

ISSN 0206-5657

**ВІСНИК**  
ЛЬВІВСЬКОГО  
УНІВЕРСИТЕТУ

СЕРІЯ БІОЛОГІЧНА

Випуск 60

2012

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

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

**Issue 60** | **Випуск 60**

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

2012

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).

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 70x100/16.  
Ум. друк. арк. 18,4.  
Тираж 100 прим. Зам.

© Львівський національний університет  
імені Івана Франка, 2012

### Шановні колеги!

П'ятдесят років тому, у 1962 році побачив світ перший випуск збірника наукових праць «Вісник Львівського університету. Серія біологічна». За півстоліття вийшло 60 випусків цього вісника. До складу першої редакційної колегії вісника входили видатні учені, якими по праву гордиться біологічний факультет – професори Г. В. Козій (відповідальний редактор), Г. М. Шавловський (секретар редколегії), С. О. Гребінський, О. Г. Гебгардт, М. П. Деркач, І. В. Шостаковська. Якщо у перших шести випусках публікувалися статті з різних галузей біології, то з 1974 року почали виходити тематичні випуски вісника, такі як «Проблеми раціонального використання ресурсів Волині» (1974 рік), «Нейрогуморальна регуляція клітинних механізмів секреторного процесу» (1975, 1985, 1989 роки, відповідальний редактор проф. І. В. Шостаковська), «Біосинтез каротиноїдів і порфіринів бактеріями» (1977 рік, відповідальний редактор доц. Н. М. Дацюк), «Фізіолого-біохімічна оцінка дії техногенних факторів на рослини» (1997 рік, відповідальний редактор проф. О. І. Терек). Найбільше тематичних випусків вісника було присвячено молекулярним механізмам біологічної дії іонізуючих випромінювань та інших екстремальних факторів довкілля (1979, 1982, 1984, 1988, 1992, 1994), які редагували професори Б. Ф. Сухомлінов і М. М. Великий. У 1991 році побачив світ тематичний випуск вісника «Біотичні ресурси Розточчя і зовнішніх Карпат та їхні антропогенні зміни» (відповідальний редактор проф. Н. С. Ялинська), який було підготовлено спільно з ученими Інституту біології Люблінського університету (Польща). У 1962 – 1999 роках із різних причин не вдавалося налагодити щорічний випуск вісника.

Відродження вісника почалося з 2000 року, коли його відповідальним редактором став проф. С. П. Гудзь, тодішній декан біологічного факультету. Завдяки активній роботі секретаря редколегії к.б.н. О. М. Громика при всебічній підтримці проф. С. П. Гудзя, було налагоджено систематичну роботу редколегії, залучено до рецензування статей велику групу фахівців біологічного факультету ЛНУ й інших установ, створено web-сторінку журналу, на якій почали розмішувати повні тексти статей, надрукованих у віснику. Це сприяло кращій поінформованості наукової громадськості про діяльність журналу, кращому ознайомленню з ним і зростанню його популярності. Якщо за попередні 38 років існування журналу було надруковано 24 випуски, то за період з 2000 по 2012 рік – 36 випусків. Тепер щороку виходить по 3 випуски вісника. Значно зросла і кількість опублікованих статей у кожному з випусків. «Вісник Львівського університету. Серія біологічна» зареєстрований як фахове видання, в якому друкуються результати дисертаційних досліджень. Його включено до списку ISI (Thomson Scientific Master Journal List).

Вісник був задуманий як наукове видання, в якому друкують свої праці насамперед викладачі, співробітники й аспіранти біологічного факультету ЛНУ імені Івана Франка та яке повинно відображати стан і перспективи розвитку наукової роботи на факультеті. Без сумніву, наш вісник цю функцію виконує – у ньому друкуються переважна більшість працівників і аспірантів факультету. Саме в нашому журналі побачили світ перші статті багатьох молодих науковців факультету. На сьогодні «Вісник Львівського університету. Серія біологічна» - загальноукраїнський біологічний журнал, у якому публікують свої наукові праці фахівці багатьох навчальних і наукових установ України та інших країн.

За 50 років існування вісника неодноразово змінювався склад редколегії, працювали різні відповідальні редактори і секретарі, але незмінним залишалося їхнє прагнення забезпечити високий науковий рівень публікацій, якісне рецензування та редагування статей, своєчасний вихід випусків вісника. Цю традицію намагається підтримувати і нинішня редакційна колегія журналу.

Від імені редакційної колегії «Вісника Львівського університету. Серія біологічна» вітаю всіх авторів, рецензентів і читачів журналу з його ювілеєм і сподіваюся на плідну співпрацю у майбутньому на благо розвитку біологічної науки в Україні.

Головний редактор «Вісника Львівського університету.

Серія біологічна», професор

В. О. Федоренко

ОГЛЯДИ

УДК 616.697.008.3-071

**ПРИЧИНИ І ФОРМИ ЧОЛОВІЧОГО НЕПЛІДДЯ ТА МЕТОДИ ДІАГНОСТИКИ  
ЕЯКУЛЯТУ ЯК ОСНОВНОГО ПОКАЗНИКА ЧОЛОВІЧОГО ЗДОРОВ'Я**

**О. Яцків, А. Тарновська**

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

У статті охарактеризовано стани чоловічої репродуктивної системи за наявності певної форми непліддя. Розглянуто причини і форми чоловічого непліддя за дії різних патогенних чинників. Описано взаємозв'язок між причинами виникнення чоловічого непліддя та наслідками, які проявляються зміною якісних і кількісних показників еякуляту й репродуктивної системи в цілому. Представлено послідовність етапів дослідження еякуляту згідно зі стандартним протоколом дослідження.

*Ключові слова:* сперматозоїд, дослідження еякуляту, чоловіче непліддя.

Неплідний шлюб є однією з найважливіших соціальних і медичних проблем. Непліддя – це стан, який супроводжує низку хвороб статевих органів і системних захворювань чоловічого та жіночого організмів. За даними різних літературних джерел, від непліддя у світі потерпає близько 50–100 млн людей [8, 10], тобто одна із 5–7 пар репродуктивного віку є неплідною [68]. У США серед подружніх пар майже 15% є неплідними [15, 51]. В Україні кількість неплідних шлюбів, за даними різних авторів, становить майже 20% [17, 44].

Загалом нездатність сім'ї до зачаття і народження дитини у шлюбі у 45% випадків зумовлена захворюваннями чоловіків, у 35% – жінок і в 15% випадків – імунологічно несумісністю партнерів або іншими причинами [10, 21, 27].

У 30–40% випадків причиною непліддя є порушення статевої функції у чоловіка. Протягом останніх років спостерігається тенденція до зростання питомої ваги чоловічого фактора непліддя [15, 51]. Приблизно 30% (різні автори подають 30–50%) усіх випадків чоловічого непліддя становить так зване ідіопатичне непліддя [23]. У зв'язку з цим питання встановлення факту чоловічого непліддя та виявлення ймовірної його причини є актуальним і важливим.

Протягом останніх десятиліть у всьому світі відзначено зниження фертильності чоловіків за рахунок погіршення якості сперми. Ймовірно, це пояснюється тенденцією до збільшення захворювань чоловічих статевих органів [19, 20]. Окрім цього, спостерігається погіршення кількісних і якісних показників спермограми у практично здорових чоловіків [39, 40]. Середня кількість сперматозоїдів у еякуляті здорового чоловіка за останні 50 років зменшилась удвічі, а середній об'єм еякуляту – на одну третину [2].

Причини, які призводять до зниження кількісних і якісних параметрів сперми, залишаються невідомими. Існують дослідження [23], які дають підстави вважати, що фактори способу життя (стрес, паління, алкоголь, вплив хімічних факторів навколишнього середовища, що мають естрогенну активність, урбанізація тощо) негативно впливають на чоловічу репродуктивну систему, яка виявляється найбільш вразливою та найменш захищеною.

Відомо, що зниження запліднювальної здатності еякуляту може спостерігатися без будь-яких відхилень від нормальних параметрів рутинного сперматологічного обстежен-

ня. Близько 30% випадків [2] дослідження спермограми не дає однозначної відповіді про першопричину зниження фертильності, оскільки зміни даної функції відбуваються на функціональному молекулярно-біологічному або біологічному рівні. Таким чином, для встановлення факту чоловічого непліддя і ймовірної його причини поряд з об'єктивними та іншими видами обстеження пацієнта насамперед необхідне комплексне лабораторне дослідження еякуляту.

Незважаючи на велику базу досліджень, досі не вирішено проблеми зниження чоловічої фертильності, остаточно не встановлені причина та взаємозв'язок зниження кількісних і якісних параметрів еякуляту, зниження плідної здатності еякуляту за відсутності відхилень від нормальних параметрів еякуляту, не було досліджено взаємозв'язку та взаємного впливу цих параметрів один на одного. Актуальними залишаються проблеми захисту репродуктивних систем чоловічого організму від впливу негативних чинників, які зумовлюють зниження чоловічої фертильності, побудова моделей імовірних причин зниження репродуктивної здатності чоловіків. Важливим також є дослідження вікового фактора зниження чоловічої фертильності щодо інших факторів.

Як і при будь-якому методі лабораторного дослідження, важливо дотримуватися принципу стандартизації, завдяки якому є впевненість, що лабораторні дослідження еякуляту одного пацієнта, проведені в різних лабораторіях, можна співставляти. На сьогоднішній день єдиним стандартним протоколом дослідження еякуляту є документ «Руководство ВОЗ по лабораторному дослідженню еякуляту человека и взаимодействия сперматозоидов с цервикальной слизью» (2001) [23].

**Основні можливі фактори чоловічого непліддя.** Чоловіче непліддя є актуальною проблемою і має особливу медичну та соціальну значимість як у нашій країні, так і за її межами. Це пояснюється збільшенням частоти захворювання статевих органів у чоловіків, зростанням аномалій розвитку, зумовлених впливом шкідливих чинників зовнішнього середовища, алергізацією населення, широким і неконтрольованим використанням лікувальних препаратів та іншими факторами. Порушення фертильності призводить до зростання кількості неплідних шлюбів.

Багатокомпонентний склад внутрішніх чоловічих статевих органів перебуває у постійній перебудові у зв'язку з віковими змінами, функціональною активністю та впливом різних чинників. Саме тому важливо враховувати як фізіологічні, так і вікові зміни чоловічої здатності до запліднення [33].

Згідно з даними [53], отриманими при спостереженні чоловіків різних вікових категорій (а саме: 20-ти, 50-ти і 80-ти років), виявлено тенденцію до зниження показників об'єму еякуляту, концентрації та рухливості сперматозоїдів, а також їх морфологічного стану. Протягом кожного наступного року життя чоловіка віком 30-ти років об'єм еякуляту зменшується на 0,03 мл (при цьому об'єм еякуляту у 50-річних чоловіків на 20% менший порівняно з показником об'єму еякуляту 30-річних чоловіків), концентрація сперматозоїдів в 1 мл знижується у 2,5 рази, рухливість знижується на 0,7% (у чоловіка 50-ти років показник рухливості чоловічих сперматозоїдів є на 28% нижчим ніж у чоловіка 30-ти років).

У всьому світі проблемі чоловічого непліддя (ЧН) приділяють значну увагу, що зумовлено медико-соціальними наслідками збільшення кількості неплідних шлюбів, складністю діагностики та лікування. Цікавими є дослідження інфекції як причини чоловічого непліддя, котру дедалі частіше виділяють із групи нез'ясованих причин зниження чоловічої фертильності [42].

На основі літературних даних [16, 35, 47] виділяють три форми непліддя у чоловіків: секреторну, ексекреторну, автоімунну.

