В. М., Заморуєва Л. Ф., Філонік І. О., Винниченко О. М. Склад ліпідів та ліпідний обмін в зерні різних за стійкістю гібридів кукурудзи при проростанні під впливом гербіциду Харнеса // Вісн. Дніпропетр. ун-ту. Сер. біол., екол. 2001. Вип. 9. Т. 1. С. 34–41.
3. Грицаєнко З. М., Пономаренко С. П., Карпенко В. П., Леонтьюк І. Б. Біологічно активні речовини в рослинництві. К.: ЗАТ Нічлава, 2008. 352 с.
4. Деева В. П. Регуляторы роста растений: механизмы действия и использование в агротехнологиях. Минск: Беларус. наука, 2008. 133 с.
5. Доспехов Б. А. Методика полевого опыта. М.: Колос, 1985. 351 с.
6. Кейтс М. Техника липидологии. М.: Мир, 1975. 320 с.
7. Контурська О. О., Палладіна Т. О. Фосфоліпідний склад плазмалеми коренів проростків кукурудзи за умов засолення та обробки синтетичними препаратами // Вісн. Харків. нац. аграр. ун-ту. Сер. біол. 2007. Вип. 2 (11). С. 64–68.
8. Методы биохимического исследования растений / под ред. А.И. Ермакова. Л., 1987. 497 с.
9. Пономаренко С. П. Регуляторы роста растений на основе N-оксидов производных пиридина (физико-химические свойства и биологическая активность). К.: Техніка, 1999. 272 с.
10. Рівіс Й. Ф., Федорук Р. С. Кількісні хроматографічні методи визначення окремих ліпідів і жирних кислот у біологічному матеріалі. Львів: Сполом, 2010. 110 с.
11. Світлова Н. Б. Ліпід-пігментний комплекс та екзогенні біорегулятори у формуванні адаптивних реакцій пшениці до посухи: автореф. дис. ... канд. біол. наук: 03.00.12. К., 2001. 20 с.
12. Таран Н. Ю., Косик О. І., Оканенко О. А. та ін. Ліпіди рослин. К.: Ленвіт, 2006. 104 с.
13. Федак В. В., Мамчур О. В., Рівіс Й. Ф. Вміст неетерифікованих форм жирних кислот у рослинах кукурудзи за впливу регулятора росту рослин // Наукові, прикладні та освітні аспекти фізіології, генетики, біотехнології рослин і мікроорганізмів: матеріали ХІІ конф. молодих вчених. (м. Київ, 15–16 листопада 2012 р.). К., 2012. С. 156–157.
14. Федак В. В., Рівіс Й. Ф., Мамчур О. В. Динаміка вмісту жирних кислот загальних ліпідів у стеблі та листках кукурудзи у період дозрівання качанів // Наук. вісн. Львів. нац. ун-ту вет. мед. та біотехнологій ім. С.З. Гжицького. Сер. Біол. науки, с.г. науки. 2012. Ч. 2. № 2 (52). С. 154–160.
15. Філонік І. О., Заморуєва Л. Ф. Вивчення впливу нікелю та хрому на склад ліпідів та активність ліпаз у зерні кукурудзи при проростанні // Вісн. Дніпропетр. ун-ту. Сер. біол., екол. 2009. Вип. 17. Т. 2. С. 116–121.
16. Murphy D. J. The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms // Prog. Lipid Res. 2001. Vol. 40. P. 325–438.
17. Skulachev V. Anion carriers in fatty acid-mediated physiological uncoupling // J. Bioenergetics Biomembranes. 1999. Vol. 31. N 5. P. 431–445.



## ANIONIC FATTY ACIDS IN MAIZE GRAIN DURING ITS RIPENING UNDER INFLUENCE ZEASTIMULIN AND THE LEVEL OF THE SOIL NUTRITION

V. Fedak<sup>1</sup>, O. Mamchur<sup>2</sup>, J. Rivis<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Agriculture Carpathian, NAAS of Ukraine  
5, Hrushewskiy St., Lviv-Obroshyno 81115, Ukraine*

<sup>2</sup>*Ivan Franko National University of Lviv  
4, Hrushewskiy St., Lviv 79005, Ukraine  
e-mail: oksanamamczur@mail.ru*

In maize grain during cobs ripening period levels of anionic forms unsaturated fatty acids, and especially saturated fatty acids was increased. The increase of content of anionic forms of saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids under the influence of mineral nutrients, and their reduce – under the influence of plant growth regulator Zeastymulin was showing. Change of the balance of anionic forms fatty acids of total lipids improves productivity of the investigated maize plants: the number cobs on the stem, their length and weight of 1000 grains of corn on the influence of mineral nutrients and Zeasty-mulin was increased.

*Keywords:* maize plants, anionic form of fatty acids of total lipids, mineral nutrients, plant growth regulator.

## АНИОННЫЕ ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ В ЗЕРНЕ КУКУРУЗЫ В ПЕРИОД ЕГО СОЗРЕВАНИЯ ПОД ВЛИЯНИЕМ ЗЕАСТИМУЛИНА И УРОВНЯ ПОЧВЕННОГО ПИТАНИЯ

В. Федак<sup>1</sup>, О. Мамчур<sup>2</sup>, И. Ривис<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Институт сельского хозяйства Карпатского региона НААН Украины  
ул. Грушевского, 5, с. Оброшино,*

*Пустомытовский р-н, Львовская обл. 81115, Украина*

<sup>2</sup>*Львовский национальный университет имени Ивана Франко  
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина*

*e-mail: oksanamamczur@mail.ru*

В зерне кукурузы в период созревания початков повышается уровень анионных форм ненасыщенных и, особенно, насыщенных жирных кислот. Показано увеличение содержания анионных форм насыщенных, мононенасыщенных и полиненасыщенных жирных кислот при воздействии минеральных нутриентов и уменьшение – при воздействии регулятора роста Зеастимулин. Изменение баланса анионных форм жирных кислот общих липидов улучшает продуктивные признаки исследуемой кукурузы: под воздействием минеральных нутриентов и Зеастимулина выявлено возрастание количества початков на стебле, их длины и массы 1000 зерен кукурузы.

*Ключевые слова:* зерно кукурузы, анионные формы жирных кислот общих липидов, минеральные нутриенты, регулятор роста растений.

УДК 595.143.6:577.1:595.3

**VIABILITY OF LOWER CRUSTACEANS UNDER THE INFLUENCE  
OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES OF BIOTECHNOLOGICAL  
WATER FROM THE MEDICINAL LEECH (*HIRUDO VERBANA*)**

**A. Frolov\*, R. Litvinenko**

*State Higher Educational Institution «Zaporizhzhya National University»  
66, Zhukovskiyi St., Zaporizhzhia 69600, Ukraine  
e-mail: a\_frolov@ukr.net*

The organism of the medicinal leech produces a complex of unique biologically active substances that are allocated into the aquatic environment with waste products and exhibit a wide number of therapeutic effects. The aim of the work was to study the influence of biologically active substances of biotechnological water from the leeches in artificial ecosystems on the survival of lower crustaceans (*Daphnia magna* Straus). We determined the acute lethal toxicity of biotechnological water from the medicinal leech on the test organism. Index of acute toxicity, compared with controls, in the first hours of the experiment (4–6 hours) is 3,3% and further increases, and starting from the third day (after 72 and 96 hours) acute toxicity was observed at the level 60,0 and 69,0%, respectively. Daphnids that were cultivated in biotechnological water from the medicinal leech differed morphologically from the control; in the initial stages of biotesting they had larger average body size and showed greater activity.

*Keywords:* biotesting, medicinal leech, biologically active substances, test-organism, acute toxicity.

The organism of the medicinal leech (*Hirudo medicinalis*, Linnaeus, 1758; *H. verbana*, Carena, 1820; *H. orientalis*, S. Utevsky et Trontelj, 2005) produces the complex of unique biologically active substances (BAS), that do not have analogues and are necessary in modern medicine and veterinary medicine and show the wide spectrum of therapeutic effects [4, 6, 9]. It is also recognized that an extract of the medicinal leech's saliva is very similar to antibiotics, but does not show side effects [4]. BAS of medicinal leech outflow into the water environment in which they are contained, with other waste products: guano, urine, mucus and desquamated cuticle remains. It is known that the biotechnological water from the medicinal leech includes: blood proteins of the host, hirudin, enzymes (hyaluronidase, triglyceridase, elastase, apyrase), amino acids (tryptophan, glutamic acid, alanine, lysine, leucine, etc.), biogenic elements (potassium, natrium, phosphorus) and microelements (iodine, bromine, sulfur, selenium) [6]. However, obviously, the spectrum of these substances is much wider and is not studied enough yet. The presence of these components shows a high biological value of biotechnological water from the medicinal leech. There are reports which suggest using externally biotechnological water from the medicinal leech for the purposes of prophylaxis and cure [6]. Besides, the medicinal leech is the important component of aquatic and terrestrial communities. Its effect on biotic relationships in these communities, except trophic relationships, has not been studied yet. So the research of the influence of BAS of the biotechnological water from the leeches in artificial ecosystems by the example of lower crustaceans (*Daphnia magna* Straus, *Cladocera*, *Crustacea*) is important.

### Materials and methods

Daphnia, invertebrate animals, plants are often used as test-objects in bioindication of natural waters. The advantages of Daphnia over other types of animals include the fact that their species composition and abundance correspond to the level of environment saprobity, they have high sensitivity level to the changes in environmental quality, they are available and low-cost materials, experiments with Daphnia are of relatively short duration, test objects are easy to cultivate, organisms maintenance is carried out in a strictly defined environment, they reproduce themselves rapidly, capable of parthenogenesis reproduction.

Experimental studies were carried out on the basis of teaching and research laboratory of cellular and organism biotechnology of the faculty of Biology of Zaporizhzhya National University. The effects of exogenous BAS of medicinal leech on the performance of the viability of lower crustaceans – *Daphnia magna* Straus to test the acute lethal toxicity of cultural water were investigated. Daphnia was obtained through acyclic parthenogenesis at least in the third generation. The initial population of Daphnia was fed once a day – by the suspension of green algae (*Chlorella* – *Chlorella vulgaris* Beijer), grown on 10% Tamiya substratum, and once a week – by the suspension of baker's yeasts.

For the experiments the following water was used: water from centralized water supply, dechlorinated, by three-days sedimentation (control); biotechnological water after culturing *H. verbana* species of leeches aged 5 months in 3 L bottles in the number of 40 specimens in five days – without dilution (experiment) were used. Before using, the biotechnological water was filtered through paper filters to remove large particles of waste products of leeches (mucus, food molting etc.). The experiment was set in three repetitions, the temperature of the analyzed samples was  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ , the oxygen concentration at the beginning of testing was at least  $6 \text{ mg/dm}^3$  [2].

The study was conducted with a view to acute toxicity of selected samples, biotesting procedure lasted 96 hours. The analysis of daphnids' viability was determined in the following intervals: after 2, 4, 6, 12, 24, 48, 72, 96 hours from the start of the experiment. The experiment was considered to be valid if the mortality of the test-objects in the control samples was less than 10%. During the experiment, daphnids were not fed, the environment was not aerated, and biological testing was carried out in diffused light. In each of the experimental and control samples with the volume 100 ml, 10 daphnids up to 24 hours (6–24 hours), which were fed for 2–3 hours prior to testing were placed. At various stages of biotesting the number of alive daphnids was visually counted. Daphnids were considered alive if it moves freely in the water or pop up from the bottom of the vessel for 15 seconds after a light shaking, and the rest daphnids were considered dead. On the basis of counting the number of alive daphnids in the control and experiment we determined the arithmetical means that were used to calculate the number of daphnids deaths in the experiment relative to the control (test-parameter, the index of acute toxicity, toxicity index) by the formula [5]:

$$A = (X_c - X_e) \times 100 / X_c \%$$

where: A – the number of dead daphnids in experiment relative to control (toxicity index), %;  $X_c$  – the arithmetic mean of the number of alive daphnids in control specimens;  $X_e$  – the arithmetic mean of the number of alive daphnids in experiment specimens. The accuracy of parallel measurements ranged from 5–10%. Samples of water were considered such that have acute lethal toxicity if A-index was 50% or more [2, 5].

The statistical processing of the experimental data was performed using the application package SPSS v. 20.0, using parametric and nonparametric statistical methods. Checking the normality of the distribution was carried out using one-sample Kolmogorov-Smirnov test, at the normal distribution using parametric statistical methods – statistical significance of differences

between experiments and controls were evaluated by Student two-sample criterion (t-test for independent samples. The differences of the results were considered valid if  $P > 95\%$ ,  $p < 0.05$ .

### Results and discussion

For evaluation of the quality of water physics-chemical, hydrobiological indicators, toxicity for living organisms were defined using techniques of biological indicators. However, physical and chemical methods for assessing water quality do not always provide adequate information about its suitability for practical use. Biological methods are less accurate than chemical, but more informative, by reference to determine the overall toxicity of water and its adverse effects on aquatic organisms. By the definition, after L.P. Braginskiy [1], the test-objects are «... replacements of complex chemical analysis, which allow you to establish quickly the toxicity (toxicity, hazards) of water pollution (“yes” or “no”) whether it is due to the presence of a substance or a complex of substances».