**Секреторна форма чоловічого непліддя** є наслідком порушення сперматогенезу при аномаліях розвитку чи захворюваннях яєчок і придатків, порушеннях обміну речовин і ендокринної регуляції, інших ураженнях. Секреторне непліддя обумовлене гіпогонадізмом. Під чоловічим гіпогонадізмом розуміють зниження або відсутність гормонопродуцуючої функції гландулоцитів яєчка або сперматогенної функції сім'яних канальців одночасно зі зниженням інкреторної та екскреторної функції яєчок. Розрізняють *первинний і вторинний гіпогонадізм* [16, 35, 47].

*Первинний гіпогонадізм* вважають патологічним процесом, який зумовлює пошкодження яєчка (крипторхізм), котре супроводжується функціональною недостатністю яєчок. Первинна недостатність обумовлена вродженими або набутими захворюваннями яєчок. Серед захворювань, які викликають секреторну форму непліддя, найбільш частими є запальні процеси та пухлина яєчка, їх травматичні ушкодження й вікова інволюція. *Вторинний гіпогонадізм* виникає при різних патологічних процесах у гіпоталамо-гіпофізарній ділянці (травма, нейроінфекція). Він обумовлений різким зниженням секреції гонадотропних гормонів, які є сильним специфічним стимулятором функції яєчок, тому його називають гіпогонадотропним гіпогонадізмом [16, 35, 47].

**Екскреторна форма непліддя** виникає як наслідок захворювання або порушень розвитку сечовидільного каналу і придаткових статевих залоз, обструкції сім'яносних проток, асперматизму. Причиною даного захворювання можуть бути застійні вогнища у чоловічих репродуктивних органах, у яких тривалий час розвивається патогенна мікрофлора. Це, у свою чергу, викликає явище патоспермії, зумовленої впливом токсинів бактерій і слизу, зміною рН еякуляту в лужний бік, розладами функціонування гіпоталамо-гіпофізарно-гонадної ланки, порушеннями метаболізму тестостерону в простаті, продукції гонадотропінів як основних стимуляторів сперматогенезу у чоловіків, автоімунізацією, змінами ферментного та ізоферментного спектра еякуляту. Бактерії при запаленні придаткових статевих залоз – лише пусковий механізм, далі запальний процес підтримується аутоагресією внаслідок утворення антитіл у тканинах і сперматозоїдах [9].

Екскреторне непліддя обумовлене порушенням виділення сперми. При цій формі непліддя може виникати двобічна непрохідність сім'яносних шляхів, що проявляється аспермією. Наявність нормальної гістологічної картини при аспермії вказує на облітерацію сім'яносних шляхів (екскреторне непліддя). Відсутність сперматогенного епітелію в сім'яних канальцях підтверджує секреторне походження аспермії [39].

**Автоімунне непліддя.** Чоловіча репродуктивна система для виконання своєї функції продовження роду повинна мати відповідну анатомічну будову та особливий стан імунної системи. Чоловічій репродуктивній системі властивий безперервний цикл диференціації (сперматогенезу). До того ж в організмі чоловіка існує постійний пул стовбурових клітин (архісперматогоній), які, подібно до клітин кісткового мозку, здатні самовідновлюватися. Роль імунної системи є особливою як стосовно чоловічої, так і стосовно жіночої статевих систем. Імунні чинники діють у такий спосіб, щоб сформуванню нейтральну реакцію на статеві клітини [56].

Потенційно ризикованою подією для імунної системи молодшої особи є поява диференційованих антигенів на чоловічих статевих клітинах у період дозрівання (11–13 років). Після цього організм постає перед проблемою забезпечення охорони гамет від імунної відповіді з боку власного організму. У цьому процесі беруть участь дві групи чинників – так званий анатомічний бар'єр кров–яєчко, що відділяє систему диференціювання гамет від кровоносної системи з елементами імунної системи, та стан імунологічної толерантності [4].

**Антиспермальні антитіла.** Синтез антиспермальних антитіл (АСА) може бути причиною розвитку автоімунної реакції, що призводить до імунозалежного непліддя. Такий стан формується внаслідок порушення пасивної та активної імунологічної толерантності до сперматозоїдів, яка у фізіологічних умовах підтримує й охороняє сперму від реактивності імунної системи. У осіб чоловічої статі АСА найчастіше виявляються на поверхні сперматозоїдів (зв'язані антитіла), а також у сім'яній рідині та сироватці периферичної крові (вільні антитіла). Вони послаблюють здатність сперматозоїдів до запліднення на різних етапах цього процесу. АСА негативно впливають на виживання та рухливість сперматозоїдів, їхню пенетрацію через шийковий слиз, взаємодію сперматозоїд-яйцеклітина та ранні етапи розвитку зародка. Термін «антиспермальне антитіло» стосується різних класів імуноглобулінів: IgA, IgG, IgM [45, 52].

При обстеженні 1996 чоловіків, що страждають непліддям, встановлено частоту й співвідношення різних форм цієї патології. Хворих розподіляли в такий спосіб: у 623 (31,2%) хворих діагностовано секреторне непліддя, у 507 – секреторно-ендокринне, у 116 – секреторно-токсичне, у 768 хворих – екскреторне непліддя, в тому числі у 655 – екскреторно-токсичне, у 73 – екскреторно-обтураційне, у 465 хворих – сукупне непліддя і у 141 – інші його форми [71].

Таким чином, секреторне непліддя становить 31,2%, а екскреторне – 38,5% усіх випадків непліддя. Якщо врахувати, що при збігу цих двох форм непліддя у 23,3% випадках також були порушення екскреції, то порушення кількості сперматозонів виявиться причиною непліддя у 61,8% спостережень, тобто ці порушення є провідним етіопатогенетичним фактором порушення плідності в чоловіків. До групи «інші, або некласифіковані форми непліддя» віднесені рідкісні та мало вивчені різновиди чоловічої неплідності. Причина непліддя не з'ясована в 14,8% усіх зафіксованих випадків [71].

За даними ВООЗ, частота безплідного шлюбу становить 10–15% від загальної кількості подружніх пар, більш того, щорічно реєструють близько 2 мільйонів нових випадків безпліддя. Наведену класифікацію можна назвати симптоматичною, оскільки в ній проявляється головним чином ступінь зміни еякуляту, але не враховуються етіологічні та патогенетичні особливості цих порушень [13, 49].

Як відомо, основні показники фертильності сперми – загальна концентрація сперматозоїдів у еякуляті і їхня рухливість [22] – перебувають під безпосереднім регуляторним впливом фолікулостимулюючого гормону (ФСГ) і опосередкованим через статеві гормони впливом лютеїнізуючого гормону (ЛГ) [22]. Ці показники значною мірою підлягають впливу різних факторів – як ендогенних, так і екзогенних. Відомо [22] про вплив багатьох факторів на рухливість сперматозоїдів як безпосередньо в самому еякуляті, так і у статевому шляху жінки. Це такі фактори: рН сперми і складу піхви, концентрація фруктози і мінеральних елементів у еякуляті, склад перитонеальної рідини: електролітичний, цитокіновий і клітинний [41].

Відомо [68], що гормони щитоподібної залози впливають на нормальний ріст, статевий розвиток та репродуктивну функцію тварин і людини. У неплідних чоловіків виявлено кореляцію між рівнем гормонів щитоподібної залози та наявністю антитіл до неї, з одного боку, й особливостями спермограми, з іншого боку; зокрема, підвищений рівень антитирозидних антитіл поєднувався зі зниженням рухливості сперматозоїдів [67].

Важливого значення надають з'ясуванню гормональних факторів, які обумовлюють непліддя. Визначають концентрацію ФСГ, ЛГ, тестостерону і пролактину в сироватці крові. Високий вміст ФСГ у сироватці крові, у хворих на азооспермію дає підстави зробити



припущення про можливе ураження яєчок. Низький рівень ФСГ виявляють у хворих із недостатньою функцією гіпофіза чи гіпоталамуса. У частини таких чоловіків знижуються лібідо і потенція без ознак гіпогонадізму [39, 40].

Унаслідок зниження рівня тестостерону зростає вміст гонадотропінів (ФСГ, ЛГ) і естрогенів, що призводить до порушення сперматогенезу, тобто розвитку секреторної форми непліддя. Високий рівень ЛГ і низький – тестостерону виявляють у хворих зі синдромом Клайнфелтера [39, 40].

Результати досліджень [59] показали, що рівень загального тестостерону в плазмі крові пацієнтів із чоловічим непліддям і здорових чоловіків того ж віку однаковий, рівень вільного тестостерону значно нижчий, що може бути причиною гіпосперматогенезу. Вважається, що у чоловіків старшого віку і у пацієнтів із чоловічим непліддям зниження вмісту вільного тестостерону пов'язане з підвищенням рівня глобуліну, що зв'язує статеві гормони (sex hormone binding globulin, SHBG).

У літературі досить широко висвітлено питання про залежність змін у передміхуровій залозі чоловіка від гормонального балансу в її організмі. Структура і функція передміхурової залози перебуває під контролем андрогенів, естрогенів, стероїдних гормонів і гормонів гіпофізу: естрогени сприяють розвиткові сполучної тканини, а андрогени – епітелію [69]. Відомо, що підвищення рівня тестостерону в крові приводить до посилення кровотоку в передміхуровій залозі, а підвищення рівня естрогенів – до різкого зниження [55].

Встановлено [33], що такий важливий показник фертильності сперми, як рівень активно рухомих сперматозоїдів, залежить від дуже багатьох біохімічних параметрів еякуляту. Так, рухливість клітин напряму пов'язана з концентрацією іонів натрію, причому чим вища концентрація цього іона, тим гірша рухливість клітин. Концентрації калію, кальцію і магнію напряму жодним чином не впливають на рухливість сперматозоїдів у нативному препараті. Однак у сукупності з молекулярної середньої маси іони калію та магнію також здатні здійснити вплив на фертильність еякуляту, збільшуючи рухливість сперматозоїдів.

Наступною важливою ланкою патогенезу виникнення чоловічого непліддя при інфекційних ураженнях статевих органів є порушення біохімічних і фізико-хімічних властивостей сперми: підвищення її в'язкості, зниження рівня фруктози, показників фруктолізу. Такі зміни відбуваються у разі інфікування мікроорганізмами [25, 31].

**Вроджені та генетичні причини чоловічого непліддя.** В останнє десятиліття відзначено зростання кількості вроджених патологічних змін яєчок, які в теперішній час становлять 4–5%. Вроджені та хромосомні аномалії розвитку статевих органів призводять до чоловічого непліддя [39].

Незважаючи на інтенсивні дослідження генетичних причин чоловічого непліддя, поступу в їх діагностиці та лікуванні практично немає. Розвиток генітального тракту і вторинних статевих ознак залежить від наявності яєчок чи яєчників і присутності чи відсутності гена SRY в регіоні Y-хромосоми (sex determining region of Y), який визначає стать. Цей ген відповідає за розвиток простати і зовнішніх геніталій чоловіка [61]. Багато чоловічих факторів непліддя мають ідентифіковане генетичне підґрунтя. Генетичні діагностичні методи включають аналіз родоходу і хромосом, оцінку одиничних дефектів генів і вивчення «безладдя» в геномі (кількості копій генів або мутацій, важливих для встановлення діагнозу) [66].

Відомі основні генетичні дефекти, які зумовлюють відсутність у чоловіка сперматозоїдів. У першу чергу це муковісцидоз (cystic fibrosis, CF) і вроджена відсутність прохідності сім'япроводів (congenital absence of the vas deferens, CAVD). Їх відносять до групи

захворювань, викликаних мутаціями CFTR. CF – це в основному ринопульмонологічне захворювання. CF може супроводжуватися гастроінтестинальними порушеннями, обструктивною азооспермією та синдромом втрати солі. Вроджена непрохідність сім'явидних протоків діагностується у чоловіків із азооспермією (відсутністю сперматозоїдів у еякуляті) та повною їх відсутністю (у фіброзних тяжках можна знайти їх рудименти) [63].

**Інфекційно-токсичний фактор.** Частота виникнення чоловічого непліддя після перенесених інфекційних захворювань коливається, за різними даними різних авторів, від 8,5 до 36%. Інфекційне захворювання серед чоловіків зі зниженою запліднюючою властивістю сперми спостерігаються в 70% випадків [35, 39].

У результаті дії хвороботворних збудників утворюються продукти розпаду, які, у свою чергу, впливають на трофіку яєчок. До порушення сперматогенезу можуть призвести зміни складу крові, патогенний вплив на функцію яєчок інфекційного збудника, токсинів, високої температури тіла, які супроводжують гострі інфекційні захворювання. Хоча інфекційні захворювання не є основною причиною виникнення чоловічого безпліддя, але в масштабах країни чи всього світу – це серйозна проблема [54].

Оскільки уrogenітальна інфекція часто «німа», тобто її перебіг безсимптомний, то через відсутність адекватного лікування чоловік може втратити фертильність [65].

Існує декілька теорій впливу хвороб, що передаються статевим шляхом, на чоловічу фертильність. Механізм виникнення чоловічого непліддя при цих хворобах приблизно такий: перш за все, безпосереднього ураження зазнають сперматозоїди внаслідок приєднання до них мікроорганізмів, що веде до зниження їх рухливості, появи патологічних форм, аглютинації. Серед таких мікроорганізмів слід назвати хламідій, особливо *Ureaplasma urealyticum*, які можуть прикріплюватися до будь-якого сегмента сперматозоїдів. У разі фіксації їх до хвоста сперматозоїда знижується рухова активність, до головки в ділянці акросомальної шапочки – руйнується її мембрана.

Інфікування сперми може мати сперматоцидну дію. Такі збудники, як гонокок, мікобактерії туберкульозу і лепри, хламідії, віруси, стрептококи групи В, кишкова паличка мають сперматоцидну дію [30, 31, 37].

Зв'язок мікроорганізмів зі сперматозоїдами пояснює знижену їх рухливість і некроспермію. Морфологічні зміни придатка яєчка призводять до зниження дозрівання сперматозоїдів. Пошкодження клітин Лейдіга можна помітити лише під час електронної мікроскопії.

Роль мікроорганізмів у виникненні непліддя не викликає сумнівів. Так, N. Kjaegaard [60] і співавтори (1997) під час обстеження у клініці безпліддя 201 пацієнта у 182 із них виявили 552 види мікроорганізмів: у 11,8% – *Ureaplasma urealyticum*, у 9,6% – *Gardnerella vaginalis*, у 2,8% – етеробактерії, в 1,6% – *Chlamydia trachomatis*, у 0,9% – *Mycoplasma hominis*.

На важливість обстеження пацієнтів із чоловічим непліддям, спрямованого на виявлення хламідій і мікоплазм та зв'язку між цими інфекціями і чоловічим непліддям, вказують ряд авторів [57, 58].

**Запальні процеси.** Саме вони є основною причиною порушення сперматогенезу – процесу вироблення сперми. Унаслідок різних запалень (простатиту, уретриту й інших) значно знижується рухливість сперматозоїдів, знижується якість сперми. А це неминуче, якщо не відразу призводить до непліддя, то вже гарантує низьку ймовірність зачати дитину [5, 24, 39]. У 40–60% хворих, які перенесли гостре запалення статевих органів, порушується їхня функція, настає атрофія сперматогенного епітелію і непліддя [1, 26, 48].

При запальних захворюваннях сечовивідного каналу і придаткових статевих залоз нерідко відзначають порушення їхньої функції, зміну складу сперми, накопичення в ній продуктів розпаду і життєдіяльності мікробів, розвиток токсичних, імунних процесів, які знижують запліднюючу здатність сперматозоїдів і призводять до непліддя [39].

**Екзогенні інтоксикації.** Проблема екзогенних інтоксикацій стала особливо актуальною в останні роки, коли в цивілізованих країнах склалась «екологічно несприятлива ситуація»: накопичення в навколишньому середовищі великої кількості хімічних речовин, використовуваних для побутових, медичних та інших цілей.

Велика кількість різних хімічних речовин і продуктів біологічного синтезу в середовищі існування людини зумовлена високими темпами науково-технічного прогресу. Кожного року до 2 млн уже відомих хімічних речовин додається 250 тис. нових, із яких близько 500 використовуються на практиці у вигляді лікувальних препаратів, харчових добавок, пестицидів, промислових сполук. Частина з них можуть індукувати мутації [39].

Багато наукових робіт присвячено вивченню впливу глибокої гіпотермії на гемомікроциркуляторне русло та паренхіму внутрішніх статевих органів [13]. На висоті охолодження відбувається спазм артерій яєчок зі збільшенням товщини їх стінки. Порушення кровоплину в яєчках викликає морфологічні зміни структурних компонентів гематотестикулярного бар'єру. Зростає ступінь пошкодження сім'яних звивистих каналців, кількість клітин сперматогенного епітелію на VII стадії циклу сперматогенного епітелію зменшується [14, 18].

Перегрівання тіла також викликає порушення сперматогенезу, що перебігає нормально при температурі на 2–3°C нижчій від температури тіла, зокрема, надлишкове тепло ушкоджує молоді зародкові клітини у процесі поділу, а при тривалому впливі призводить до дегенерації паренхіми яєчка. При цих захворюваннях на яєчко впливають і інші шкідливі фактори, зокрема гіпоксія, порушення кровообігу, надлишковий механічний тиск, а можливо, і ураження гематотестикулярного бар'єра, що забезпечує імунологічний захист від аутоантигенів у звичайних фізіологічних умовах. У цих випадках не тільки настає дегенерація зародкових клітин яєчка, але і з'являються гормональні порушення [40].

Дослідження впливу гербіцидів на структуру яєчок щурів показали, що при дії коротрану і хлору та магнію має місце відставання в розвитку структурних елементів яєчок та сповільнення процесу сперматогенезу. У проміжках між звивистими сім'яними каналцями спостерігаються лише поодинокі клітини Лейдіга [38].

Існує багато досліджень про вплив електромагнітного випромінювання на репродуктивну систему чоловіків і щурів [36]. При опроміненні тварин змінним електромагнітним полем напруженістю 200 Е [46] з ранніх строків спостереження виникають гемодинамічні розлади із залученням мікроциркуляторного русла, а також порушення цитоархітектоники сперматогенних клітин. Максимум уражень припадає на сперматозоїди, менше це стосується сперматогоній. При довготривалому опроміненні, незалежно від діапазону, виникають глибокі морфологічні зміни. При цьому змінюються кількісні та якісні показники сперматогенезу (кількість сперматозоїдів, їхня рухливість і осмотична резистентність). Сперматозоїди зазнають різних стадій набряку головок аж до утворення булавоподібних фігур. Збільшення інтенсивності ВЧ-випромінювання посилює пригнічення всіх показників спермограм [28]. Зміни у звивистих сім'яних каналцях найбільш виражені в ранні строки з початку дії, згодом структура каналців відновлюється. Хвилеподібно змінюється кількість тестостерону в плазмі крові (підвищення уже в перші години після початку дії, яке змінювалося зниженням на другу добу і нормалізацією показників до кінця тижня) [43].

*Первинні інтоксикації.* У практичному сенсі негативний вплив має зловживання алкоголем і нікотином. У чоловіків, які вживають алкоголь, визначаються виражені зміни еякуляту, які зводяться до збільшення нерухомих і патологічних форм сперматозоїдів [39].

Результати вивчення впливу алкоголю показали, що прийнятий людиною всередину етиловий спирт уже через 20 хв виділяється передміхуровою залозою [6]. Є відомості і про морфологічні зміни в передміхуровій залозі шурів. Так, за впливу алкоголю відбувається розширення кровоносних судин, які спричиняють сповільнення течії крові, набряк. Порушується проникність стінок дрібних судин, у подальшому розвивається склероз. Поряд із цим, виявляються атрофічні та деструктивні зміни структур передміхурової залози: нагромадження жирових крапель, розрив мікроворсин, ядра епітеліальних клітин з глибокими складками, розширення цистерн гранулярної ендоплазматичної сітки [62]. Яєчка за впливу алкоголю зменшуються в розмірах; на мікроскопічному рівні спостерігається фіброз стромы та мембран звивистих сім'яних каналців [34]. При хронічній алкоголізації у 60% сім'яних каналців відбувається прогресуюче зрушення сперматогенного епітелію до повного їх спустошення та зменшення діаметра. Підрахунок кількості статевих клітин показав, що більш чутливими до пошкоджувальної дії алкоголю є ті клітини, які пройшли довший шлях у своєму розвитку: зменшується кількість сперматид і сперматоцитів на стадії пахінеми та незворотно знижується кількість сперматоцитів на стадії прелептонемі [32].

Зловживання курінням також призводить до дегенеративних змін зародкового епітелію яєчок. Судинозвужувальна дія нікотину веде до погіршення живлення чутливої паренхіми яєчок. На порушення здатності до запліднення може впливати властивість нікотину знижувати тонус мускулатури сім'яних шляхів і придаткових статевих залоз [39]. Цікаво, що серед курців порушення плідності спостерігалось у 60,3% випадків (у осіб, які не курять, – лише у 19,7%), у чоловіків, які зловживають алкоголем, – у 46,3%.

Діагностика чоловічого непліддя включає в себе клінічні методи дослідження та методи лабораторно-інструментального обстеження. Серед останніх найбільш важливим для з'ясування функціонального стану статевих залоз і запліднювальної здатності сперми є дослідження еякуляту.

**Дослідження еякуляту.** Вирішальне значення для діагностики функціональних порушень статевих залоз і судження про плодовитість чоловіків мають макроскопічні, мікроскопічні, біохімічні й імунологічні дослідження еякуляту. Найчастіше еякулят отримують шляхом мастурбації, рідше перерваним статевим актом [23].

Рекомендовано дослідити еякулят після 4–5-денного утримання. Еякулят має бути отриманий повністю, оскільки різні його порції містять неоднакову кількість сперматозоїдів. При підвищенні температури життєдіяльність сперматозоїдів посилюється і невеликий вміст власної енергії швидко виснажується. Поступове охолодження еякуляту уповільнює метаболізм у сперматозоїдах, різке – може викликати холодний шок. Шок паралізує дихання, веде до сповільнення фруктолізу, і сперматозоїди стають нерухомими. В такому разі нагрівання або добавлення теплого 5% розчину глюкози може відновити їхню рухливість. При сумнівних результатах необхідно проводити повторне дослідження еякуляту [39].

**Визначення фізико-хімічних показників еякуляту.** У нормі еякулят має бути гомогенним, сіруватого, білуватого або жовтуватого відтінку, залежно від кольору того зі секретів статевих залоз, котрий переважає. Якщо в еякуляті є еритроцити, він набуває червонувато-коричневого забарвлення (гематоспермія), що вказує на патологічний процес у передміхуровій залозі та сім'яних міхурцях. Жовтувато-зеленуватого відтінку сперма набуває у разі наявності в ній досить значної кількості лейкоцитів [23]. При великій кількості

сперматозоїдів колір еякуляту молочний, при малій кількості – прозоро-голубуватий. При азооспермії еякулят, як правило, буває прозорим [39].