*Daphnia* is a bioindicator organism that belongs to the lower crustaceans, namely cladoceran crustaceans. By nature of nutrition they are filter-feeders organisms, they naturally feed with water bacteria, unicellular algae, detritus, dissolved organic matter [7].

At the beginning and after the experiment we determined a pH-value (pH) and dissolved oxygen in the studied samples [5], which were 7,4 and 8,5 mg/dm<sup>3</sup> respectively at the beginning of the experiment in control samples; 8,1, and 7,0 mg/dm<sup>3</sup> respectively in experiment. At the end of the experiment (after 96 hours) a pH was 7,6 and oxygen was 8,2 mg/dm<sup>3</sup> in control samples, when in experiment pH was 8,1 and oxygen was 6,6 mg/dm<sup>3</sup>. These figures are subject to the requirements of methods, so testing is correct. The results of the determination of the acute toxicity of biotechnological water from the medicinal leech on the organism of the test-object (*D. magna* Straus) are presented in table 1. Indicator of acute toxicity of biotechnological water from the medicinal leech without dilution, compared with controls, in the early hours of the experiment (4, 6 hours) is 3,3% and further increases to 6,7% after 12 hours, to 33,3% after 24 hours, to 43,3% after 48 hours, and to 60,0 and 69,0% after the 3rd day of cultivation (at 72 and 96 hours respectively), which can be observed at acute toxicity.

Table 1

The number of alive specimens of *Daphnia magna* Straus (*Cladocera*, *Crustacea*) in the culture water from the biotechnology medicinal leech

Time of cultivation, hours	Control, 3 repetitions, M±m	Cultural water at the biotechnology of medicinal leech, 3 repetitions	
		M±m	A, %
2	10±0	10±0	0
4	10±0	9,67±0,333	3,3
6	10±0	9,67±0,333	3,3
12	10±0	9,33±0,333	6,7
24	10±0	6,67±0,333*	33,3
48	10±0	5,67±0,333*	43,3
72	10±0	4,0±0,577*	60,0 <sup>AT</sup>
96	9,67±0,333	3,0±0,577*	69,0 <sup>AT</sup>

**Note:** A – the number of dead in the daphnia experiment relative to control (a measure of acute toxicity), %; \* – reliable differences compared to control at  $p \leq 0,001$ ; AT – definition of outcome – acute toxicity, M – mean; m – standard error mean.

So as acute toxicity testing of biotechnological water from the medicinal leech without dilution was over 50%, according to the performed procedure a quantitative assessment of the toxicity of biotechnological water dilution of 1 : 2 and 1 : 3 (biotechnological water: defecated faucet water). In a dilution of 1 : 2 we found acute lethal toxicity, which was 50% in 96 hours and at a dilution of 1 : 3 – minimum lethal toxicity was found, which was 10%. When diluted 1 : 3,

*Daphnia* looked lively and healthy, compared with controls, which may indicate a stimulating effect of toxicants at low concentrations [3].

Acute toxicity to daphnids shows a set of symptoms, which are observed visually, such as mortality rates (sinking to the bottom of bottle, convulsions, immobilization, death), reflex and behavioral responses (rotation around its axis, the disordered movements), reduced heart rate [3]. It is clear that any substance at sufficiently high concentrations and prolonged exposure can affect aquatic organisms, revealing damaging and depressing effect.

The morphological features of *Daphnia* after experiment were observed under the microscope, using slides with holes. The results are presented in table 2. At the end of the biotesting (after 96 hours) 29 out of 30 daphnids that were cultured in control samples were available for morphological studies, and 12 of 30 daphnids that were cultured in biotechnological water from the leeches, including 9 alive and 3 visually dead. Visually there were recorded the differences in sizes, active movements of the test organisms, that is why we analyzed not only indicator of acute toxicity, but also morphological characteristics of daphnids, such as body size (length, width, mm), motor activity, the presence of food in the digestive system. It should be noted that within two days of biotesting we noted an increase of the size of daphnids in the experimental samples of cultures.

Table 2

The morphometric parameters of *Daphnia* after biotesting (after 96 hours of cultivation) in experimental and control samples

Group	Statistical indicators	Length of the body, mm	Width of the body, mm
Control, n=29	M±m (SD)	1,58±0,034 (0,185)	0,85±0,026 (0,145)
	Variance (dispersion)	0,034	0,021
	CV, %	11,71	17,05
	CI (95%)	1,51–1,65	0,80–0,90
Experiments, n=9	M±m (CB)	2,18±0,028* (0,084)	1,55±0,038* (0,115)
	Variance (dispersion)	0,084	0,013
	CV, %	3,85	7,42
	CI (95%)	2,12–2,24	1,47–1,63

**Note:** \* – reliable differences at  $p \leq 0,001$ ; M – mean; m – standard error mean, SD – standard deviation, CV – coefficient of variation, CI – confidence interval of the difference. Index with the lowest CV has the least variability.

*Daphnids* (29 specimens) that were cultivated in defecated faucet water (control), after 96 hours from the start of the experiment had the following morphological characteristics: the study under the microscope showed active body movements, antennas, digestive system was filled with food, periodic discharge of feces was observed. Morphometric parameters: length of the body – mean  $\pm$  standard error mean (standard deviation) – 1,58±0,034 (0,185) mm, with confidence interval (95%) – 1,51–1,65 mm, width of the body – 0,85±0,026 (0,145) mm, the confidence interval – 0,80–0,90 mm.

*Daphnids* (9 specimens) that were cultivated in the cultural water from the medicinal leech (experiment), after 96 hours from the beginning of the biotesting had the following morphological characteristics: unlike control, weak, gestures were noted, antennas mainly were folded, sometimes eye movements, small amount of food in the digestive system (more rarely absent) were observed; there was a discharge of feces, but less intense than in the control. Morphometric parameters were statistically significantly higher than control ( $p \leq 0,001$ ): length of the body was – 2,18±0,028 (0,084) mm, with confidence interval (95%) – 2,12–2,24 mm, width of the body – 1,55±0,038 (0,115) mm, with confidence interval – 1,47–1,63 mm.

In addition, in experimental samples we analyzed morphological state of daphnids (3 specimens) which didn't show visually vital signs, according to the methodology such daphnids were considered to be dead. Their morphological features include: visual immobilization, under the microscope: isolated body movements were observed in one of them; there was a small amount of food in the digestive system. Two others were immobilized; the food in the digestive system was practically absent. Average size of their bodies was in the range: length – 2,04–2,28 mm, width – 1,32–1,74 mm.

Increase of average body size of studied daphnids, compared with control ones can be explained, firstly, by the fact that in the early stages of cultivating daphnids were fed with additional food (detritus, bacteria, dissolved organic matter) available in biotechnology water from the medicinal leech and secondly, by a direct stimulating effect of BAS of medicinal leech on the metabolism of *Daphnia* tissue cells, which coincides with the data of positive therapeutic effects of hirudotherapy in humans [4] and small cattle [8]. However, most of the BAS are dose-dependent, their effects depend on the dose and duration of action, that is why with increasing of dose and duration of action, stimulating effect was replaced by inhibitory one, and simultaneously with the stimulating effect daphnids' die-off was observed. This dose-dependent and prolonged action of BAS in subsequent cultivation (3–4 days) is replaced by acute toxicity and leads to the elimination of daphnids, starting with the most sensitive individuals. So, gradually substances depot that provided compensatory reaction in daphnids exhausted and accumulation of toxic intermediate and final by products and accumulation of toxins caused the transition of physiological changes into pathology and shellfish death. One of the reasons for the subsequent death of daphnids may be a violation of microbial symbiogenesis, including intestinal. It was found that among BAS of biotechnological water from the medicinal leech, there is a matter of antibiotic-like activity [4]. Representatives of pathogenic and saprophytic microflora are sensitive to it [10]. Taking into account, that daphnids were in the biotechnological water, the high concentration of BAS, which always influences on the metabolism of cells and intestinal microflora, thereby inhibits microbial symbionts. Toxic effects recorded by biotesting, provide an assessment of all the ingredients that affect the physiological, biochemical and genetic features of test organisms [3]. Taking into account the complexity of influence of various substances that are contained in biotechnological water from the leech, it is difficult to speculate on the nature of the size increase on the stages of *Daphnia* biotesting. However, further studies will allow setting amidst BAS of the biotechnological water from the medicinal leech, some stimulating and inhibiting components. It will be important for the determination of their effects on biotic relationships in biocenosis with subsequent application of cultural water and its components in preventive and curative medicine and veterinary medicine.

### Conclusions

1. Acute toxic effects of biotechnological water from the medicinal leech to daphnia were revealed: after 72 hours toxicity index was 60,0%, after 96 hours – 69,0%. This suggests that exogenous BAS of medicinal leech contain toxic ingredients that affect directly – the metabolism of cells or indirectly – through bacteriostatic effect on symbionts, and thus affect the cladoceran crustaceans.

2. The increase of average body size of studied daphnids, compared with controls, indicates the presence of stimulating substances in biotechnological water from the medicinal leech, and substances that can serve as an additional source of food.



## REFERENCES

1. Брагінський Л. П. Теоретичні передумови (загальні концепції токсикологічної гідроекології) // Гідроекологічна токсикометрія та біоіндикація забруднень: теорія, методика, практика використання / за ред. І.Т. Олексіва, Л.П. Брагінського. Львів: Світ, 1995. С. 7–39.
2. Визначення гострої летальної токсичності на *Daphnia magna* Straus та *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg (Cladocera, Crustacea) (ISO 6341:1996, MOD) ДСТУ 4173:2003. [Чинний від 2004-01-01]. К.: Держспоживстандарт України, 2004. 13 с.
3. Гойстер О. С., Хмельницький Г. О. Взаємозв'язок метаболічної активності деяких водних організмів з умовами люмінесцентного екотоксикологічного біотестування // Біотехнологія. 2009. Т. 2. № 1. С. 35–45.
4. Каменев О. Ю., Барановський А. Ю. Лечение пиявками: теория и практика гирудотерапии: руководство для врачей. СПб.: Весь, 2006. 304 с.
5. Кузьмич В. Н., Соколова С. А., Крайнюкова А. Н. Руководство по определению методом биотестирования токсичности вод, донных отложений, загрязняющих веществ и буровых растворов. М.: РЭФИА, НИА–Природа, 2002. 118 с.
6. Рассадина Е. В. Экологически обоснованная биотехнология воспроизводства *Hirudo medicinalis* L. в лабораторных условиях: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.23, 03.00.16. Ульяновск, 2006. 199 с.
7. Руководство по гидробиологическому мониторингу пресноводных экосистем / под ред. В. А. Абакумова. СПб.: Гидрометеиздат, 1992. 318 с.
8. Фролов А., Копейка В., Федотов Е. и др. Влияние гирудотерапии на физиологические показатели у коз // Тваринництво України. 2010. № 7. С. 7–10.
9. Porshinsky B. S., Saha S., Grossman M. D. et al. Clinical uses of the medicinal leech: A practical review [serial online] // J. Postgrad. Med. 2011. Vol. 57. P. 65–71. Available from: <http://www.jpgmonline.com/text.asp?2011/57/1/65/74297>
10. Frolov A. K., Kopeyka V. V., Fedotov E. R., Litvinenko R. A. Influence of biologically active substances of medicinal leech on opportunistic and saprophytic microflora // European Science and Technology: materials of the III international research and practice conf. Munich. Publishing office Vela Verlag Waldkraiburg–Munich–Germany, 2012. Vol. II. P. 570–575.

Стаття: надійшла до редакції 25.05.13

доопрацьована 09.09.13

прийнята до друку 23.09.13

**ЖИТТЄЗДАТНІСТЬ НИЖЧИХ РАКОПОДІБНИХ ПІД ВПЛИВОМ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН БІОТЕХНОЛОГІЧНОЇ ВОДИ З-ПІД МЕДИЧНОЇ П'ЯВКИ (*HIRUDO VERBANA*)**

**О. Фролов, Р. Литвиненко**

Державний вищий навчальний заклад  
«Запорізький національний університет»  
вул. Жуковського, 66, Запоріжжя 69600, Україна  
e-mail: a\_frolov@ukr.net

Організм медичної п'явки продукує комплекс унікальних біологічно активних речовин, які виділяються у водне середовище разом із продуктами життєдіяльності і

проявляють широкий спектр терапевтичних ефектів. Метою роботи було дослідження впливу біологічно активних речовин біотехнологічної води з-під п'явок у штучних екосистемах на виживання нижчих ракоподібних (*Daphnia magna* Straus). Визначали гостру летальну токсичність біотехнологічної води з-під медичної п'явки щодо тест-об'єктів. Показник гострої токсичності, порівняно з контролем, вже в перші години досліду (4–6 годин) становить 3,3% і в подальшому зростає, а починаючи з третьої доби (через 72 та 96 годин) відзначається гостра токсичність на рівні 60,0 і 69,0%, відповідно. Дафнії, які культивувались у біотехнологічній воді з-під медичної п'явки, відрізнялися морфологічно від контрольних: на початкових етапах біотестування вони набували більших середніх розмірів тіла і проявляли більшу активність.

*Ключові слова:* біотестування, медична п'явка, біологічно активні речовини, тест-організм, гостра токсичність.

### **ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ НИЖШИХ РАКООБРАЗНЫХ ПОД ВЛИЯНИЕМ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ ВОДЫ ИЗ-ПОД МЕДИЦИНСКОЙ ПИЯВКИ (*HIRUDO VERBANA*)**

**А. Фролов, Р. Литвиненко**

*Государственное высшее учебное заведение «Запорожский национальный  
университет»*

*ул. Жуковского, 66, Запорожье 69600, Украина*

*e-mail: a\_frolov@ukr.net*

Организм медицинской пиявки производит комплекс уникальных биологически активных веществ, которые выделяются в водную среду вместе с продуктами жизнедеятельности и проявляют широкий спектр терапевтических эффектов. Целью работы было исследование влияния биологически активных веществ биотехнологической воды из-под пиявок в искусственных экосистемах на выживание нижших ракообразных (*Daphnia magna* Straus). Определяли острую летальную токсичность биотехнологической воды из-под медицинской пиявки в отношении тест-объектов. Показатель острой токсичности, по сравнению с контролем, уже в первые часы опыта (4–6 часов) составляет 3,3% и в дальнейшем возрастает, а начиная с третьих суток (через 72 и 96 часов), отмечается острая токсичность на уровне 60,0 и 69,0%, соответственно. Дафнии, которые культивировались в биотехнологической воде из-под медицинской пиявки, отличались морфологически от контрольных: на начальных этапах биотестирования они приобретали более крупные размеры тела и были более активными.

*Ключевые слова:* биотестирование, медицинская пиявка, биологически активные вещества, тест-організм, острая токсичность.

## ПОВЕДІНКОВА РЕАКЦІЯ НА СТРЕС У ЩУРІВ ІЗ РІЗНИМ СОЦІАЛЬНИМ СТАТУСОМ

**В. Пахольченко\*, І. Тубальцева, Є. Тукаленко, М. Макарчук**

*Київський національний університет імені Тараса Шевченка  
вул. Володимирська, 64, Київ 01033, Україна  
e-mail: viktorii@gmail.com*

Особини з різним соціальним статусом демонструють різний поведінковий і фізіологічний профіль. Соціальний стрес у субординантних щурів призводить до зниження показників навчання та збільшення рівня соціальної тривожності. Вплив гострого емоційно-больового стресу не призводив до змін поведінки домінантних щурів, тоді як у субординантних спостерігалось зменшення рівня соціальної тривожності та підвищення успішності навчання.

*Ключові слова:* соціальний стрес, гострий стрес, поведінка, навчання, тривожність.

Соціальність визначають як приналежність до конкретної групи і життєдіяльність у її межах [1]. У персоналізованих співтовариствах особини однієї групи пізнають за певними критеріями один одного і відрізняють кожного члена групи. У таких співтовариствах наявний той чи інший рівень ієрархічних відносин, який відображає нерівнозначність особин одна щодо іншої. Соціальний статус, якого набуває особина у групі, впливає на доступність ресурсів, таких як їжа, територія, партнер для розмноження і т.д. [2]. Отже, рівень соціального статусу є біологічно важливим параметром для особин, які проживають у співтовариствах. Дослідження показали, що низький рівень соціального статусу за багатьма показниками співвідноситься зі станом стресу [2–4]. З іншого боку, домінантні та субдомінантні особини в експериментах на тваринах [5] і в дослідженнях серед людей [6] демонструють схильність до розвитку пов'язаних зі стресом порушень поведінки та фізіологічних функцій. Було продемонстровано, що після соціального конфлікту як у домінантних, так і у субординантних щурів спостерігається збільшення рівня кортикостерону у плазмі крові та серотоніну у префронтальній корі та гіпокампі, в той же час рівень норадреналіну в префронтальній корі та гіпокампі був збільшений тільки у субординантних щурів [7]. Виявлені відмінності у стрес-реакції у тварин із різним соціальним статусом: у домінантних особин зазвичай нижчий базальний рівень активності гіпоталамо-гіпофіз-адреналової системи, але більш інтенсивна її активація у відповідь на вплив стресора [8]. Також було продемонстровано підвищення рівня кортикостерону та інших нейромедіаторів і гормонів у відповідь на гострий стрес у субординантних щурів [9]. У той же час аналогічних даних щодо реакції домінантних тварин нами в літературі практично не було знайдено. Виходячи з аналізу літератури та проведеного нами пілотного експерименту, ми висунули припущення щодо відмінності у реакції на гострий стрес у щурів із різним соціальним статусом. Таким чином, метою представленої роботи було перевірка зазначеної гіпотези.

### Матеріали та методи

Експеримент був проведений на 105 білих безпородних щурах самцях масою 250±30 г на початку експерименту. Було сформовано дві групи: контрольну (n=32), щури

якої не зазнавали впливу досліджуваних факторів і стресу, та групу (n=73), шури якої зазнавали впливу соціального стресу. Після впливу соціального стресу або відповідного періоду для контрольної групи з кожної зі сформованих на попередньому етапі груп шурів виділяли підгрупу тварин, що зазнавали впливу емоційно-больового стресу. Таким чином було сформовано підгрупи шурів:

1. контрольна група (n=20), шури, якої не зазнавали впливу жодного з досліджуваних факторів;
2. група шурів (n=12), які зазнавали впливу гострого емоційно-больового стресу;
- 3.1. група шурів (n=10) з домінантним статусом упродовж соціального стресу;
- 3.2. група шурів (n=11) зі субординантним статусом упродовж соціального стресу;
- 3.3. група шурів (n=15), які не були віднесені до попередніх груп упродовж соціального стресу;
- 4.1. група шурів (n=11) із домінантним статусом упродовж соціального стресу, які зазнавали впливу гострого емоційно-больового стресу;
- 4.2. група шурів (n=10) зі субординантним статусом упродовж соціального стресу, які зазнавали впливу гострого емоційно-больового стресу;
- 4.3. група шурів (n=16), які не набули певного соціального статусу впродовж соціального стресу та які зазнавали впливу гострого емоційно-больового стресу.

На наступному етапі експерименту проводили тестування шурів у таких поведінкових тестах: соціальних взаємодій та радіальному лабіринті.

Процедура соціального стресу [12], використана в даному дослідженні, була організована таким чином, що за 5 днів до початку стресу шурів розміщували в індивідуальних клітках для зняття попереднього соціального досвіду. Після цього на одну добу шурів приблизно однакової ваги розміщували парами у клітках із прозорою плексигласовою перегородкою з отворами, яка дає можливість візуального та нюхового, але не фізичного контактів. Наступного дня кожна пара шурів зазнавала таких маніпуляцій: адаптаційний період – 3 хв, зняття перегородки на 10 хв для соціальних взаємодій. Протягом 10-хвилинного періоду підраховували кількість успішних атак у кожного шура, кількість садок на партнера. Успішною атакою вважали завалювання шура на спину і утримування його в такому положенні більше 3–4 с. Така схема повторювалась кожен день протягом 14 діб. Таким чином кожен шур протягом досвіду соціальних взаємодій мав рівний шанс стати як переможцем, так і переможеним. Тварини, що мали 10 і більше перемог або поразок, визнавались відповідно домінантними або субординантними. Тварини з рівною кількістю перемог і поразок або такі, що не проявляли агоністичних взаємодій, визначались як компромісні тварини.

Гострий електробольовий стрес (ЕБС) моделювали шляхом електрошкірного подразнення кінцівок шурів у камері розміром 15×15×25 см зі струмопровідними стінками та підлогою. Кожна тварина впродовж 20 хв отримувала 60 ударів стабілізованим електричним струмом (1mA) тривалістю 10 с. Інтервали між ударами варіювали від 22 до 25 с.

Для оцінки рівня соціальної тривожності використовували тест соціальних взаємодій [11], у якому експериментальну тварину поміщали у клітку з іншим шуром (індиферентним). Показником підвищеного рівня тривожності вважали зниження активності експериментального шура, спрямованої на індиферентного шура (за тривалістю та кількістю контактів). Додатково за кількістю вставань на задні лапи оцінювали рівень дослідницької активності.

У шестипроменевому радіальному лабіринті кожного дня протягом 12 діб (по 6 хвилин) досліджували поведінку шурів після добової харчової депривації. У кінці кожного

променя міститься шторка, за якою лежить підкріплення – шоколад (“Оленка”, Roshen) розміром 5x5 мм. Щуру необхідно відкрити шторку, щоб отримати підкріплення. У променях 1, 4, 6 шторки закриті, тому щур не має змоги отримати підкріплення. У променях 2, 3, 5 шторки можна відкрити й отримати підкріплення. Очікується, що за період навчання тварина запам’ятає положення відкритих рукавів і не буде заходити у закриті рукави. Визначали й аналізували такі показники: загальна кількість заходів у промені, кількість заходів у закриті промені, кількість повторних заходів у відкриті промені [13].

При аналізі експерименту оцінювали різницю в поведінкових параметрах між щурами зазначених вище груп за допомогою програми IBM SPSS v.20 за критерієм Мана-Уїтні. Ступінь кореляційних зв’язків між поведінковими показниками та соціальним статусом визначали за непараметричним критерієм Спірмена. Дані у тексті представлені у вигляді медіана [25 квартиль; 75 квартиль]. Критичний рівень значущості при перевірці статистичних гіпотез приймали рівним 0,05.

### Результати і їхнє обговорення

Дослідження рівня соціальної тривожності у тесті соціальних взаємодій виявило статистично значущі відмінності за показником сумарної тривалості контактів з індіферентним щуром між групою контрольних щурів з одного боку та домінантними ( $p=1,6 \cdot 10^{-5}$ ) і компромісними щурами ( $p=0,008$ ) з іншого боку (рис. 1). Відрізнялися також показники соціальної тривожності між домінантними та субординантними щурами. Інший, неспецифічний, показник – кількість вставань на задні лапи – відрізнявся у тесті соціальних взаємодій між щурами різних підгруп. Слід відзначити, що для субординантних щурів були характерні найменші значення обох показників, тоді як домінантні щури мали найбільшу тривалість контактів з індіферентним щуром. Найменша тривалість контактів була виявлена у щурів контрольної групи. На наш погляд, це можна пояснити загальним соціальним досвідом щурів із групи соціального стресу, коли кожен щур протягом 14 діб зазнавав соціальних контактів з багатьма щурами, тоді як щури з контрольної групи не мали такої кількості контактів і перший контакт з індіферентним щуром супроводжувався підвищеною ситуативною тривожністю. Щодо різниці між підгрупами щурів, які зазнавали впливу соціального стресу, найменший рівень тривожності спостерігався у домінантних щурів, а найвищий – у субординантних. Вплив гострого електробольового стресу призводив до збільшення показників соціальної тривожності за показниками сумарної тривалості контактів з індіферентним щуром (6 [2;11]), порівняно з контрольними тваринами (14 [10;21]) ( $p=0,005$ ). Не було виявлено відмінностей між рівнем соціальної тривожності у домінантних і субординантних тварин з та без впливу електробольового стресу. З отриманих результатів можна зробити висновок, що вплив електробольового стресу призводить до підвищення рівня соціальної тривожності у щурів, які не мали досвіду соціального стресу. Як видно з рис. 1, вплив гострого стресу призводить до зменшення тривалості контактів у домінантних щурів, що, очевидно, призводить до нівелювання різниці у рівні тривожності між щурами з різним соціальним досвідом.