Кількість еякуляту в нормі перебуває в межах 2–5 мл, але трапляються значні коливання. Об'єм еякуляту менш ніж 1 мл характерний для андрогенної недостатності. В такому випадку можна також подумати про звуження та деформації сім'яних міхурців і сім'яносних шляхів. Середня кількість еякуляту у здорових чоловіків має бути, за даними дослідників, 3,7 мл. Надмірна кількість еякуляту (більш 7–8 мл) загалом супроводжується зменшенням концентрації сперматозоїдів [39].

Сперма, одержана під час еякуляції, густа і в'язка, що обумовлено згортанням секрету сім'яних міхурців. Під впливом ферментів передміхурової залози (гіалуронідази, фібринолізину і фіброкінази), активованих лимонною кислотою, через 15–60 хв настає повне розрідження еякуляту. Якщо еякулят залишається в'язким протягом більш значного терміну, ніж година, або зовсім не розріджується, то це вважають патологією, пов'язаною, перш за все, з порушенням функції передміхурової залози. В'язка консистенція сперми сприяє порушенню рухливості сперматозоїдів, які або не рухаються, або швидко втрачають рухливість. Наявність у еякуляті волокон слизу може заважати розрідженню. Слиз свідчить про наявність запалення однієї із залоз, секрет яких входить до складу еякуляту. Повільне перемішування еякуляту під час розрідження зменшує ризик похибки оцінки кількості сперматозоїдів [23].

Відразу після еякуляції починається процес згортання, а потім протягом 10–30 хв відбувається процес розрідження. Щоб не помилитись у визначенні кількості й оцінки рухливості сперматозоїдів, слід дочекатися повного розрідження еякуляту. Визначення в'язкості має велике значення при зменшенні рухливості сперматозоїдів. Вважають, що підвищення в'язкості еякуляту і наявність у ньому слизу знижують швидкість сперматозоїдів. Ступінь в'язкості визначають довжиною нитки, яка утворюється між поверхнею еякуляту і скляною паличкою. Нормальною вважається в'язкість довжиною 0,1–0,5 см. При запальних захворюваннях передміхурової залози і сім'яних шляхів кількість слизу та в'язкість еякуляту можуть зрости. Це сприяє зменшенню рухомості сперматозоїдів і таким чином знижує запліднювальну здатність сперми [39]. Протягом останніх років виявлено зв'язок збільшеної в'язкості розрідженого еякуляту з інфекцією додаткових статевих залоз уrogenітального тракту [23].

*Реакція (рН).* Реакція еякуляту слабо лужна або лужна і коливається в діапазоні 7,2–8,0. Вимірюють протягом години після еякуляції. Краплю еякуляту рівномірно наносять на індикаторну паперову смужку в межах рН від 6,1 до 10,0 або від 6,4 до 8,0. Через 30 с поверхня смужки рівномірно зафарбовується. Порівнюють зафарбовану смужку з калібровочними стандартами. Якщо рН нижче 7, це свідчить про відсутність лужного компонента сперми. Можна припустити закупорку вивідних протоків сім'яних міхурців, а за наявності аспермії – обструкцію або вроджену відсутність сім'яних протоків. Запліднювальна властивість такої сперми знижена. У кислому середовищі сперматозоїди втрачають рухливість і гинуть. Різко лужна реакція сперми (рН 9,0–10,0) може свідчити про патологію передміхурової залози та ненадходження її секрету до складу еякуляту [23].

Стабільність рН важлива тому, що сперматозоїди тільки у слаболужному середовищі здатні рухатися. Рухливість останніх уповільнюється, або зовсім зупиняється при зсуві рН у кислому напрямку. Цим можна пояснити, що сперматозоїди в жіночих статевих шляхах залишаються життєздатними недовго, поки буферний компонент спермальної плазми повністю не зв'яжеться з кислим вагінальним компонентом [23].

*Ліпоїдні та амілоїдні тільця.* Із передміхурової залози разом з простатичним соком у сперму потрапляють ліпоїні, амілоїдні тільця та спермін, з якого можуть утворюватися кристали Бетхера. Ліпоїдні тільця – це маленькі блискучі зернята, які містяться в спермі у великій кількості. При простатиті їхня кількість зменшується, а при тривалому запаленні ліпоїдні тільця зі сперми зникають [23].

**Нормативні показники рухливості сперматозоїдів у еякуляті.** При оцінці якості еякуляту рухливості сперматозоїдів надається дуже великого значення. Ймовірність запліднення знижується зі зменшенням кількості добре рухомих сперматозоїдів у еякуляті. Наявність слизу знижує рухливість сперматозоїдів. Велике значення для рухливості сперматозоїдів має характерний для них негативний електричний заряд, завдяки чому не відбувається зіткнення і злипання сперматозоїдів у густому еякуляті. Зсув рН у кислий бік знижує електричний заряд сперматозоїдів і викликає їхню аглютинацію. Аглютинація може бути також ознакою автоімунних реакцій в організмі хворого [39].

Рухливість кожного сперматозоїда класифікують за категоріями “a”, “b”, “c” і “d”, для цього використовують такі критерії:

«a» – швидкі поступальні рухи (25 мкм/с при температурі +37°C і 20 мкм/с при +20°C, 25 мкм приблизно відповідає довжині 5 головок, або половині довжини хвоста нормального сперматозоїда);

«b» – повільні, в’ялі поступальні рухи;

«c» – непоступальні рухи (коливальні, маятникоподібні), швидкість не більше 5 мкм/с;

«d» – нерухливі сперматозоїди.

Прогресивний поступальний рух зі спіральним обертанням навколо своєї осі характеризує нормальні здорові сперматозоїди. Багато авторів вважають, що при нормозооспермії має бути 75–80% рухомих форм. Припустимими є не більш як 30% нерухомих форм.

У нормі рухливість 70–80% сперматозоїдів має відповідати оцінкам 3–4. Чим триваліше життя сперматозоїдів (у нормі 18–20 год), тим вища їхня здатність до запліднення. Для встановлення тривалості руху сперматозоїдів та індексу їх виживання визначають кількість рухомих сперматозоїдів через 3 години, 6 годин і більше. У здорових чоловіків із нормальним сперматогенезом у середньому кількість рухомих сперматозоїдів зменшується через 3 год на 7%, через 6 год – на 15%, а через 24 год – лише 10% сперматозоїдів продовжують рухатися у кожного другого чоловіка. Чим глибше пошкодження сперматогенезу, тим менша тривалість руху сперматозоїдів [39].

Рухливість сперматозоїдів залежить від пори року та доби. Відомо, що навесні відбувається зниження рухливості сперматозоїдів (сезонні коливання). При спостереженні за кількістю активно рухомих сперматозоїдів протягом доби було відзначено збільшення їхньої кількості у другій половині дня (добові ритми) [23].

Для визначення рухливості сперматозоїдів у нормі проводять ретроспективні дослідження значних груп фертильних чоловіків різних районів світу. За останні десятиліття цей показник значно змінився. У 1970–1980 рр. нормальний показник сперматозоїдів із прямолінійно-поступальним рухом становив 60–70%, а у 2001 р. він знизився до 30%. За даними ВООЗ, кількість прогресивно-рухомих сперматозоїдів має бути не меншою, ніж 50%. Слід відзначити, що нормативні показники не визначають межі норми, оскільки чоловіки з нижчими показниками також можуть бути фертильними [23].

У кожній географічній зоні можуть бути свої нормативні показники спермограми, які були вибрані на основі перевірки репрезентативної групи фертильних пацієнтів. На-

приклад, у Москві за період 1996–2001 рр. кількість рухливих сперматозоїдів у еякуляті фертильних пацієнтів у середньому становила 40% [2].

Астенозооспермія – це термін, який відображає зниження рухливості сперматозоїдів. Це трапляється, коли сперматозоїдів із рухливістю  $(a+b) < 40\%$ . Якщо  $30\% < (a+b) < 40\%$  – це слабо виражена астенозооспермія.

Зниження рухливості сперматозоїдів (астенозооспермія) спостерігається приблизно у половини пацієнтів із порушенням фертильності [49]. Астенозооспермія може бути викликана дією різних факторів: ендогенних, генетично обумовлених аномалій сперматозоїдів і екзогенних факторів зовнішнього середовища, до якого можна віднести екологічні та інфекційні фактори. Класичні роботи скандинавських дослідників середини 70-х років ХХ ст. [50, 64], які виявили та дослідили взаємозв'язок абсолютної астенозооспермії з вродженою аномалією будови аксонем джугутика, поклали початок використанню методів електронно-мікроскопічного аналізу для діагностики чоловічої суб- та інфертильності. Ультроструктурні дослідження, проведені разом із медико-генетичним консультуванням, дають змогу диференціювати генетично обумовлені та перехідні, викликані дією екзогенних факторів аномалії морфології сперматозоїдів [3, 70].

**Нормативні показники кількості сперматозоїдів у 1 мл еякуляту.** У 1891 р. протягом 80 років нормативним вважався показник 80 млн сперматозоїдів у 1 мл сперми, потім 60 млн/мл (MacLeod, 1951). У 1982 р. міжнародний андрологічний клуб прийняв концентрацію 40 млн/мл (Schirren, 1982) як нормативну.

Відповідно до інструкцій ВООЗ (WHO, 1992) і до теперішнього часу, концентрація 20 млн/мл є нормативною. У здорового чоловіка в 1 мл еякуляту міститься більше 20 млн сперматозоїдів. Загальна кількість сперматозоїдів у еякуляті більше 40 млн. Критичним для зачаття вважається рівень сперматозоїдів 10 млн/мл [23].

Прийнято позначати концентрацію сперматозоїдів між 10 та 20 млн/мл як олігозооспермію 1-го ступеня, концентрацію, меншу ніж 10 млн/мл, як олігозооспермію 2-го ступеня. Повна відсутність сперматозоїдів після центрифугування – азооспермія, відсутність сперматозоїдів і клітин сперматогенезу – аспермія.

Важливо розрізнити азооспермію та олігозооспермію, що виникла в результаті порушення транспорту сперматозоїдів (обструкція сім'явидних шляхів, що розвивається при хронічних запальних процесах верхніх відділів сечостатевого тракту, викликаних гонококами, хламідіями тощо), або порушення самого процесу сперматогенезу [23].

На даний час відзначено зниження концентрації сперматозоїдів у чоловіків усього світу. Дослідження сперми фертильних донорів у 60 незалежних центрах виявили зниження концентрації сперматозоїдів з 1939 по 1990 рр. від 113 до 66 млн/мл. За свідченнями Паризького банку сперми, в середньому концентрація сперматозоїдів падає на 2,6% на рік. Цей показник залежить від впливу екзогенних факторів (екологічний стан, ступінь урбанізації тощо) [23].

Полізооспермія характеризується наявністю в 1 мл еякуляту більш ніж 200 млн. Підвищена сперматогенна активність сім'яних каналців яєчок призводить до появи сперматозоїдів із низькою запліднювальною властивістю.

Некроспермія – стан, при якому в еякуляті виявляються лише мертві сперматозоїди і вони не можуть бути оживлені. За повної відсутності в еякуляті сперматозоїдів виділяють два стани: 1) азооспермія, при якій в еякуляті відсутні сперматозоїди, але виявляють клітини сперматогенезу; 2) аспермія, при якій в еякуляті відсутні і сперматозоїди, і клітини сперматогенезу.

Азооспермія характерна для секреторної форми безпліддя, при якій спостерігається пригнічення сперматогенезу на різних стадіях. Це підтверджується наявністю в еякуляті тих чи інших клітин сперматогенезу.