Порівнюючи успішність навчання в радіальному лабіринті, виявили відмінності між контрольною групою та підгрупою субординантних щурів за практично всіма показниками навчання в радіальному лабіринті: більша кількість заходів у рукави ( $p=0,006$ ), більша кількість повторних заходів у відкриті рукави ( $p=0,022$ ), більший латентний період отримання першого підкріплення ( $p=0,015$ ), менша кількість отриманих підкріплень ( $p=0,007$ ) і нижча продуктивність ( $p=0,044$ ). Було виявлено відмінності між підгрупою домінантних і субординантних щурів за такими показниками: латентний період отримання

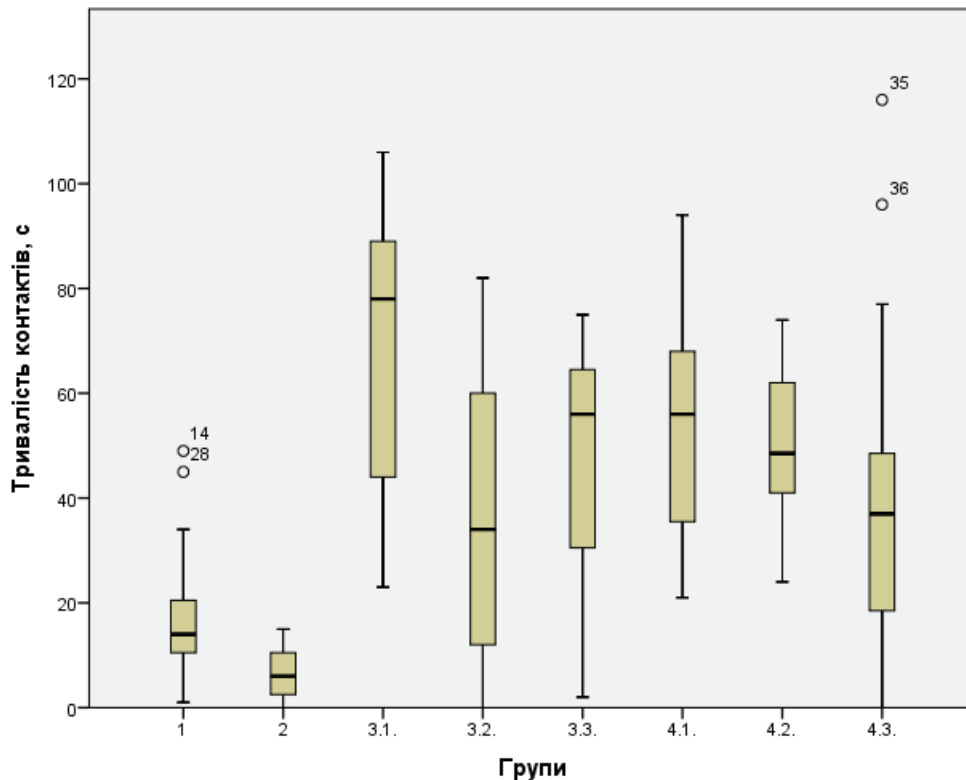


Рис. 1. Тривалість контактів з індивідуальним шуром у тесті соціальних взаємодій: 1 – контрольна група (n=20); 2 – група (n=12); 3.1. – підгрупа домінують шурів (n=10); 3.2. – підгрупа субординантних шурів (n=11); 3.3. – підгрупа компромісних шурів (n=15); 4.1. – підгрупа домінують шурів, які зазнавали впливу гострого стресу (n=11); 4.2. – підгрупа субординантних шурів, які зазнавали впливу гострого стресу (n=10); 4.3. – підгрупа компромісних шурів, які зазнавали впливу гострого стресу (n=16).

першого підкріплення ( $p=0,064$ ), кількість отриманих підкріплень ( $p=0,054$ ). Компромісні щури відрізнялися від контрольних вищою продуктивністю ( $p=0,059$ ), від субординантних – меншим латентним періодом отримання першого підкріплення ( $p=0,004$ ), більшою кількістю отриманих підкріплень ( $p=10^{-6}$ ) та більшою продуктивністю ( $p=0,003$ ). Отримані дані можуть свідчити про порушення у процесах навчання та пам'яті шурів зі субординантним досвідом соціальних взаємодій. У той же час у компромісних шурів, які зазнавали як субординантного, так і домінують досвіду, показники навчання не відрізнялися від домінують шурів, а відмінності між ними та контрольною групою вказують на покращення когнітивних процесів у даній підгрупі шурів. Порівняно з контрольними тваринами щури, які зазнавали впливу гострого стресу, мали недостовірно меншу кількість отриманих підкріплень (3 [0;3] та 0 [0;3] відповідно,  $p=0,066$ ) і тенденцію до зниження продуктивності (0,42 [0;0,59] та 0 [0;0,46] відповідно,  $p=0,079$ ). Не було виявлено відмінностей між рівнем навчання у домінують тварин з та без впливу електробольового стресу. У субординантних тварин, які не зазнавали впливу електро-больового стресу, спостерігали меншу кількість пройдених рукавів ( $p=0,005$ ), порівняно зі щурами, які зазнавали його.



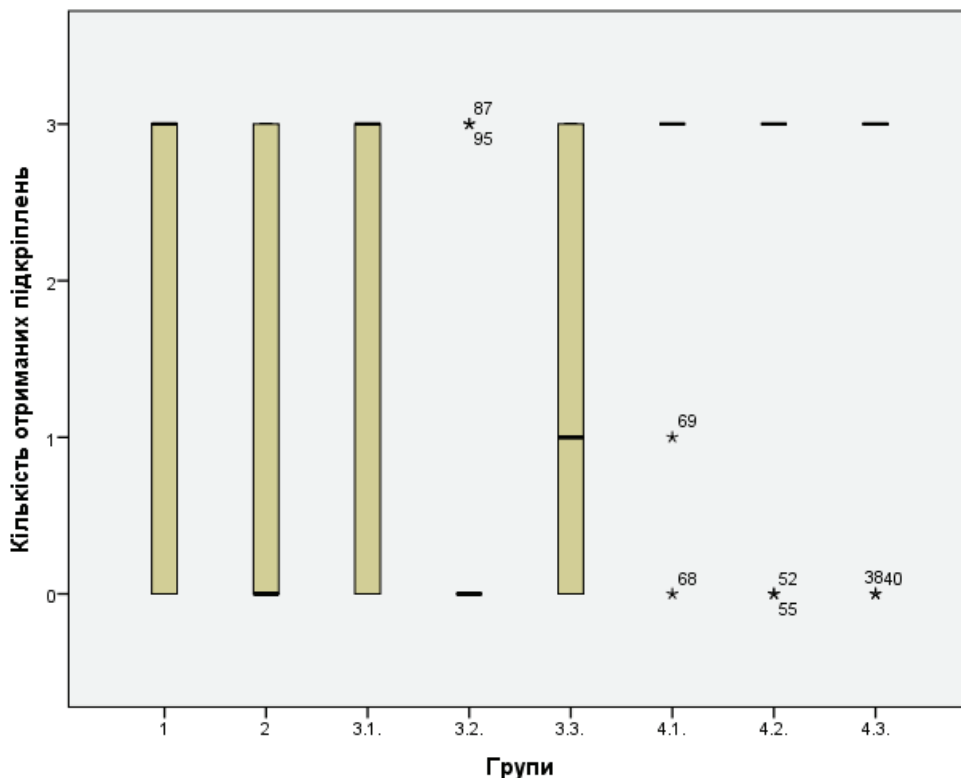


Рис. 2. Кількість отриманих підкріплень у радіальному лабіринті в останній день тестування: 1 – контрольна група (n=20); 2 – група (n=12); 3.1. – підгрупа доміантних щурів (n=10); 3.2. – підгрупа субординантних щурів (n=11); 3.3. – підгрупа компромісних щурів (n=15); 4.1. – підгрупа доміантних щурів, які зазнавали впливу гострого стресу (n=11); 4.2. – підгрупа субординантних щурів, які зазнавали впливу гострого стресу (n=10); 4.3. – підгрупа компромісних щурів, які зазнавали впливу гострого стресу (n=16).

Субординантні щури, які зазнавали впливу гострого стресу, отримували більшу кількість підкріплень ( $p=0,006$ ), демонстрували меншу кількість повторних заходів у відкриті рукави ( $p=0,033$ ) і більшу продуктивність ( $p=0,033$ ) порівняно зі щурами, які не зазнавали впливу гострого стресу. Таким чином, можна припустити, що вплив гострого стресу призводить до погіршення навчання у радіальному лабіринті щурів без досвіду агоністичних взаємодій. У доміантних щурів не спостерігається достовірних змін в успішності навчання, хоча розкид даних щодо кількості отриманих підкріплень зменшується, що видно з рис. 3. У субординантних щурів спостерігається підвищення успішності навчання за рахунок отримання більшої кількості підкріплень і зменшення кількості повторних заходів. Загалом слід відзначити, що збільшення продуктивності навчання спостерігається у всіх груп щурів, які мали досвід соціального та гострого стресу.

Аналізуючи отримані результати, можна зробити висновок, що вплив гострого емоційно-больового стресу на щурів призводить до таких змін у їх поведінковій активності, як збільшення соціальної тривожності й погіршення навчання у радіальному лабіринті. У щурів, які перед впливом гострого стресу мали досвід переважно доміантних соціальних

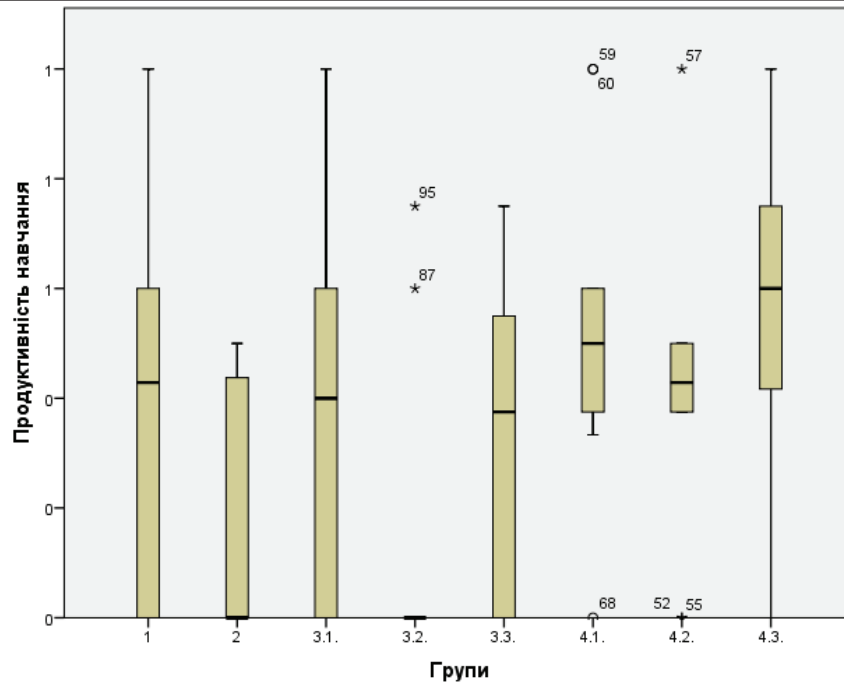


Рис. 3. Продуктивність навчання у радіальному лабіринті: 1 – контрольна група (n=20); 2 – група (n=12); 3.1. – підгрупа домінантних щурів (n=10); 3.2. – підгрупа субординантних щурів (n=11); 3.3. – підгрупа компромісних щурів (n=15); 4.1. – підгрупа домінантних щурів, які зазнавали впливу гострого стресу (n=11); 4.2. – підгрупа субординантних щурів, які зазнавали впливу гострого стресу (n=10); 4.3. – підгрупа компромісних щурів, які зазнавали впливу гострого стресу (n=16).

взаємодій, не спостерігається зазначених змін поведінки. У щурів, які перед впливом гострого стресу мали досвід переважно субординантних соціальних взаємодій, спостерігається покращення показників навчання у радіальному лабіринті.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Шмерлина І. А. Физика социальности // Вестн. Рос. академии наук. 2003. Т. 73. № 6. С. 521–532.
2. Aneshensel C. S. Social stress: Theory and research // Annual review of sociology. 1992. С. 15–38.
3. Barnum C. J., Blandino P. Jr., Deak T. Social status modulates basal IL-1 concentrations in the hypothalamus of pair-housed rats and influences certain features of stress reactivity // Brain, Behavior, and Immunity. 2008. Vol. 22. P. 517–527.
4. Björkqvist K., Österman K., Lagerspetz K. M. J. et al. Aggression, victimization and sociometric status: Findings from Finland, Israel, Italy and Poland. 2001.
5. Courtney DeVries A. Social modulation of stress responses // Physiology & Behavior. 2003. N 79. P. 399–407.
6. Creel S. Social dominance and stress hormones // Trends in Ecology & Evolution. 2001. Iss. 16. Vol. 9. P. 491–497.
7. Finkelstein D. M. Socioeconomic differences in adolescent stress: the role of psychological resources // J. Adolesc Health. 2007. N 40(2). P. 127–134.

8. *Gregus A., Wintink A. J., Davis A. C.* et al. Effect of repeated corticosterone injections and restraint stress on anxiety and depression-like behavior in male rats // Behavioural brain research. 2005. Vol. 1. P. 105–114.
9. *Kudryavtseva N.* The sensory contact model for the study of aggressive and submissive behaviors in male mice // Aggr. Behav. 1991. Iss. 17. Vol. 5. P. 285–291.
10. *Olton D. S., Collison C., Werz M. A.* Spatial memory and radial arm maze performance of rats // Learning and Motivation. 1977. Vol. 3. P. 289–314.
11. *Summers C. H.* Social Interaction Over Time, Implications for Stress Responsiveness // Integ. and Comp. Biol. 2002. Vol. 42. P. 591–599.
12. *Timmer M., Cordero M. I., Sandi C.* The long-term effects of acute stress and hierarchy establishment on aggressive behavior towards an unfamiliar opponent and on monoamine oxidase A and androgen receptor mRNA levels // Neurobiological Mechanisms Involved in the Establishment and Maintenance of Dominance Hierarchies and its Modulation by Stress in Rats. 2011. P. 77.