Аспермія характерна для екскреторної форми безпліддя і пов'язана з двобічною облітерацією сім'явидних проток при нормальній генеративній функції яєчок. Однак аспермія може вказувати і на повну відсутність сперматогенного епітелію. Для встановлення істинної причини патоспермії в таких випадках показана біопсія яєчка [39].

**Морфологічні форми сперматозоїдів у нормі та патології.** Сперматозоїди мають виражену гетерогенність і відрізняються за розмірами, будовою головки, шийки і джгутика.

Нормальні зрілі сперматозоїди людини мають овальну головку з добре помітною акросомою, шийку і хвіст. Акросома (ядерна шапочка) – це просвітлення у верхній частині головки, що займає в нормі 40–70% її площі, це добре видно в нативному і забарвленому азур-еозином стані. Іноді головка сперматозоїда може бути дещо загострена в постакрсомальній зоні. Біля головки визначається рудиментна плазматична мембрана, яка добре помітна при електронній мікроскопії [23].

Довжина головки нормального сперматозоїда становить 4,0–5,5 мкм, ширина 2,5–3,5 мкм. Шийка, середня частина сперматозоїда, має бути тонкою, менше 1 мкм завширшки, становити 1,5 довжин головки сперматозоїда і прикріплятися до головки уздовж її осі. Розміри крапель цитоплазми (залишки цитоплазми сперматиди), якщо вони є, не повинні перевищувати 1/3 головки сперматозоїда [23].

Сперматозоїди, у яких головка поміщена в краплю цитоплазми, і ті, у яких крапля цитоплазми розташована на шийці у вигляді шарфа (комірець пажа) та становить більше 1/3 розміру головки, виділяються як незрілі, або юні. У нормальній спермограмі вони налічують близько 1%.

Збільшення вмісту незрілих сперматозоїдів вказує на можливі проблеми сперматогенезу, але це може бути пов'язано з частими статевими актами.

Хвіст сперматозоїда має бути прямим, однієї товщини по всій довжині та дещо звуженим у середній частині, не закрученим і бути завдовжки близько 45 мкм. Відношення довжини головки до довжини хвоста у нормальних сперматозоїдів 1:9 або 1:10 [23].

Морфологія сперматозоїда – один із ключових факторів при прогнозі фертильності. Поряд із концентрацією та рухливістю сперматозоїдів, морфологічний «портрет» являє собою один із основних параметрів, котрі характеризують репродуктивну здатність сперми. Тератозооспермія, зазвичай, поєднується з олігозооспермією і астенозооспермією.

Оскільки сперматозоїди – це високоспеціалізовані клітини, функціонування яких тісно пов'язане зі структурою компонентів головки, шийки та джгутика, ведеться пошук морфологічних маркерів функціональних порушень сперматозоїдів. На сьогодні можна при рутинному мікроскопічному дослідженні сперматозоїдів виявляти параметри, пов'язані з функціонуванням клітин. Так, наявність цитоплазматичної краплі на шийці або головці сперматозоїдів корелює з біохімічними маркерами «незрілості» клітин [23].

Збільшення відсотка двоголових і дводжгутикових форм може бути пов'язане з вірусним інфікуванням сперматозоїдів [3].

На сьогодні велике зацікавлення викликає кореляція специфічних морфологічних атипій сперматозоїдів із хромосомними аномаліями. Доведено, що подовжені головки, макроголовки і множинні хвости виявляють у чоловіків, у яких статистично достовірно підвищена кількість поліплоїдних і анеуплоїдних сперматозоїдів. Мікрodelеції локуса азооспермії (AZF – локуса) довгого плеча Y-хромосоми визначають широкий спектр аномалій.



Ця патологія може викликати повну відсутність статевих клітин (синдром «тільки клітини Сертолі») або атипію їхньої структури.

**Нормативні значення морфологічних форм сперматозоїдів.** Кількість нормальних форм сперматозоїдів у еякуляті, що приймається за референтне значення, в різних літературних джерелах істотно відрізняється і коливається від 30 до 80%. Багато авторів вважають, що морфологічно нормальних форм повинно бути не менше 70% від загальної кількості сперматозоїдів. Згідно з інструкцією ВООЗ по семіологічних дослідженнях, в еякуляті фертильних чоловіків має бути не менше 30% морфологічно нормальних сперматозоїдів. Тератозооспермія – збільшення кількості патологічних форм сперматозоїдів вище за референтні значення. Виражена тератозооспермія різко знижує шанси запліднення і збільшує вірогідність вад розвитку у плода, якщо запліднення відбулося [23].

При нормозооспермії, за даними клініки, трапляються від 5 до 24% (в середньому 9%) морфологічно змінених форм. Клітин сперматогенезу в нормі повинно бути не більше ніж 10%. При патологічних станах вони зовсім відсутні або їхня кількість різко зростає.

Враховуючи тенденцію до зниження репродуктивної здатності чоловіків, важливим і актуальним є з'ясування першопричини захворювання та взаємозв'язку між факторами, що викликають непліддя у чоловіків. Досліджуючи біохімічні та біофізичні показники чоловічого еякуляту, ми спробували встановити взаємозалежність різних показників спермограми, їхній взаємозв'язок і взаємний вплив при побудові моделі чоловічого репродуктивного стану залежно від цих показників [23].

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Быков В. Л.* Сперматогенез у мужчин в конце XX века // Проблемы репродукции. 2000. № 1. С. 13.
2. *Брагина Е. Е., Абдумаликов Р. А.* Руководство по сперматологии. М.: СОРЕК Полиграфия, 2002. 108 с.
3. *Брагина Е. Е., Абдумаликов Р. А., Курило Л. Ф.* Электронномикроскопическое изучение сперматозоидов и его роль в диагностике мужского бесплодия // Проблемы репродукции. 2000. Т. 6. № 6. С. 62–71.
4. *Божемодов В. А., Лоран О. Б., Николаева М. А.* Влияние антиспермальных антител на мужскую репродуктивную функцию // Андрология и генитальная хирургия. 2000. № 2. С. 25–33.
5. *Возіанов О. Ф., Горпинченко І. І.* Сексологія і андрологія. К.: Здоров'я, 1996. 880 с.
6. *Гатин Р. М., Ільясова З. Х., Яшакова Э. Я.* Состояние микроциркуляторного русла предстательной железы при алкогольной интоксикации // Система микроциркуляторного русла и гемокоагуляции в экстремальных условиях: тез. докл. II Всесоюзн. конф. Фрунзе, 1990. С. 80–81.
7. *Гаврилюк А. М., Чоп'як В. В., Наконечний А. Й.* Імунозалежні причини чоловічого непліддя // Здоровье Украины. 2010. № 4/2. С. 6–14.
8. *Герасимов А. М., Полумисков Д. М.* Зависимость подвижности сперматозоидов от биохимических показателей эякулята // Проблемы репродукции. 2003. Т. 9. № 4. С. 79–81.
9. *Горпинченко И. И., Гурженко Ю. Н., Клименко П. М.* Практический опыт комплексного лечения больных экскреторно-токсическим бесплодием // Новости медицины и фармации в мире. 2010. № 18 (341). С. 10–12.
10. *Горпинченко И. И.* Мужское бесплодие: метод. пособие / Укр. ин-т сексологии и андрологии, Киев. мед. акад. последипл. обучения им. П.Л. Шупика. К., 2005. 82 с.

11. Горпинченко І. І., Костєв Ф. І., Нуріманов К. Р. Чоловіча неплідність. Патогенетичне обґрунтування лікування: метод. рекомендації Ін-ту урології АМН України, Укр. центр наук мед. інформації та патент.-ліценз. роботи. К., 2006. 16 с.
12. Горпинченко І. І. Роль хронического простатита в етиологии мужского бесплодия // Журн. практического врача. 1998. № 2. С. 13–16.
13. Гречин А. Б., Дутчак У. М., Попадинец О. Г. Изменения кровеносного русла семенников крыс в разные периоды после воздействия на них холодового фактора // Науки о человеке: сб. статей молодых ученых и специалистов. Томск: СГМУ, 2002. С. 163–164.
14. Гречин А. Б. Ультроструктурні зміни елементів паренхіми сім'яників щурів в ранні терміни після дії загальної глибокої гіпотермії // Вісн. Вінниц. мед. ун-ту. 2002. Т. 6. № 2. С. 395–396.
15. Гринчук В. О. Чоловічий фактор у безплідному шлюбі // Здоров'я чоловіка: науч.-практ. журн. ассоциации сексологов и андрологов Украины. 2007. № 2. С. 183.
16. Грищенко В. І. Научные основы регулирования рождаемости. К.: Здоров'я, 1983. 207 с.
17. Дахно Ф. В. Біотехнологія запліднення *in vitro*. К.: Лібра, 1997. 224 с.
18. Дунаєвська А. В. Вплив високих швидкостей охолодження на морфофункціональні властивості сперміїв людини при нормо- та олігоастеноспермії: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 03.00.19. Харків, 2001. 19 с.
19. Имшинецкая Л. П. Возможности и перспективы консервативного лечения мужского бесплодия // Сексология и андрология. 1998. № 4. С. 7–12.
20. Имшинецька Ю. М., Горпинченко І. І., Гурженко Л. П. Оптимізація лікування хворих інтерорецептивно-психогенною статевою дисфункцією під впливом біоінформаційної терапії // Урологія. Дніпропетровськ, 1998. Т. 2. № 2. С. 57–62.
21. Іванюта Л. І., Іванюта С. О. Неплідність у шлюбі. Здобутки та перспективи. К.: Нова медицина, 2005. № 2. С. 22–25.
22. Йен С. С. К., Джаффе Р. Б. Репродуктивная эндокринология: В 2 т. / пер. с англ. М.: Медицина, 1998. Т. 1. 704 с. Т. 2. 432 с.
23. Луньова Г. Г., Ліпкан Г. М., Заведецька О. Г. Дослідження еякуляту у діагностиці чоловічого непліддя: навч. посіб. К.: Нац. мед. академія післядипл. освіти ім. П. Л. Шупика, 2010. 118 с.
24. Люлько А. В., Кадиров Т. Воспалительные заболевания мочеполовых органов. Душанбе: Урфон, 1990. 224 с.
25. Мавров И. И. Половые болезни: энцикл. справочник. К.; М., 1994. 480 с.
26. Малишкін І. Н. Інтеграція дренажної і гермінативної систем яєчка в патогенезі поєднаного безпліддя (клініко-експериментальне дослідження): дис. ... д-ра мед. наук: 14.01.06. Дніпропетровськ, 1995. 340 с.
27. Михалевич С. І., Михалевич К. І., Андреева Н. Л. Мужское бесплодие // Здравоохранение. 2004. № 8. С. 29–30.
28. Моисеенко Н. Н. Изменения семенников крыс под влиянием СВЧ-излучения в импульсном режиме: автореф. дис. ... канд. мед. наук. К., 1991. 24 с.
29. Нишлаг Э., Бере Г. М. Андрология. Мужское здоровье и дисфункция репродуктивной системы. М.: ООО "Мед. информ. агенство", 2005. 554 с.
30. Овчинников Н. М., Беднова В. Н., Делекторский В. В. Лабораторная диагностика заболеваний, передающихся половым путем. М.: Медицина, 1987. С. 255–267.
31. Ориэл Дж. Д., Риджуэй Дж. Л. Хламидиоз / пер. с англ. М.: Медицина, 1984. 192 с.
32. Пастух М. Б. Морфологічні зміни в сім'яниках білих щурів при інтоксикації етанолом та відновні процеси в них при корекції кровопостачання: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.03.01. К., 1996. 23 с.