*Стаття: надійшла до редакції 30.09.13*

*доопрацьована 15.11.13*

*прийнята до друку 27.11.13*

### **BEHAVIORAL REACTIONS ON THE STRESS IN RATS WITH DIFFERENT SOCIAL STATUS**

**V. Pakholchenko, I. Tubaltceva, E. Tukalenko, M. Makarchuk**

*Taras Shevchenko National University of Kyiv  
 64, Volodymyrska St., Kyiv 01033, Ukraine  
 e-mail: viktorii@gmail.com*

Individuals with different social status demonstrate diverse behavioral and physiological profiles. Social stress in subordinates leads to decrease in the level of learning ability and increase in social anxiety. Influence of acute foot-shock stress didn't change the behavior of dominant rats, but increase learning ability and decrease anxiety in subordinates.

*Keywords:* social stress, acute stress, behavior, learning, anxiety.

### **ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ НА СТРЕСС У КРЫС С РАЗЛИЧНЫМ СОЦИАЛЬНЫМ СТАТУСОМ**

**В. Пахольченко, И. Тубальцева, Е. Тукаленко, Н. Макаrchук**

*Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко  
 ул. Владимирская, 64, Киев 01033, Украина  
 e-mail: viktorii@gmail.com*

Особи с различным социальным статусом демонстрируют разные поведенческие и физиологические профили. Социальный стресс у субординантных крыс приводит к снижению успешности научения и увеличению социальной тревожности. Влияние электро-болевого стресса не приводило к изменению поведения доминантных крыс, тогда как у субординантных повышалась успешность обучения и снижалась тревожность.

*Ключевые слова:* социальный стресс, острый стресс, поведение, обучение, тревожность.

## ВПЛИВ N-СТЕАРОЇЛЕТАНОЛАМІНУ В РІЗНИХ ДОЗАХ НА ПОВЕДІНКОВІ РЕАКЦІЇ ХРОНІЧНО АЛКОГОЛІЗОВАНИХ ЩУРІВ У ТЕСТІ ВІДКРИТЕ ПОЛЕ

О. Бондаренко<sup>1\*</sup>, Н. Гула<sup>2</sup>, М. Макарчук<sup>1</sup>, Т. Горідько<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Київський національний університет імені Тараса Шевченка

ННЦ «Інститут біології»

пр. Академіка Глушкова, 2, корп. 12, Київ 03022, Україна

<sup>2</sup>Інститут біохімії імені О.В. Палладіна НАНУ

вул. Леонтовича, 9, Київ 01601, Україна

e-mail: bondarenko\_oleksandr@ukr.net

Досліджували вплив ізольованого та комбінованого з алкоголізацією введення N-стеароїлетаноламіну (NSE) в дозі 0,1 та 5 мг/кг на поведінку щурів у тесті «відкрите поле». Вперше виявлено, що введення NSE в дозі 0,1 мг/кг та 5 мг/кг справляє неоднаковий вплив на поведінку алкоголізованих щурів у відкритому полі, порівняно з відповідним введенням цих доз NSE інтактним тваринам. При цьому ефекти введення низьких і високих доз NSE як інтактним, так і алкоголізованим щурам є прямо протилежними, що може свідчити про залучення різних нейрофізіологічних механізмів у реалізації впливу на поведінку низьких і високих доз NSE у інтактних і алкоголізованих тварин.

*Ключові слова:* N-стеароїлетаноламін, відкрите поле, поведінка, алкоголь.

Ендоканабіноїдна система мозку – це одна з нейрохімічних систем, яка бере безпосередню участь у фізіологічному відновленні після будь-яких стресових впливів. Вважається, що за умов спокою ця система перебуває в неактивному стані й ендоканабіноїди за таких умов не синтезуються [22]. За умов стресу і в період відновлення синтезовані ендоканабіноїди реалізують свій вплив через два типи рецепторів – CB1 і CB2 [31]. Канабіноїдний рецептор CB1 типу (CB1) експресується переважно в мозкові (найбільше в гіпокампі, мозочку та спинному мозку), тому часто згадується як канабіноїдний рецептор мозку [16, 17, 20]. Натомість CB2 рецептор зазвичай згадується як периферичний рецептор, оскільки він найбільше експресується на периферії, зокрема на імунікомпетентних клітинах [14, 25]. На сьогоднішній день існує два ендогенних ліганди CB1 рецепторів, а саме анандамід і 2-арахідоноїлгліцерол, котрі імітують фармакологічну дію  $\Delta^9$ -тетрагідроканабінолу – активної сполуки коноплі та інших синтетичних агоністів CB1 рецепторів [12, 23, 19]. Останнім часом дедалі більше доказів з'являється на користь участі ендогенних канабіноїдів в біологічних функціях, що включає контроль апетиту і прийому їжі [13], а також модуляції деяких фармакологічних ефектів етанолу [8, 9, 19] і поведінки, спрямованої на споживання алкоголю [10, 15, 19]. У свою чергу, сам етанол активує ендоканабіноїдну систему [7]. Більш того, хронічне споживання етанолу має подвійний ефект: з одного боку, спостерігається підвищення рівня обох ендогенних канабіноїдних агоністів, анандаміду та 2-арахідоноїлгліцеролу, а з іншого боку, знижується кількість і експресія CB1 рецепторів, що в сукупності може свідчити на користь участі ендоканабіноїдної системи в нейробіологічних ефектах етанолу [6, 9].

Велика кількість даних свідчить про те, що канабіноїди є анксиолітиками [18, 33]. Це важливо на шляху пошуку нових нейрональних і молекулярних мішеней з метою створення оригінальних анксиолітичних препаратів для лікування тривожних розладів [24].

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

Проте з'ясовано, що при застосуванні низьких доз агоністів CB1 рецепторів виявляється переважно анксиолітична дія, тоді як високі дози, як правило, справляють анксиогенний вплив [33]. Поряд із цим, застосування агоністів CB1 рецепторів може сприяти погіршенню навчання та пам'яті [26, 28, 30, 32], тому актуальним є пошук речовин із потенційними канабіміметичними властивостями, які б не викликали побічних ефектів. Крім того, враховуючи постійно зростаючий обсяг споживання алкогольних напоїв у суспільстві й описану вище властивість етанолу порушувати природний баланс між ендogenous канабіноїдами, доцільним є пошук оптимальних доз канабіноїдних препаратів.

Показано, що в мозкові одночасно з найбільш вивченим ендоканабіноїдом анандамідом синтезується низка інших N-ацилетаноламінів, функціональні властивості яких цілком не з'ясовані [21]. Однією із таких сполук є N-стеароїлетаноламін (NSE), який виявляє канабіміметичні властивості, хоча зв'язування з канабіноїдними рецепторами для цієї речовини поки що не доведене. У наших попередніх дослідженнях ми з'ясували, що введення щурів NSE в дозі 5 мг/кг упродовж 7 днів суттєво пригнічує їхню рухову активність, мало змінюючи рівень емоційності [1]. Також було показано, що введення NSE в дозі 50 мг/кг безпосередньо за 1 хв до гострого алкогольного отруєння нормалізує моторну активність щурів [4], проте для сучасної фармакології важливим є вибір мінімальної ефективної дози. Останнім часом з'явилися роботи [27], в яких виявлено, що введення ендоканабіноїду анандаміду (найбільш вивченого природного агоніста CB1 рецепторів) справляє виражений анксиолітичний ефект на поведінку тварин у відкритому полі та хрестоподібному припіднятому лабіринті саме в дозі 0,1 мг/кг, на відміну від застосування цієї речовини в дозі 0,01 та 1 мг/кг. Тому в даному дослідженні проведено порівняльний аналіз впливу введення NSE в дозі 5 мг/кг та 0,1 мг/кг на поведінкові реакції щурів у відкритому полі ізольовано та на фоні алкоголю. Такі дослідження не лише є вкрай важливими щодо з'ясування фізіологічної ролі NSE, а й дають можливість пошуку оптимальної дози використання цієї речовини, в тому числі в умовах хронічної алкоголізації.

#### Матеріали та методи

Досліди були проведені в умовах хронічного експерименту на 96 білих нелінійних щурах-самцях масою 150–200 г. Рівень вродженої орієнтувально-дослідницької (рухової) активності й емоційності за умов новизни визначали за допомогою методики «відкрите поле» (ВП) [2] двічі: до та після введення досліджуваних речовин і алкоголізації. У всіх тварин реєстрували: латентний період виходу з центральних квадратів, кількість центральних і периферичних квадратів, які були перетнуті (горизонтальна рухова активність), підняття на задні лапи (вертикальна рухова активність), кількість і тривалість грумінгу. Горизонтальна та вертикальна рухова активність виступала маркером дослідницької активності, а кількість і тривалість реакцій грумінгу та латентний період виходу з центральних квадратів – проявом рівня емоційного збудження.

На основі першого тестування у відкритому полі за всіма зареєстрованими показниками всіх щурів було поділено на 6 зрівноважених груп:

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

II група – «NSE-0,1» (n=12) – тварини, які 7 днів отримували NSE в дозі 0,1 мг/кг через зонд;

III група – «NSE-5» (n=12) – тварини, які 7 днів отримували NSE в дозі 5 мг/кг через зонд;

IV група – «Алкоголь» (n=20) – щури з моделлю хронічної 30-денної AI;

V група – «Алк+NSE-0,1» (n=20) – щури, які останні 7 діб 30-денної алкоголізації отримували водну суспензію NSE в дозі 0,1 мг/кг через зонд;

VI група – «Алк+NSE-5» (n=19) – щури, які останні 7 діб 30-денної алкоголізації отримували водну суспензію NSE в дозі 5 мг/кг через зонд;

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

Хронічну алкогольну інтоксикацію (АІ) здійснювали у 2 етапи: на I етапі визначали схильність щурів до етанолу за допомогою «двопляшкового» методу. Тварин, які не мали до цього контакту з етанолом, саджали в індивідуальні клітки, оснащені двома поїлками: одна з водою, інша з 15% розчином етанолу. Протягом цієї фази тварини впродовж 14 діб мали вільний вибір між розчином етанолу та водою. Раз на добу знімали показники індивідуального об'єму випитого спирту за одиницю часу (г/кг/добу) та відсоткове співвідношення випитого спирту до об'єму всієї рідини. У роботі [5] описано, що вроджена схильність до вживання етанолу має зв'язок із рівнем поведінкових реакцій, тому цей етап дав змогу до початку 30-денної примусової алкоголізації зрівноважити щурів IV, V та VI групи не лише на основі поведінкових характеристик, а й за рівнем спонтанного споживання етанолу. На II етапі проводили примусову алкоголізацію шляхом використання етанолу як єдиного джерела рідини впродовж 30 днів. Після цього для оцінювання індивідуального рівня споживання алкоголю протягом 7 днів знов оснащували клітки двома поїлками (одна в водою, інша з 15% розчином етанолу) [3].

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

Після закінчення алкоголізації та введення NSE проводили повторне (друге) тестування у ВП. Для статистичного аналізу даних використовували програму Statistica for Windows 7.0 (StatSoft). Дані представляли у вигляді медіани та 25 і 75% квантилів. Критичний рівень значущості при перевірці статистичних гіпотез приймали рівним 0,05.

### Результати і їхнє обговорення

Повторне тестування тварин у ВП після завершення алкоголізації та введення NSE показало, що тварини III групи мають найнижчий рівень рухової активності, що цілком узгоджується з результатами наших попередніх досліджень [1]. Проте у щурів, які отримували NSE в дозі 0,1 мг/кг ми не виявили статистично значущої різниці за рівнем горизонтальної рухової активності порівняно зі щурами I групи. Разом з тим, у щурів V групи, які на фоні вживання алкоголю отримували таку ж дозу NSE, спостерігається тенденція до зниження рухової активності порівняно з тваринами I (p=0,06) та II (p=0,07) групи. При дослідженні рухової активності кожної окремої групи (порівняно з першим тестуванням) спостерігається зниження даного показника у тварин III (p<0,05), IV, V та VI групи (p<0,01) і відсутність такої різниці у тварин II групи, що також може свідчити про відсутність впливу NSE в дозі 0,1 мг/кг на горизонтальну рухову активність у тварин при його ізольованому застосуванні (рис. 1). Що стосується кількості перетнутих внутрішніх квадратів щурами різних груп, то статистично значущої різниці між групами та відмінностей після повторного тестування в межах окремих груп тварин нами не виявлено.

Наші дослідження показали, що рівень вертикальної активності щурів (кількість стійок на стіну) при повторному тестуванні достовірно знижувався у тварин III, IV, V та VI



групи ( $p < 0,05$ ) та мав тенденцію до зниження у тварин I ( $p = 0,07$ ) та II ( $p = 0,09$ ) групи. При цьому у тварин III групи цей показник був дещо нижчий ( $p = 0,06$ ), порівняно зі щурами II групи (рис. 2). Що стосується кількості стійок на задні лапи без опори на стінку (рис. 3), то у тварин VI групи цей показник був статистично значуще вищим, порівняно зі щурами II, III та IV групи ( $p < 0,05$ ), що може свідчити про збільшення вертикальної активності у тварин, які на фоні алкоголю отримували NSE в дозі 5 мг/кг. Повторне тестування показало, що у тварин II ( $p = 0,07$ ), III ( $p = 0,07$ ), IV ( $p < 0,05$ ) та V ( $p < 0,05$ ) групи цей показник нижчий, порівняно з першим тестуванням у відповідних групах щурів. Це може свідчити про зниження вертикальної активності у тварин, які отримували етанол ізольовано та в поєднанні з NSE в дозі 0,1 мг/кг.

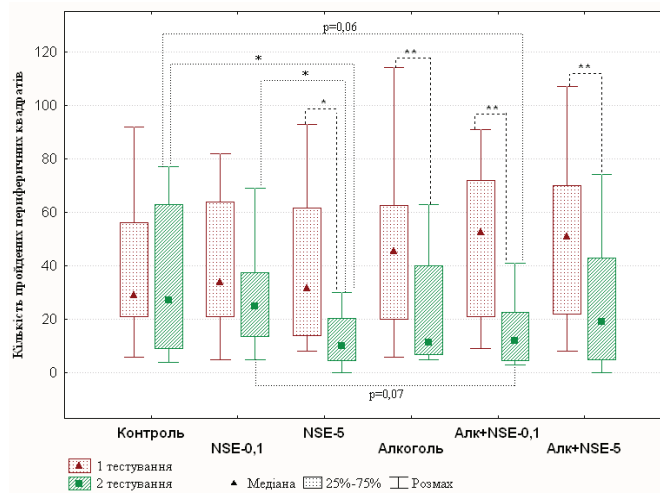


Рис. 1. Рухова активність (кількість пройдених периферичних квадратів) щурів I–VI групи під час тестування у відкритому полі. «1 тестування» – до алкоголізації, «2 тестування» – після алкоголізації, \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ .

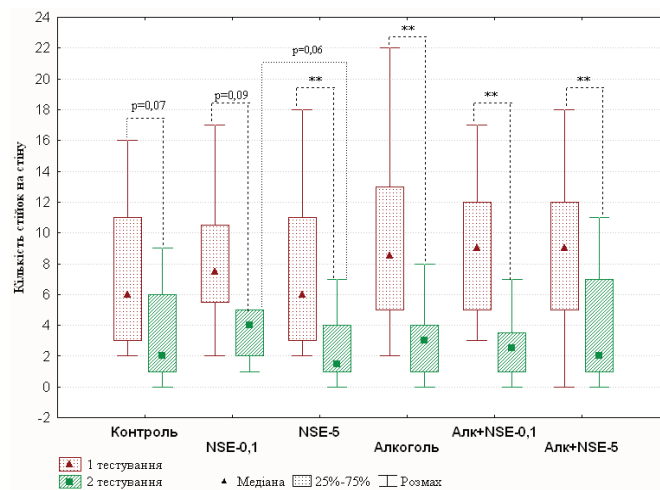


Рис. 2. Вертикальна активність (кількість стійок на стіну) щурів I–VI групи під час тестування у відкритому полі. «1 тестування» – до алкоголізації, «2 тестування» – після алкоголізації, \*\* –  $p < 0,01$ .

Важливим показником емоційної реактивності тварин є латентний період виходу з центральних квадратів. У нашому дослідженні при повторному тестуванні у ВП ми спостерігали статистично значуще збільшення даного показника у щурів III ( $p < 0,05$ ) та VI ( $p < 0,01$ ) групи, порівняно з першим тестуванням. Що стосується тварин інших груп, то у щурів III та VI групи при повторному тестуванні цей показник був достовірно більшим, порівняно зі щурами IV групи ( $p < 0,05$ ). Ці дані дають підстави говорити про зростання рівня емоційної напруженості в цих групах щурів, проте лише порівняно зі щурами, які отримували ізолювано алкоголь (рис. 3).

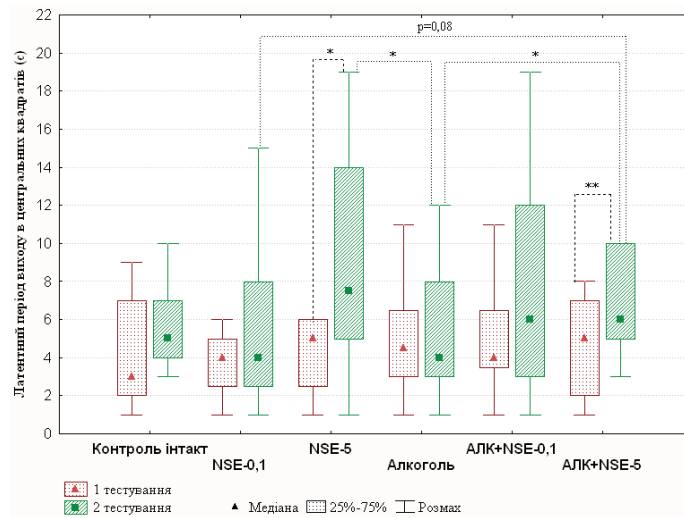


Рис. 3. Латентний період виходу з центрального квадрата у щурів I–VI групи під час тестування у відкритому полі. «1 тестування» – до алкоголізації, «2 тестування» – після алкоголізації, \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ .

Аналіз ґрумінгової активності тварин різних груп показав, що при повторному тестуванні кількість реакцій ґрумінгу достовірно знижується у тварин I ( $p < 0,05$ ), IV ( $p < 0,01$ ) та V ( $p < 0,01$ ) групи і має тенденцію до зниження у щурів III ( $p = 0,06$ ) та VI ( $p = 0,08$ ) групи. У тварин II групи статистично значущої різниці немає, що може свідчити про відсутність впливу NSE в дозі 0,1 мг/кг на емоційну активність щурів, за умови впливу лише NSE (рис. 4). Що стосується різниці у тривалості ґрумінгу між першим і другим тестуванням, то вона була відсутня у щурів I, II та III групи, а у щурів IV ( $p < 0,01$ ), V та VI ( $p < 0,05$ ) груп достовірно знижувалася порівняно з першим тестуванням. Міжгруповий аналіз тривалості ґрумінгу показав, що у щурів IV та V групи цей показник при повторному тестуванні статистично значуще знижувався, порівняно з тваринами I групи ( $p < 0,05$ ), що може свідчити про зниження емоційної активності у тварин, які отримували алкоголь ізолювано та в поєднанні з NSE в дозі 0,1 мг/кг. Крім того, у щурів V групи тривалість ґрумінгу була нижчою порівняно з тваринами II та III групи ( $p = 0,08$ ) (рис. 5).

Отримані поведінкові дані дають можливість зробити висновок, що дана модель хронічної алкоголізації знижує емоційну та не впливає на рухову активність. Це може свідчити про анксиолітичну дію даної моделі алкоголізації на поведінку тварин у відкритому полі. Ізолюване введення NSE в дозі 0,1 мг/кг не впливає на показники рухової та емоційної активності, як при повторному тестуванні, так і порівняно з контролем у другому тестуванні. Натомість введення NSE в дозі 5 мг/кг знижує рухову та не впливає на емо-

ційну активність, порівняно з інтактними тваринами. Це вказує на незначне посилення тривожно-подібної поведінки у таких тварин, що, в першу чергу, може бути пов'язане зі специфічною дією NSE (поряд із речовинами, які активують  $5\text{H}_1$  рецептори) на мигдалину, котра є центральною ланкою реакції страху [11], але це потребує подальших досліджень.

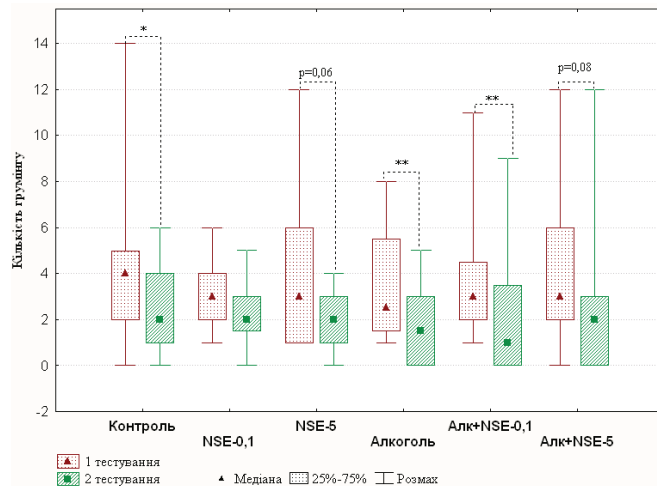


Рис. 4. Кількість реакцій грумінгу у щурів I-VI групи під час тестування у відкритому полі. «1 тестування» – до алкоголізації, «2 тестування» – після алкоголізації, \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ .

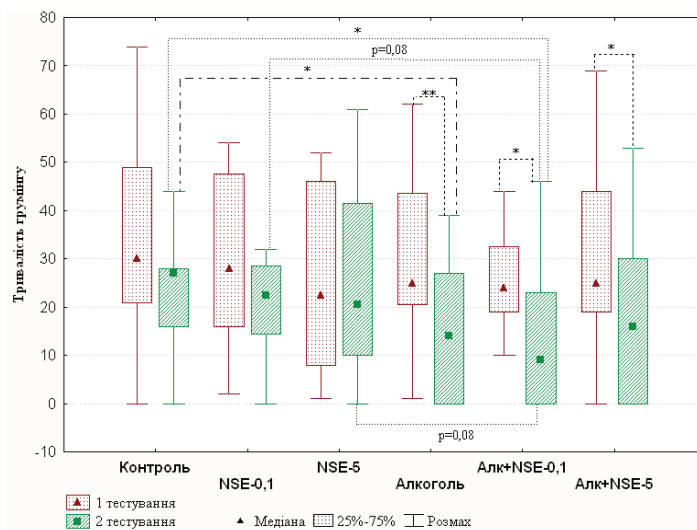


Рис. 5. Тривалість реакцій грумінгу у щурів I-VI групи під час тестування у відкритому полі. «1 тестування» – до алкоголізації, «2 тестування» – після алкоголізації, \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ .

Проте комбіноване застосування різних доз NSE на фоні алкоголю потенціює дещо протилежні ефекти. Після введення NSE в дозі 0,1 мг/кг на фоні алкоголю зміни всіх поведінкових показників аналогічні щурам, які вживали тільки етанол, проте у таких щурів спостерігається тенденція до зменшення горизонтальної рухової активності порівняно з контролем, що може свідчити про певне посилення тривожно-подібної поведінки у таких тварин. Такі результати, судячи зі всього, можна пояснити тим, що, як відомо, алкоголь

збільшує рівень анандаміду в мозку щурів, котрий у свою чергу, здатен викликати катаlepsію (завмирання) та зменшення рухливості [6, 21]. Тому зменшення локомоторної активності у тварин, які на фоні алкоголю отримували NSE в дозі 0,1 мг/кг, можливо, саме і відбувається внаслідок комбінованої дії алкоголю та екзогенного NSE, а також зміни рівня ендогенних канабіноїдів. Натомість після комбінованого з алкоголем введення NSE в дозі 5 мг/кг ми не спостерігали будь-яких відмінностей у руховій і емоційній активності порівняно з інтактними тваринами, як це спостерігається за умови ізольованого введення NSE в дозі 5 мг/кг і алкоголю. Проте у щурів, які на фоні алкоголю отримували NSE в дозі 5 мг/кг, достовірно збільшувався латентний період виходу з центральних квадратів, порівняно зі щурами, які вживали тільки етанол, що може свідчити про наявність певного модулюючого впливу NSE на поведінку алкоголізованих тварин. На нашу думку, цей вплив може полягати у зниженні анксиолітичного ефекту, викликаного вживанням алкоголю, тому доцільним є подальше вивчення впливу NSE на поведінку алкоголізованих тварин, включаючи різні види навчання і пам'яті.