33. Пастухова В. А. Морфофункціональний стан внутрішніх органів під впливом дії різноманітних факторів // Укр. мед. альманах. 2008. Т. 11. № 6. С. 210–213.
34. Пауков В. С., Ерохин Ю. А. Железы внутренней секреции при пьянстве и алкоголизме // Архив патологии. 2001. № 3. С. 21–26.
35. Порудоминский И. М. Половые расстройства у мужчин: Этиология, клиника и лечение. 3-е изд., перераб. и доп. М.: Медицина, 1968. 455 с.
36. Сидоренко Г. И., Ваикова В. В., Можяев В. А. Влияние электромагнитных полей на здоровье: обзор // Гигиена и санитария. 1999. № 2. С. 59–62.
37. Скрипкин Ю. К. Кожные и венерические болезни: Руководство для врачей. М.: Медицина, 1996. Т. 4. 352 с.
38. Тешаев Ш. Ж. Реактивные изменения семенников крыс при воздействии которана и хлората магния // Морфология: науч.-теор. мед. журн. 2004. Т. 133. № 2. С. 133.
39. Тиктинський О. Л., Михайличенко В. В. Андрологія. Л.: Медицина, 1999. 464 с.
40. Тиктинский О. Л., Тиктинский В. В., Михайличенко С. С. Руководство по андрологии: науч. изд. / под ред. О. Л. Тиктинского. Л.: Медицина, 1990. 414 с.
41. Фелига Ф., Бакстера Дж. Д., Бродуса А. Е. Эндокринология и метаболизм: в 2 т пер. с англ. М.: Медицина, 1985. Т. 1. 520 с. Т. 2. 416 с.
42. Фрайт О. В., Зайченко О. І. Хвороби, що передаються статевим шляхом, та чоловіче безпліддя // Укр. мед. часопис. 1999. №3(11). С. 97–100.
43. Хлынин С. М. Влияние переменного магнитного поля на некоторые метаболические процессы в семенниках: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Челябинск, 1977. 22 с.
44. Чайка В. К., Чернышева Л. Е. Экстракорпоральное оплодотворение и бесплодие иммунологического генеза // Укр. мед. альманах. 2001. Т. 4. № 4. С. 223–226.
45. Шиш Н. В., Бобырев И. Н., Почерняева В. Ф. Влияние антиоксидантов на нарушения функциональной способности спермы у белых крыс при длительном поступлении ацетата свинца // Вісн. проблем біології медицини. 2006. № 6. С. 91–94.
46. Щепетильникова А. И. Гистологическая и цитохимическая характеристика семенников при воздействии магнитными полями: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Новосибирск, 1978. 23 с.
47. Юнда І. Ф. Болєзни мужских половых органов: монографія. К.: Здоров'я, 1981. 247 с.
48. Юнда І. Ф. Бесплодие в супружестве. М.: Здоровье, 1990. 463 с.
49. Acacio B. D., Gottfried T., Israel R. Evaluation of a large of men presenting for a screening semen analysis // Fertil Steril. 2000. Vol. 73. P. 595–597.
50. Afzelius B., Eliasson R., Johansen D., Lindholmer C. Lack of dinein arms in immobile human spermatozoa // J. Cell Biol. 1975. Vol. 66. P. 225–232.
51. Condic M. L. The basics about stem cells // First Things. 2002. Vol. 119. P. 30–34.
52. Domagala A., Havryluk A., Nakonechnyj A. Antisperm antidodies in prepubertal boys with cryptorchidism // Archives of Andrology. 2006. Vol. 52. P. 411–416.
53. Eskenazi B., WYROBEK A. J., Stoler E. Decreases in Human Semen Quality with Age Among Healthy Men. University of California and Lawrence Livermore National Laboratory, CA, USA. December, 1. 2001. 24 p.
54. Filippou O. S., Radionchenko A. A. The causes of male sterility in Siberia // Urologiia I. Nefrologiia. 1997. Vol. 4. P. 33–34.
55. Frohlich E. Structure and function of blood-tissue barriers // Dtsch. Med. Wochenschr. 2002. Vol. 127. N 49. P. 2629–2634.
56. Golab J., Jakobisiak M., Lasek W. Immunologia. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN, 2002. 567 p.

57. *Greendale G. A., Haas S. T., Holbrook K.* The relationship of Chlamydia trachomatis infection and male infertility // *Am. J. Public Health.* 1993. Vol. 7. P. 996–1001.
58. *Gruschwitz M. S., Brezinschek R., Brezinschek H.* Cytokine levels in the seminal plasma of infertile males // *J. Andrology.* 1996. Vol. 2. P. 158–163.
59. *Itoh N., Kumamoto Y.* The assessment of bioavailable androgen levels from the serum free testosterone level // *Folia Endocrinologica Japonica.* 1991. Vol. 1. P. 22-23.
60. *Kjaergaard N., Kristensen B., Hansen E. S.* Microbiology of semen specimens from males attending a fertility clinic // *APMIS.* 1997. Vol. 105. N 7. P. 566–570.
61. *Matzuk M. M., Lamb D. J.* The biology of infertility: research advances and clinical challenges // *Nature Medicine.* 2008. Vol. 14. N 11. P. 1197–1213.
62. *McConnel J. D.* 5 Alpha-reductase in prostate disease // *Textbook of Benign Prostatic Hyperplasia.* Oxford: ISIS Medical Media, 1996. P. 85–90.
63. *Moskowitz S. M., Chmiel J. F., Stern D. L.* CFTR-Related Disorders // *Gene Reviews.* 2001. N 26. P. 1–23.
64. *Pedersen H., Rebbe H.* Absence of arms in the axoneme of immotile human spermatozoa // *Biol. Reprod.* 1975. Vol. 12. P. 541–544.
65. *Reinhard A.* Granulocyte elastase indicates silent male genital tract inflammation and appropriate anti-inflammatory treatment // *Andrologia.* 1997. Vol. 4. P. 187–192.
66. The ESHRE Capri Workshop Group – correspondence address Crosignani P.G. Genetic aspects of female reproduction. 2008. – piergiorgio.crosignani@unimi.it.
67. *Trummer H., Ramschak-Schwarzer S., Haas J.* Thyroid hormones and thyroid antibodies in infertile males // *Fertil. Steril.* 2001. Vol. 76. N 2. P. 254–257.
68. *Weber R. E., Dohle O. K., Romijn J. C.* Clinical laboratory evaluation of male subfertility // *Advances Clinical Chemist.* 2005. N 40. P. 317–364.
69. *Weihua Zh., Lathe R., Warner M.* An endocrine pathway in the prostate,  $\text{Er}\beta$ , AR,  $5\alpha$ -androstane- $3\beta$ ,  $17\beta$  diol, and CYP7B1, regulates prostate growth // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2002. Vol. 99. N 21. P. 13589–13594.
70. *Zamboni L.* The ultrastructural pathology of the spermatozoa as a cause of infertility: the role of spermatozoon as a case of infertility: the role of electron microscopy in the evaluation of semen quality // *Fertil Steril.* 1987. Vol. 48. P. 711–734.
71. <http://www.mansbarreness.com/simptom-azoospermii-pri-khronicheskom-bronkhite.html>.

Стаття: надійшла до редакції 31.08.12

прийнята до друку 17.10.12

## CAUSES AND FORMS OF MALE INFERTILITY AND METHODS OF DIAGNOSIS EJACULATE, AS THE MAIN INDICATOR OF MALE HEALTH

**O. Yatskiv, A. Tarnovska**

*Ivan Franko National University of Lviv  
4, Hrushevskyyi St., Lviv 79005, Ukraine  
e-mail: oksjat@ukr.net*

The article characterizes the statuses of the male reproductive system with some form of infertility. We describe the causes and forms of male infertility, caused by the actions of various pathogenic factors. Also it is shown the relationship between the causes of male

infertility and the effects that manifest as changes of qualitative and quantitative ejaculate indicators and reproductive system as a whole. And sequence of research ejaculate steps, according to the standard protocol of the research is presented.

*Keywords:* spermatozoon, research ejaculate, male infertility.

## **ПРИЧИНЫ И ФОРМЫ МУЖСКОГО БЕСПЛОДИЯ И МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ ЭЯКУЛЯТА КАК ОСНОВНОГО ПОКАЗАТЕЛЯ МУЖСКОГО ЗДОРОВЬЯ**

**О. Яцків, А. Тарновская**

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

В статье охарактеризовано состояние мужской репродуктивной системы при наличии определенной формы бесплодия. Рассмотрены причины и формы мужского бесплодия при воздействии различных патогенных факторов. Описаны взаимосвязь между причинами возникновения мужского бесплодия и последствиями, которые состоят в изменении качественных и количественных показателей эякулята и репродуктивной системы в целом. Представлена последовательность этапов исследования эякулята согласно стандартного протокола исследования.

*Ключевые слова:* сперматозоид, исследования эякулята, мужское бесплодие.

## ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНИЙ ГОМЕОСТАЗ І МЕМБРАННИЙ ТРАНСПОРТ У ЖИВИХ ОРГАНІЗМАХ

А. Зинь

*Львівський національний університет імені Івана Франка  
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна  
e-mail: avolina@yandex.ru*

Узагальнено літературні дані про процеси вільнорадикального окиснення ліпідів (ПОЛ) і білків, мембранного іонного транспорту в теплокровних і холоднокровних. В огляді представлено відомості про особливості перебігу зазначених процесів у нормі та при дії різноманітних пошкоджуючих чинників, а також описано взаємозалежність у функціонуванні  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  і  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-аз і прооксидантно-антиоксидантної системи у живих організмах. Зроблено акцент на зміні інтенсивності процесів ліпопероксидації, окисної модифікації білків та функціонування іонтранспортувальних систем у зародкових об'єктах холоднокровних, зокрема в'юна *Misgurnus fossilis* L.

*Ключові слова:* пероксидне окиснення ліпідів, окисна модифікація білків, антиоксидантна система захисту, мембранний транспорт,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-аза,  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-аза, зародки в'юна.

Для регуляції іонного гомеостазу ембріональних клітин важливу роль відіграє плазматична мембрана. Ліпіди є динамічними компонентами, що підтримують стабільність молекулярної організації біологічних мембран [18, 158]. Відомо, що ліпіди мають особливе значення для транспортних властивостей мембран, оскільки порушення процесів ПОЛ впливає на ліпідний склад та іонну провідність мембран, проліферацію клітин [36, 74]. Слід зазначити, що окиснювальні процеси, опосередковані вільнорадикальними станами, все більше обговорюються у зв'язку з біогенезом фізіологічно активних речовин, розвитком організму, його старінням, імунним статусом і патологічними змінами [42, 53]. Так незначні зміни фізико-хімічного стану ліпідів можуть викликати порушення проникності мембран і функцій їхніх білкових компонентів [24], оскільки в бімолекулярному шарі вбудовані ферменти [33, 50, 140], що беруть участь у транспорті молекул та іонів, а також рецепторні білки, білки-каналотворювачі й інші [18, 40].

Ліпіди відіграють ключову роль у структурно-функціональній організації клітин і регуляції метаболізму, шляхом компарменталізації коферментів та ефекторів, а й самі виступають як попередники синтезу багатьох органічних сполук, як кофактори і регулятори активності мембранозв'язаних ферментів [93].

Процеси пероксидного окиснення, які потрібні для нормального функціонування біохімічних, біофізичних і фізіологічних систем, відбуваються у всіх клітинах живих організмів. 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 [45]. Посилення процесів пероксидного окиснення відіграє істотну роль у патогенезі багатьох захворювань: захворювань серцево-судинної та бронхолегеневої систем, нирок, мозку, травного каналу, печінки, шкіри, очей, раку, цукрового діабету, передчасного старіння [4, 90].