У результаті проведених досліджень було встановлено, що NSE в дозі 0,1 та 5 мг/кг має протилежні ефекти за умови ізольованого їх введення та комбіновано з алкоголем. Ізольоване введення NSE в дозі 0,1 мг/кг не впливає, а в дозі 5 мг/кг знижує рухову активність у щурів, причому такі відповідні зміни поведінки тварин цих груп у ВП є закономірними і повторюваними. Хронічна 30-денна алкоголізація зменшує тривожно-подібну поведінку у тварин в тесті ВП. Введення NSE в дозі 0,1 мг/кг на фоні алкоголю зменшує рухову активність, а в дозі 5 мг/кг нівелює зміни поведінкових реакцій, викликаних введенням алкоголю.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Бондаренко О., Гула Н., Макарчук М. та ін. Вплив N-стеароїлетаноламіну та хронічної алкоголізації на поведінку щурів в тесті «Відкрите поле» // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2013. Вип. 62. С. 285–293.
2. Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Д. П. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. М.: Медицина, 1991. С. 45-68.
3. Пархоменко Ю. М., Донченко Г. В., Пилипчук С. Ю. Характерные метаболические нарушения в тканях крыс, вызванные длительным приемом алкоголя // Укр. біохім. журн. 2007. Т. 79. № 3. С. 62–68.
4. Пат. 74117 UA. МПК А61К 31/13 (2006.01), А61Р25/32 (2006.01), А61Р39/06 (2006/01). Засіб для профілактики та зняття алкогольної інтоксикації / Гула Н.М., Горідько Т.М., Косякова Г.В., Бердишев А.Г., Клімашевський В.М., Комісаренко С.В. Заявл. 16.11.2010. Опубл. 25.10.2012. Бюл. № 20. 8 с.
5. Коваленко О. А., Овчарик Є. М., Бондаренко О. В., Макарчук М. Ю. Вплив рівня поведінкових реакцій на здатність до навчання в щурів з різним ступенем алкогольної мотивації // Вісн. КНУ ім. Тараса Шевченка. 2010. № 21. (208). С. 54–59.
6. Basavarajappa B. S., Hungund B. L. Chronic ethanol increases the cannabinoid receptor agonist anandamide and its N-arachidonoylphosphatidylethanolamine in SK-N-SH cells // J. Neurochem. 1999. Vol. 72. N 2. P. 522–528.
7. Basavarajappa B. S., Hungund B. L. Role of the endocannabinoid system in the development of tolerance to alcohol // Alcohol. Alcohol. 2005. Vol. 40. N 1. P. 15–24.
8. Basavarajappa B. S., Cooper T. B., Hungund B. L. Chronic ethanol administration down-regulates cannabinoid receptors in mouse brain synaptic plasma membrane // Brain Research. 1998. Vol. 793. P. 212–218.

9. *Basavarajappa B. S., Saito M., Cooper T. B., Hungund B. L.* Stimulation of cannabinoid receptor agonist 2-arachidonylglycerol by chronic ethanol and its modulation by specific neuromodulators in cerebellar granule neurons // *Biochim. Biophys. Acta.* 2000. Vol. 1535. P. 78–86.
10. *Colombo G., Serra S., Brunetti G.* et al. Stimulation of voluntary ethanol intake by cannabinoid receptor agonists in ethanol preferring sP rats // *Psychopharmacol. (Berl).* 2002. Vol. 159. N 2. P. 181–187.
11. *Davis M., Rainnie D., Cassell M.* Neurotransmission in the rat amygdala related to fear and anxiety // *Trends Neurosci.* 1994. Vol. 17. N 5. P. 208–214.
12. *Devane W. A., Hanus L., Breuer A.* et al. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor // *Sci.* 1992. Vol. 258. P. 1946–1949.
13. *Di Marzo V., Goparaju S. K., Wang L.* et al. Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake // *Nature.* 2001. Vol. 410. P. 822–825.
14. *Facci L., Dal Toso R., Romanello S.* et al. Mast cells express a peripheral cannabinoid receptor with differential sensitivity to anandamide and palmitoylethanolamide // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1995. Vol. 92. P. 3376–3380.
15. *Gallate J. E., Saharov T., Mallet P. E., McGregor I. S.* Increased motivation for beer in rats following administration of a cannabinoid CB1 receptor agonist // *Eur. J. Pharmacol.* 1999. Vol. 370. P. 233–240.
16. *Herkenham M., Lynn A. B., Johnson M. R.* et al. Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study // *J. Neurosci.* 1991. Vol. 11. N 2. P. 563–583.
17. *Herkenham M.* Localization of cannabinoid receptors in brain and periphery In: *Pertwee RG.* Editor. *Cannabinoid Receptors.* New York: Academic Press, 1995. P. 145–166.
18. *Hill M. N., Gorzalka B. B.* The endocannabinoid system and the treatment of mood and anxiety disorders // *CNS Neurol. Disord. Drug Targets.* 2009. Vol. 8. P. 451–458.
19. *Hungund B. L., Basavarajappa B. S., Vadasz C.* et al. Ethanol, endocannabinoids and cannabinoidergic signaling system // *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 2002. Vol. 26. P. 565–574.
20. *Lévénès C., Daniel H., Soubrié P., Crépel F.* Cannabinoids decrease excitatory transmission and impair long-term depression in rat cerebellar Purkinje cells // *J. Physiol.* 1998. Vol. 510. P. 867–879.
21. *Maccarrone M., Cartoni A., Parolaro D.* et al. Cannabimimetic activity, binding, and degradation of stearoylethanolamide with in the mouse central nervous system // *Mol. Cell Neurosci.* 2002. Vol. 21. N 1. P. 126–140.
22. *Marsicano G., Wotjak C. T., Azad S. C.* et al. The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories // *Nature.* 2002. Vol. 418. P. 530–534.
23. *Mechoulam R., Fride E.* The unpaved road to the endogenous brain cannabinoid ligands, the anandamides. In: *Pertwee RG.* Editor. *Cannabinoid Receptors.* London: Academic Press. 2005. P. 233–258.
24. *Millan M. J.* The neurobiology and control of anxious states // *Progr Neurobiol.* 2003. Vol. 70. N 2. P. 83–244.
25. *Munro S., Thomas K. L., Abu-Shaar M.* Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids // *Nature.* 1993. Vol. 365. P. 61–65.
26. *O'Shea M., Singh M. E., McGregor I. S., Mallet P. E.* Chronic cannabinoid exposure produces lasting memory impairment and increased anxiety in adolescent but not adult rats // *J. Psychopharmacol.* 2004. Vol. 18. N 4. P. 502–508.

27. *Ribeiro A., Ferraz-de-Paula V., Pinheiro M. L., Palermo-Neto J.* Dose-response effects of systemic anandamide administration in mice sequentially submitted to the open field and elevated plus-maze tests // *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2009. Vol. 42. P. 556–560.
28. *Robinson L., Hinder L., Pertwee R. G., Riedel G.* Effects of delta-9-THC and WIN 55,212-2 on place preference in the water maze in rats // *Psychopharmacol. (Berl)*. 2003. Vol. 166. P. 40–50.
29. *Stella N., Schweitzer P., Piomelli D.* A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation // *Nature*. 1997. Vol. 388. P. 773–778.
30. *Sullivan J. M.* Cellular and molecular mechanisms underlying learning and memory impairments produced by cannabinoids // *Learn. Mem.* 2000. Vol. 7. P. 132–139.
31. *Takayuki S., Keizo W.* Cannabinoid receptors and their endogenous ligands // *J. Biochem.* 2002. Vol. 132. N 1. P. 7–12.
32. *Varvel S. A., Anum E. A., Lichtman A. H.* Disruption of CB1 receptor signaling impairs extinction of spatial memory in mice // *Psychopharmacol. (Berl)*. 2005. Vol. 179. P. 863–872.
33. *Viveros M., Marco E.M., File S. E.* Endocannabinoid system and stress and anxiety responses // *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2005. Vol. 81. N 2. P. 331–342.

*Стаття: надійшла до редакції 30.09.13*

*доопрацьована 23.01.14*

*прийнята до друку 23.01.14*

## **EFFECT OF N-STEAROYLETHANOLAMINE IN DIFFERENT DOSES ON BEHAVIOR OF RATS AFTER CHRONIC ALCOHOLIZATION IN “OPEN-FIELD”**

**O. Bondarenko<sup>1\*</sup>, N. Gula<sup>2</sup>, M. Makarchuk<sup>1</sup>, T. Goridko<sup>2</sup>**

*<sup>1</sup>Taras Shevchenko National University of Kyiv  
Educational and Scientific Centre «Institute of Biology»  
2, Academician Glushkov Ave., Kyiv 03022, Ukraine*

*<sup>2</sup>Palladin Institute of Biochemistry,  
National Academy of Sciences of Ukraine (NASU)  
9, Leontovych St., Kyiv 01601, Ukraine  
e-mail: bondarenko\_oleksandr@ukr.net*

The effect of N-stearoylethanolamine (NSE) administration (isolated and combined with alcoholization) at a dose of 0.1 and 5 mg/kg on the behavior reactions of rats in the “open field” test was investigated. For the first time ever it was revealed that the introduction of NSE at a dose of 0.1 mg/kg and 5 mg/kg produced a different effect on the rats’ behavior after alcoholization in the “open field” compared with intact animals. In addition to the above the effects of the introduction of low and high doses of NSE to the intact rats and rats after alcoholization are diametrically opposed, which may indicate the involvement of different neurophysiological mechanisms in implementation of the effects of low and high doses of NSE on the behavior of the intact animals and animals after alcoholization.

*Keywords:* N-stearoylethanolamine, open field, behavior, alcohol.



**ВЛИЯНИЕ N-СТЕАРОИЛЭТАНОЛАМИНА В РАЗНЫХ ДОЗАХ  
НА ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ ХРОНИЧЕСКИ АЛКОГОЛИЗИРОВАННЫХ  
КРЫС В ТЕСТЕ ОТКРЫТОЕ ПОЛЕ**

**А. Бондаренко<sup>1\*</sup>, Н. Гула<sup>2</sup>, Н. Макаруч<sup>1</sup>, Т. Горидько<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Київський національний університет імені Тараса Шевченка  
НУЦ «Інститут біології»*

*пр. Академіка Глушкова, 2, корп.12, Київ 03022, Україна*

<sup>2</sup>*Інститут біохімії імені О.В. Палладина НАНУ*

*ул. Леонтовича, 9, Київ 01601, Україна*

*e-mail: bondarenko\_oleksandr@ukr.net*

Исследовали влияние изолированного и комбинированного с алкоголизацией введения N-стеароилэтанолamina (NSE) в дозе 0,1 и 5 мг/кг на поведение крыс в тесте «открытое поле». Впервые обнаружено, что введение NSE в дозе 0,1 и 5 мг/кг оказывает неодинаковое влияние на поведение алкоголизованных крыс в открытом поле, по сравнению с соответствующим введением этих доз NSE интактным животным. При этом эффекты введения низких и высоких доз NSE как интактным, так и алкоголизованным крысам являются прямо противоположными, что может свидетельствовать о вовлечении различных нейрофизиологических механизмов в реализации влияния на поведение низких и высоких доз NSE у интактных и алкоголизованных животных.

*Ключевые слова:* N-стеароилэтанолamin, открытое поле, поведение, алкоголь.

## ЗМІСТ ОГЛЯДИ

<i>Ю. Здвіжков, М. Бура</i> Особливості застосування полімерних носіїв на основі поліетиленгліколю для доставки ліків в орган-мішень .....	3
<i>Л. Константиненко</i> Реєстр прісноводних круговійчастих інфузорій України .....	21
<i>І. Стадник</i> Роль трансмембранного потенціалу і циклін-залежних кіназ у контролі проліферації та диференціації клітин .....	33
<i>Є. Воробей, О. Воронкова, О. Сірокваша, А. Вінніков</i> Лікувально-профілактичні препарати бактеріофагів .....	52

### БІОТЕХНОЛОГІЯ

<i>Н. Корзіна, І. Митрофанова</i> Розвиток експлантів ломиносу ( <i>Clematis</i> L.) на етапі введення за умов <i>in vitro</i> .....	67
---	----

### БІОФІЗИКА

<i>Ю. Бено, М. Дика, К. Скварко</i> Дисперсійний аналіз впливу постійного магнітного поля на проростання насіння та ріст кореня і стебла дурману звичайного на ранніх етапах онтогенезу .....	75
<i>М. Яремчук, М. Дика, Д. Санагурський</i> Процеси ліпопероксидації зародків в'юна за впливу мікрохвильового випромінювання .....	82

### БІОХІМІЯ

<i>О. Бучко, Л. Степченко</i> Вільнорадикальні процеси й антиоксидантна система організму свиней за дії гумінової добавки .....	90
<i>Д. Шибкова, Н. Єфімова, Н. Сибірна, О. Аклєєв</i> Цитологічні ефекти у клітинах кісткового мозку при хронічному низькоінтенсивному $\gamma$ -опроміненні експериментальних тварин .....	97
<i>О. Моравська</i> Окремі показники ліпідного обміну в сироватці крові гусей залежно від додаткового введення різних доз вітаміну Е в раціон у репродуктивний період .....	105

### БОТАНІКА

<i>О. Фіщук, А. Одінцова</i> Морфологія та васкулярна анатомія квіток <i>Dracaena surculosa</i> Lindl. і <i>Sansevieria aethiopica</i> Thunb. ( <i>Asparagaceae</i> Juss.) .....	113
<i>Л. Буньо, О. Худик, В. Оліферчук, О. Цвілінюк, О. Терек</i> Мікологічна характеристика кореневої зони рослин <i>Carex hirta</i> L. у нафтозабрудненому дерново-підзолистому ґрунті .....	124
<i>Л. Боровик</i> Видовий склад перелогових угруповань початкових стадій сукцесії на північному сході Луганської області .....	137