В організмі постійно утворюються активні форми кисню (АФК) [3, 5, 37], які можуть взаємодіяти з різними біологічними сполуками шляхом вільнорадикальних взаємодій. За

впливу екстремальних факторів різного походження (хімічне забруднення, іонізуюче випромінювання, гіпер- і гіпоксія, токсичні речовини, запальні процеси), утворення АФК у живих організмів посилюється [25, 32, 46, 66]. АФК беруть участь у метаболізмі клітин як вторинні месенджери при передачі регуляторного сигналу від міжклітинних сигнальних молекул і їх мембранних рецепторів на внутрішньоклітинні регуляторні системи, які контролюють експресію генів [54, 71]. Окисний стрес будь-якої природи зумовлює швидку реакцію антиоксидантної системи (АОС) [13, 14, 99, 112]. Проявом токсичної дії активованих метаболітів кисню є інтенсифікація реакцій вільнорадикального окиснення, яке є універсальним механізмом, за допомогою чого контролюються найважливіші гомеостатичні фізико-хімічні параметри клітини: в'язкість, вибіркова проникність і цілісність клітинних мембран [38]. За участю вільних радикалів відбувається детоксикація чужорідних сполук, що надходять в організм. У процесі окиснення складні органічні сполуки підлягають деструкції, деполімеризації та деградації. Інтенсифікація процесів вільнорадикального окиснення під дією АФК призводить до посилення процесів ПОЛ, окисної модифікації білків (ОМБ), деструкції нуклеїнових кислот, вуглеводів, що спричиняє структурні та метаболічні порушення у клітинах. Ініціатором цього процесу в більшості випадків виступає  $\text{OH}^-$  – гідроксильний радикал, який здатний приєднувати атом гідрогену від органічних сполук з утворенням органічного вільного радикала ( $\text{RH} + \text{OH} \cdot \rightarrow \text{R} \cdot + \text{H}_2\text{O}$ ) [75].

Однією з основних причин пошкодження і загибелі клітини внаслідок дії АФК на сьогодні вважають інтенсифікацію процесів ПОЛ [26, 27, 45, 67], у результаті чого відбувається окиснення ненасичених жирних кислот, що може бути причиною порушення цілісності та властивостей біологічних мембран. У нормальних умовах процеси окиснення та відновлення збалансовані. У разі збільшеного надходження ксенобіотиків, нераціонального харчування та інших негативних впливів розвивається окиснювальний стрес, для якого характерним є порушення прооксидантного й антиоксидантного балансу та розвиток оксидативних ушкоджень [12].

Дослідження впливу різноманітних фізичних і хімічних чинників на інтенсивність процесів ПОЛ є актуальними у сучасній біофізиці. У процесі розвитку патологічних процесів різко підвищується інтенсивність ліпопероксидації, що робить її універсальним механізмом пошкодження клітинних мембран. Продукти ПОЛ порушують структурну цілісність мембрани клітини, порушують їх осмотичну резистентність і електричний потенціал, окислюють тіолові сполуки і SH-групи білків, порушують структуру нуклеїнових кислот, білків, амінокислот [48]. Таким чином, актуальність дослідження процесів ПОЛ обумовлена важливою патогенетичною роллю вільнорадикального окиснення як потужного фактора мембранодеструкції.

Інтенсифікація процесів ПОЛ у ендоплазматичному та саркоплазматичному ретикулумі може зумовлювати неконтрольований вихід  $\text{Ca}^{2+}$  у цитоплазму, внаслідок чого порушується внутрішньоклітинна передача сигналів, змінюється робота ферментних систем тощо [16].

На сьогодні інтерес дослідників зріс до вивчення механізмів взаємодії АФК з білками [49, 60, 65]. Актуальність цих досліджень зумовлена надзвичайно важливим значенням білків у обмінних процесах живих організмів. Процес окисної модифікації білків у зв'язку з особливостями хімічної будови і структурної організації протеїнів має складний характер, що пов'язано з утворенням великої кількості окиснених продуктів радикальної та нерадикальної природи. Вважається, що вільнорадикальне пошкодження протеїнів має також ланцюгову природу, як і ПОЛ [49, 84, 135]. Встановлено, що при надмірній генера-

ції АФК посилюється денатурація білків, а також утворення амінокислотних радикалів, які далі вступають у вторинну взаємодію зі сусідніми амінокислотними залишками. Усі ці процеси призводять до втрати білками їхньої біологічної активності й порушення обміну речовин [49, 60]. На думку багатьох дослідників, кисневозалежне окиснення білків є раннім індикатором пошкодження органів і тканин [66].

Із літературних даних відомо, що модифікація білкових молекул за дії АФК призводить до утворення додаткових карбонільних груп у бічних ланцюгах амінокислот. Показано, що при ряді патологічних станів саме білки, а не ліпіди та нуклеїнові кислоти, є ефективними пастками генерованих АФК, і їх окисна модифікація розглядається як один із ранніх і надійних маркерів оксидативного стресу [44, 100]. У зв'язку з особливостями структурної організації протеїнів процес ОМБ є складним та специфічним і визначається амінокислотним складом протеїнів. ОМБ може бути пов'язана з порушенням як самого скелета поліпептидного ланцюга, так і окремих амінокислотних залишків з утворенням кількох типів радикалів [28].

Вважається, що деструкція білків є раннім маркером окислювальних пошкоджень тканин, порівняно з ПОЛ, оскільки продукти ОМБ стабільніші порівняно з пероксидами ліпідів, які швидко метаболізують під дією пероксидазі і низькомолекулярних антиоксидантів [35, 49]. Відомо, що відновлення окислених білків практично не відбувається. Вони стають об'єктом для дії специфічних нейтральних і лужних протеаз, активність яких залежить від багатьох факторів [35].

Головними мішенями АФК є залишки цистеїну, гістидину, тирозинів, фенілаланіну, триптофану та метіоніну.  $\text{OH}^\cdot$  та  $\text{O}_2^\cdot$ -радикал не тільки можуть взаємодіяти з амінокислотними залишками, але і окиснювати скелет поліпептидного ланцюга з подальшою фрагментацією. Ступінь пошкодження молекули білка визначається амінокислотним складом, структурною організацією та доступністю амінокислотних залишків для радикальних продуктів [25]. Залежно від хімічної природи АФК ступінь ОМБ може бути різним:  $\text{OH}^\cdot$  здебільшого викликає агрегацію білків, а у комбінації з  $\text{O}_2^\cdot$  — їх фрагментацію [25, 139]. Крім того, вважається, що негативний ефект ОМБ у клітинах пов'язаний із тим, що вони є джерелом вільних радикалів, які виснажують запаси клітинних антиоксидантів. Із даних літератури відомо, що продукти вільнорадикального окиснення білків призводять до окислювального ураження ДНК. При цьому пероксидне окиснення білків є не тільки пусковим механізмом патологічних процесів, а й найбільш раннім показником оксидативного стресу [160].

Як згадувалося вище, пошкоджуючій дії вільних радикалів і пероксидних сполук запобігає АОС захисту. Вивчення механізмів функціонування АОС дає можливість регулювати процеси ПОЛ та ОМБ. АОС включає високомолекулярні (супероксиддисмутаза (СОД, КФ 1.15.1.1), глутатіонпероксидаза (ГПО, КФ 1.11.1.9) і каталаза (КАТ, КФ 1.11.1.6)), глутатіонредуктаза (ГР, КФ 1.8.1.7) та глутатіонзалежні трансферази) і низькомолекулярні антиоксиданти (відновлений глутатіон, вітаміни Е, С, А і каротиноїди та ін.) [119]. Загальною властивістю всіх ферментних антиоксидантів є наявність у їхньому складі іонів змінної валентності, що, залежно від умов, виступають як окисник або відновник. СОД є внутрішньоклітинним ферментом, який бере участь у реакціях дисмутації супероксидного аніон-радикала. ГПО каталізує реакцію окиснення глутатіону, пероксиду водню, а також розкладає гідроперокси ліпідів із малим розміром молекул. КАТ, як і ГПО, каталізує розщеплення пероксиду водню, який утворюється в результаті дії СОД і органічних гідропероксидів ліпідів [78]. Здатність каталази до каталізу вражає: одна молекула ензиму за 1 с розкладає 44 тисячі молекул високореакційного продукту, яким є  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Відновлення



глутатіону відбувається за участю глутатіонредуктази. Глутатіон-S-трансфераза ГТ (К.Ф. 2.5.1.18), використовуючи відновлений глутатіон, відновлює гідрофобні гідропероксиди з великою молекулярною масою, гідропероксиди полінасичених жирних кислот, мононуклеотиди та інші токсичні продукти ПОЛ [78]. ГТ знешкоджують пероксиди шляхом їхньої кон'югації, а також детоксикують ксенобіотики, в тому числі й ліки.

Із даних літератури відомо, що на систему ферментів антиоксидантного захисту впливає вік, сезон і характер живлення [2, 30, 55–58, 119]. Синтез антиоксидантних ферментів та їх активність у тканинах риб значно залежить від вмісту в них мікроелементів Zn, Cu, Mn, які входять до складу СОД і КАТ [155]. Також відомо, що інтенсивність процесів ПОЛ у зародках в'юна низька порівняно з тканиною м'язів дорослого в'юна [52, 69, 70]. Наприклад, у разі інкубації зародків у середовищі Гольтфретера максимальний рівень ПОЛ зафіксовано в перші години розвитку (1–3 год після запліднення) [51, 52, 70]. Проте вже в наступні години інтенсивність цих процесів різко знижується до рівня, властивого незаплідненим яйцеклітинам. Є два характерних періоди (2–3 год і 5–6 год після запліднення), що пов'язані зі змінами інтенсивності вільнорадикальних реакцій. Однак у першому випадку інтенсивність процесів ПОЛ підвищується, а у другому, навпаки, знижується. Відомо, що саме через 2 год починається інтенсивний поділ бластомерів зародків, тому значне зростання процесів вільнорадикального окиснення може бути пов'язане з ефективним мембраногенезом [70]. Окрім того, до шостої години розвитку повністю формується морула, а в бластодермі вміст іонів близький до вмісту іонів у цитозолі диференційованих клітин, що і може впливати на інтенсивність процесів ПОЛ та ефективність функціонування ферментів АОС. Посилення цього процесу через 45 год після запліднення можна пояснити подальшою диференціацією та розвитком зародків, оскільки продукти ПОЛ беруть участь у багатьох внутрішньоклітинних процесах [20, 21, 51].

Після запліднення відбувається структурна перебудова мембран яйцеклітин. Даний процес супроводжується збільшенням текучості ліпідної фази, через 10 хв спостерігається різке її зменшення. Ініціатором структурних змін вважають іони кальцію. Дану гіпотезу підтверджує їхнє багатократне збільшення в цитоплазмі. Це цілком може впливати на стан мембранних ліпідів і на зростання процесів ПОЛ. Існує твердження, що протягом дроблення бластомерів інтенсивність процесів ліпопероксидації, котрі змінюють механічні властивості мембран, залежить як від антиоксидантної системи, так і від перерозподілу  $\text{Ca}^{2+}$  між клітиною і середовищем [17]. Показано, що у процесі окремих клітинних циклів синхронного поділу бластомерів зародків в'юна спостерігається періодичне зростання і зниження кількості вільного  $\text{Ca}^{2+}$  у бластодермі. Вплив антиоксидантів на інтенсивність процесів ПОЛ залежить від концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в середовищі. У поєднанні з холестерином він здатний змінювати інтенсивність вільнорадикальних реакцій, при цьому корегуючи транспортні властивості й проникність мембран. Періодично змінюються і активність  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-ази. Також під час поділу яйцеклітин морських їжаків, в'юна та інших тварин відбуваються циклічні зміни вмісту SH-груп та інших сполук [17, 63, 64]. Під час останніх стадій ембріогенезу і у личинок деяких видів чорноморських риб збільшується активність ферментів системи антиоксидантного захисту. Схожі тенденції в динаміці активності ферментів спостерігаються у процесі онтогенезу амфібій, ссавців [63, 64].