<i>Т. Фостяк</i> До історії дослідження рослинності високогір'я Свидовецького масиву Українських Карпат .....	147
<i>М. Гелеш, А. Прокопів</i> Біоморфологічні особливості <i>Veronica aphylla</i> L. ....	153
<i>В. Начичко</i> Рід <i>Thymus</i> L. ( <i>Labiatae</i> Juss.) у флорі Українських Карпат: систематика і таксономічні проблеми .....	159

#### ГЕНЕТИКА

<i>Г. Акініна, В. Попов</i> Генетична структура колекції сортів нуту за морфологічними та молекулярними маркерами .....	170
<i>О. Лановенко</i> Регіональний моніторинг природжених вад розвитку в Херсонській області .....	177
<i>О. Ципік, Ю. Дацюк, К. Флярд, В. Федоренко, Б. Остап</i> YtrA-подібний регуляторний ген SSFG_05654 впливає на морфогенез і стійкість до антибіотиків у <i>Streptomyces ghanaensis</i> ATCC14672 .....	184
<i>І. Боднар, О. Ільков, С. Горбулінська, Л. Боднар</i> Порівняльна характеристика харчових ароматизаторів різних виробників щодо мутагенної активності .....	193
<i>О. Блаженко</i> Делеція гена MET4 знижує толерантність до іонів кадмію та їх акумуляцію у клітинах дріжджів <i>Hansenula polymorpha</i> і <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	200
<i>М. Лозинська, Р. Лозинський</i> Прогностичне значення анеуплоїдії та поліплоїдії у колоректальному канцерогенезі .....	206
<i>Г. Мутенко, М. Лопатнюк, Л. Горбаль, А. Лужецький, В. Федоренко, Б. Остап</i> Порівняння активності трьох гетерологічних промоторів у <i>Streptomyces ghanaensis</i> ATCC14672 .....	213

#### ЕКОЛОГІЯ

<i>Т. Коломбар, О. Пахомов, О. Жуков</i> Роль педотурбаційної активності сліпака звичайного ( <i>Spalax microphthalmus</i> ) у формуванні структури ґрунтового покриву .....	219
<i>В. Савосько</i> Вміст і розподіл органічного вуглецю у культурбіогеоценозах деревних насаджень степу в умовах промислового регіону .....	226

#### ЗООЛОГІЯ

<i>А. Стадниченко, В. Гирин</i> Вплив біотичних чинників на ритм серцевих скорочень у перлівницевих ( <i>Bivalvia</i> , <i>Unioninae</i> , <i>Anodontinae</i> ) .....	235
<i>В. Стах, М. Белоконь, І. Хамар, Ю. Белоконь, О. Решетило</i> Морфологічний та генетичний поліморфізм зелених жаб ( <i>Pelophylax</i> ) водойм Західної України .....	241

<i>Д. Медовник, В. Алексієнко</i> Характеристика іхтіофауни колектора на р. Нивка (м. Київ) .....	250
<i>Т. Шевчук</i> Видовий склад і поширення кліщів роду <i>Unionicola</i> (Acari: Hydracarina: Unionicolidae) – паразитів перлівницевих (Mollusca: Bivalvia: Unionidae) у річкових басейнах України .....	255
<i>О. Іванець</i> Таксономічна структура кладоцеровців Українського Розточчя .....	260

#### МІКРОБІОЛОГІЯ

<i>О. Масловська, С. Гнатуш</i> Інтенсивність процесів перекисного окиснення ліпідів і показники системи антиоксидантного захисту клітин <i>Desulphuromonas acetoxidans</i> IMB В-7384 за впливу ферум (III) цитрату .....	270
<i>О. Громико</i> Антагоністичні властивості актиноміцетів, виділених із ризосфери чистотілу великого <i>Chelidonium majus</i> L. ....	279

#### ФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИН

<i>С. Жадько</i> Раннє збільшення вмісту $H_2O_2$ і активності пероксиредоксину й тіоредоксину в культурі тканини <i>Arabidopsis thaliana</i> при осмотичному стресі різної інтенсивності .....	287
<i>В. Більчук, Г. Россихіна-Галича</i> Зміни активності ферментів антиоксидантного захисту в вегетативних органах <i>Populus nigra</i> L. в умовах аеротехногенного забруднення середовища .....	293
<i>А. Парфенюк, О. Стерлікова, І. Безноска</i> Вплив <i>Micrococcus luteus</i> ЛБК1 на ріст рослин сортів/гібридів огірка і перцю солодкого .....	300
<i>В. Федак, О. Мамчур, Й. Рувіс</i> Аніонні жирні кислоти в зерні кукурудзи у період його дозрівання за впливу зеастимуліну та рівня ґрунтового живлення .....	305

#### ФІЗІОЛОГІЯ ЛЮДИНИ І ТВАРИН

<i>О. Фролов, Р. Литвиненко</i> Життєздатність нижчих ракоподібних під впливом біологічно активних речовин біотехнологічної води з-під медичної п'явки ( <i>Hirudo verbana</i> ) .....	313
<i>В. Пахольченко, І. Тубальцева, Є. Тукаленко, М. Макаруч</i> Поведінкова реакція на стрес у щурів із різним соціальним статусом .....	320
<i>О. Бондаренко, Н. Гула, М. Макаруч, Т. Горідько</i> Вплив N-стеароїлетаноламіну в різних дозах на поведінкові реакції хронічно алкоголізованих щурів у тесті відкрите поле .....	327

## CONTENS

### REVIEW

<i>Y. Zdvizhkov, M. Bura</i> Particular qualities of application of polyethylene glycol-based polymeric carrier for drug delivery to the goal target .....	3
<i>L. Konstantynenko</i> The list of the freshwater peritrichia of the Ukraine .....	21
<i>I. Stadnyk</i> Role of transmembrane potential and cyclin-dependent kinases in control of cell proliferation and differentiation .....	33
<i>E. Vorobey, O. Voronkova, E. Sirokvasha, A. Vinnikov</i> Treatment and prophylactic preparates of bacteriophages .....	52

### BIOTECHNOLOGY

<i>N. Korzina, I. Mitrofanova</i> Development of <i>Clematis</i> ( <i>Clematis</i> L.) explants during the stage of introduction in conditions <i>in vitro</i> .....	67
---	----

### BIOPHYSICS

<i>Yu. Beno, M. Dyka, K. Skvarko</i> Analysis of variance the influence of constant magnetic field on seed germination, growth of roots and stems of <i>Datura stramonium</i> L. in the early stages ontogenesis .....	75
<i>M. Yaremchuk, M. Dyka, D. Sanagursky</i> Lipid peroxidation processes in loach embryos under the effect of microwave radiation ...	82

### BIOCHEMISTRY

<i>O. Buchko, L. Stepchenko</i> Free radical processes and antioxidant system in the pigs organism under the humic supplements .....	90
<i>D. Shibkova, N. Efimova, N. Sybirna, A. Akleev</i> Cytological effects in bone marrow cells in experimental animals under chronic low-intensity $\gamma$ -irradiation .....	97
<i>O. Moravska</i> Separate indexes lipid's metabolism in serum blood goose dipend of complete introduction different doses vitamin E in ration in reproductive period .....	105

### BOTANY

<i>O. Fishchuk, A. Odintsova</i> Morphology and vascular anatomy of the flower in <i>Dracaena surculosa</i> Lindl. and <i>Sansevieria aethiopica</i> Thunb. ( <i>Asparagaceae</i> Juss.) .....	113
<i>L. Bunio, O. Hudyk, V. Oliferchuk, O. Tsvilynyuk, O. Terek</i> Mycological characteristic of root area of plants <i>Carex hirta</i> L. in oil-polluted sod-podzolic soil .....	124
<i>L. Borovik</i> Species composition of the plant communities at the early stage of abandoned field succession in the north-east of Lugansk region .....	137

<i>T. Fostyak</i>	
To the history of study on the highlands' vegetation of the Svydovets mountain range .....	147
<i>M. Helesh, A. Prokopiv</i>	
Biomorphological characteristics of <i>Veronica aphylla</i> L. ....	153
<i>V. Nachychko</i>	
The genus <i>Thymus</i> L. ( <i>Labiatae</i> Juss.) in the Ukrainian Carpathians' flora: systematics and taxonomic problems .....	159

#### GENETICS

<i>G. Akinina, V. Popov</i>	
Genetic structure of collection of chickpea varieties by morphological and molecular markers .....	170
<i>O. Lanovenko</i>	
Regional monitoring of congenital malformations in the Kherson region .....	177
<i>O. Tsyplik, Y. Dacyuk, K. Flardh, V. Fedorenko, B. Ostash</i>	
YtrA-like regulatory gene SSFG_05654 affects morphogenesis and antibiotic resistance of <i>Streptomyces ghanaensis</i> ATCC14672 .....	184
<i>I. Bodnar, O. Ilkov, S. Gorbulska, L. Bodnar</i>	
Comparative description of food flavours of different producers in relation to mutagene activity .....	193
<i>O. Blazhenko</i>	
Deletion of MET4 gene decreases tolerance to cadmium ions and their accumulation in yeast cells of <i>Hansenula polymorpha</i> and <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	200
<i>M. Lozynska, R. Lozynskyy</i>	
Prognostic value of aneuploidy and polyploidy in colorectal cancerogenesis .....	206
<i>H. Mutenko, M. Lopatniuk, L. Horbal, A. Luzhetskyy, V. Fedorenko, B. Ostash</i>	
Comparison of activity of three heterologous promoters in <i>Streptomyces ghanaensis</i> ATCC14672 .....	213

#### ECOLOGY

<i>T. Kolombar, O. Pakhomov, A. Zhukov</i>	
The role of pedoturbatsionnaya activity of greater mole rat ( <i>Spalax microphthalmus</i> ) in determining the structure of the soil cover .....	219
<i>V. Savosko</i>	
Content and distribution of organic carbon in cultural biogeocenosis of the tree plantation on steppe an industrial area .....	226

#### ZOOLOGY

<i>A. Stadnychenko, V. Gyrin</i>	
The influence of biotic factors on heart contractions rhythm in lamellibranchia mollusks ( <i>Bivalvia</i> , <i>Unioninae</i> , <i>Anodontinae</i> ) .....	235
<i>V. Stakh, M. Belokon, I. Khamar, Yu. Belokon, O. Reshetylo</i>	
Morphological and genetic polymorphism of green frogs ( <i>Pelophylax</i> ) in water bodies of Western Ukraine .....	241



<i>D. Medovnyk, V. Aleksienko</i> Characteristic of the ichthyofauna of sewer on the river Nyvka .....	250
<i>T. Shevchuk</i> The species composition and distribution of the genus <i>Unionicola</i> (Acari: Hydracarina: Unionicolidae) - parasites of Unionidae (Mollusca: Bivalvia: Unionidae) in river basins of Ukraine .....	255
<i>O. Ivanets</i> The taxonomic structure of cladocercenoses of Ukrainian Roztochya .....	260

#### MICROBIOLOGY

<i>O. Maslovska, S. Hnatysh</i> The intensity of lipid peroxidation and parameters of antioxidative defence system of <i>Desulfuromonas acetoxidans</i> IMV B-7384 under the influence of ferric (III) citrate .....	270
<i>O. Gromyko</i> Antagonistic properties of actinomycetes isolated from the rhizosphere celandine <i>Chelidonium majus</i> L. ....	279

#### PLANT PHYSIOLOGY

<i>S. Jadko</i> Early increasing of H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> content and peroxidase and thioredoxin activities in the tissue culture of <i>Arabidopsis thaliana</i> under osmotic stress of different intensity .....	287
<i>V. Bilchuck, A. Rossikhina-Galycha</i> Changes in the activity of antioxidant enzymes in vegetative organs <i>Populus nigra</i> L. in the matter of environmental contamination .....	293
<i>A. Parfenyuk, O. Sterlikova, I. Beznosko</i> Influence <i>Micrococcus luteus</i> LBK1 on growth of plants varieties / hybrids cucumber and sweet pepper .....	300
<i>V. Fedak, O. Mamchur, J. Rivis</i> Anionic fatty acids in maize grain during its ripening under influence zeastimulin and the level of the soil nutrition .....	305

#### HUMAN AND ANIMAL PHYSIOLOGY

<i>A. Frolov, R. Litvinenko</i> Viability of lower crustaceans under the influence of biologically active substances of biotechnological water from the medicinal leech ( <i>Hirudo verbana</i> ) .....	313
<i>V. Pakholchenko, I. Tubaltceva, E. Tukalenko, M. Makarchuk</i> Behavioral reactions on the stress in rats with different social status .....	320
<i>O. Bondarenko, N. Gula, M. Makarchuk, T. Goridko</i> Effect of N-stearoylethanolamine in different doses on behavior of rats after chronic alcoholization in "open-field" .....	327