Авторами відзначене значне зростання інтенсивності процесів ПОЛ у зародків, інкубованих у середовищі з іонами кальцію. Важливо зазначити, що максимум активності процесів ПОЛ є через 3 год після запліднення. Ймовірно, підвищена концентрація кальцію знижує ефективність ендогенних антиоксидантів у перші 2 год розвитку. Через 5 год після

запліднення швидкість реакцій пероксидного окиснення знижується внаслідок витрачання субстратів, про що свідчить зниження вмісту ТБК-активних продуктів у зародках. Із даних літератури відомо, що іони кальцію та магнію є антагоністами щодо їхнього впливу на функціональні параметри зародків в'юна [69]. Дія цих катіонів через 45 год розвитку зародків після запліднення майже не відрізняється від контролю, тоді як зміна їхніх концентрацій в інкубаційному середовищі на перших етапах розвитку суттєво впливає на них [70]. Відомо, що без  $\text{Ca}^{2+}$  неможливе нормальне запліднення яйцеклітин і ранній розвиток зародків [69]. У літературі трапляються дані, що  $\text{Ca}^{2+}$  за нормальних умов можуть зв'язуватися з мембранними ліпідами [13]. Зв'язування  $\text{Ca}^{2+}$  з фосфоліпідами дає змогу регулювати ПОЛ дуже швидко і, що особливо важливо для селективних властивостей біологічних мембран, швидкість процесу може бути різною на досить близьких ділянках мембран [5]. Це необхідно для процесів різних перебудов мембран, що особливо інтенсивно відбуваються під час ембріонального розвитку [17].

Зміни властивостей мембранних білків і ліпідів, котрі здатні обумовлювати зменшення мікров'язкості мембран, зумовлюють підвищення активності  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-ази [41]. Припускають, що коливання активності  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-ази протягом клітинного циклу пов'язані також зі змінами білок-ліпідного складу плазматичної мембрани [76, 161].

Із літературних даних відомо, що в зародкових мембранах є іонні канали, які відіграють важливу роль у регуляції та підтриманні іонного гомеостазу. Механочутливі катіонні канали, які активуються натягом мембрани, зареєстровано у костистих риб [17, 18, 47, 121] та амфібій [127]. У мембрані ооцитів шпорцевої жаби виявлено потенціалзалежні кальцієві канали, які активуються інозитилтрифосфатом [159],  $\text{Ca}^{2+}$ -залежні  $\text{Cl}^-$ -канали і  $\text{Ca}^{2+}$ -канали L-типу в зародках морських їжаків [83, 124], антагоністом яких є ніфедипін. Для мембран ооцитів *X. laevis* описано натрій- і калійселективні потенціалкеровані, а також калієві канали чутливі до тетраетиламонію [153]. Крім іонних pomp і каналів, у мембранах зародків *X. laevis* наявні такі транспортери, як  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ -котранспортер, чутливий до фуросеміду, буметаніду та діуретиків [123], та  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $2\text{Cl}^-$ -котранспортер, який чутливий до діуретиків і не функціонує за відсутності в середовищі йонів  $\text{Na}^+$  чи  $\text{Cl}^-$  [146].

Отже, процеси, що відбуваються протягом етапів раннього ембріогенезу, в свою чергу, є результатом взаємопов'язаних змін концентраційних іонних градієнтів, каналної провідності, активного та спряженого іонного транспорту [152].

Беззаперечним є твердження про те, що процеси мембранного транспорту і процеси пероксидного окиснення ліпідів та білків є певним чином взаємопов'язаними, проте не-встановленими залишаються механізми перебігу даних процесів [59].

У літературі немає обґрунтованої інформації про зв'язок процесів пероксидного окиснення та мембранного транспорту в зародках риб [68, 76]. Мембрани зародків, що розвиваються, є важливими центрами морфогенетичних перебудов, істотним елементом яких є періодичні процеси, котрі повторюються при клітинному поділі, що базуються на окисно-відновних і електрофізіологічних процесах [18, 68, 76].

Транспорт іонів через мембрани, який забезпечується роботою АТФ-аз, а саме АТФ-аз Р-типу, є істотним елементом регуляції багатьох важливих клітинних функцій [22]. АТФ-ази Р-типу – це велика родина мультидоменних мембранозв'язаних білків із молекулярною масою 70–150 кДа, які здійснюють активний транспорт специфічних для них катіонів за рахунок енергії гідролізу АТФ практично в усіх живих організмах [62]. Загальновідомо, що у структурі АТФ-аз Р-типу виділяють три цитоплазматичні (А, N і Р) домени і трансмембранний домен [113]. Для цих ферментів характерна наявність 10 гідрофобних  $\alpha$ -спіралей, котрі пронизують мембрану (M1–M10).

АТФ-ази Р-типу розділяють на 5 підродин за гомологією первинних послідовностей і позначають I, II, III, IV і V типи. У кожній підродині ферменти поділяються на підтипи, кожен із яких є специфічним до конкретного іона (субстрату). АТФ-ази типу II і III – найбільш вивчені представники родини. Ферменти, що належать до цих типів АТФ-аз Р-типу, створюють і підтримують трансмембранний потенціал у клітинах тварин і рослин, що зумовлений значною різницею концентрацій іонів по різні боки мембрани. Наявність трансмембранного градієнта концентрацій іонів – одна з необхідних властивостей живої клітини, вона стимулює вторинний активний транспорт цукрів і амінокислот, а також інших малих молекул та іонів [62, 113, 131].

$\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-аза саркоплазматичного ретикулуму (СР  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-аза) належить до підтипу-ПА [113, 144, 145], а  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-аза плазматичної мембрани – до підтипу-ПВ. СР  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-аза є «архетипом» АТФ-аз Р-типу [117, 145, 153, 154]. Активність АТФ-аз підтипу-ПА у тваринних клітинах регулюється фосфоламбаном, а для підтипу-ПВ характерні С- і N-кінцеві кальмодулін-зв'язуючі регуляторні домени [95, 96, 132].  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ - та  $\text{H}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-ази епітеліальних клітин шлунка, які заокисляють травний сік, належать підтипу-ПС [107, 110, 122, 156].

Протягом оогенезу спостерігається зниження АТФ-азної активності, паралельно збільшується вміст АТФ. Упродовж дроблення у морських їжаків періодично змінюється активність  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-ази [109] Клітинний поділ також супроводжується зміною показників внутрішньоклітинних концентрацій іонів  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  [82, 141],  $\text{Ca}^{2+}$  [87, 128, 129], відбуваються періодичні коливання електричних параметрів, мембранного потенціалу й опору [34].

$\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-аза ( $\text{Na}/\text{K}$ ) – активована аденозинтрифосфатаза, або  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -активована,  $\text{Mg}^{2+}$ -залежна АТФ-аза – найбільш поширений у клітинах тварин представник родини АТФ-аз Р-типу і є наступним за ступенем вивченості представником родини після  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-ази саркоплазматичного ретикулуму [107]. Градієнти концентрацій іонів  $\text{Na}^+$  і  $\text{K}^+$  необхідні для формування трансмембранного потенціалу, підтримки клітинного об'єму, вторинного активного транспорту інших речовин [11].

Цей фермент являє собою складний білок, який вбудований у плазматичну мембрану клітини і має центри зв'язування для іонів  $\text{Na}^+$  і  $\text{K}^+$ , а також активний центр, де здійснюється зв'язування і гідроліз АТФ [11, 130]. Гідролізуючи АТФ, щоб забезпечити енергією активний транспорт іонів,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-аза здійснює складну багатостадійну реакцію, в якій беруть участь іони  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  і  $\text{Mg}^{2+}$ , а також АТФ. Фермент легко змінює свою конформацію (тобто взаємне розташування і упаковку окремих частин молекули білка у просторі) залежно від того, який іон до нього приєднується.

Відомо, що активність  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-ази змінюється під дією різних екзогенних і ендогенних факторів, таких як: рН, температура, концентрація АТФ і катіонів  $\text{Mg}^{2+}$  тощо. Ці фактори впливають як на фермент на рівні самого каталітичного циклу, так і на організацію АТФ-ази. Іони магнію сприяють зв'язуванню оубаїну та ванадату з молекулою ферменту. Внутрішньоклітинне співвідношення  $[\text{АТФ}]/[\text{АДФ}]$  розглядають як пусковий механізм роботи  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -помпи. Зміни активності  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-ази можуть залежати як від внутрішньоклітинної, так і від зовнішньоклітинної концентрації  $\text{Na}^+$ . Довготривала регуляція, обумовлена збільшенням синтезу  $\alpha$ - і  $\beta$ -субодиниць  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-ази, спостерігається в деяких видах тканин під дією таких гормонів як альдостерон (ниркові каналці) [91], тироксин (стимулює активність  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-ази в багатьох типах тканин) [91, 92]. Також регуляторами ферментативної активності  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-ази є протеїнкіназа С та цАМФ-залежна протеїнкіназа (протеїнкіназа А). Фосфорилування  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -помпи протеїнкіназою

С призводить до інгібування активності  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -помпи. Фосфорилування протеїніназою А АТФ-гідролази залежно від умов спричиняє пригнічення, активування чи відсутність дії цього ферменту.

Дослідження, проведені з жабою *Bufo marinus* показали, що зміни активності  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-ази протягом клітинного циклу пов'язані зі змінами білок/ліпідного складу новоутвореної плазматичної мембрани [43]. Зміни іонного гомеостазу запускають метаболічні процеси в ядрі та цитоплазмі зигот і зародків [23]. Електрофізіологічні дослідження свідчать про схожість плазматичної мембрани ооцитів і диференційованих клітин, що пояснюється наявністю в них подібних структур і властивостей [98].

При дослідженні характеру роботи  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-ази в зародків в'юна показано [47], що її активність змінюється протягом клітинного поділу бластомерів: вона є максимальною в інтерфазі клітинного циклу, а під час мітозу – зменшується [9, 18, 19, 29, 72, 73, 77]. Такі ж зміни активності  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-ази відбуваються протягом раннього розвитку зародків морських їжаків *Strongylocentrotus purpuratus* і *Litochinus pictus* [115]. Вивчення роботи  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-ази зародків морських їжаків [115] дало змогу встановити, що активність цього мембранного ферменту в незаплідненій яйцеклітині та при заплідненні залишаються на одному рівні, а швидке збільшення  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-азної активності відбувається від стадії бластули до стадії ранньої гастрული [72, 73, 77]. Проте активність оубайнчутливої АТФ-гідролази залишається незмінною до стадії вилуплення. Подібні зміни  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-азної активності до стадії ранньої гастрული описано і для іншого виду морського їжака *Hemicentrotus pulcherrimus* [125]. Отже, зміни  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-азної активності мембран характеризуються періодичністю і тісно пов'язані з метаболічними процесами, які відбуваються у цитоплазмі зародкових клітин.

Є докази того, що пошкодження тканин супроводжується збільшенням продукування високореактивних вільних радикалів і спричинює ряд небажаних ефектів, у тому числі інгібування ферментів і модифікацію іонних каналів, транспортерів та мембранних рецепторів [91, 104, 157].  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-аза дуже чутлива до окиснення вільними радикалами [104, 105]. У результаті атаки вільних радикалів  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-аза уповільнює активний транспорт іонів і втрачає гідролітичну активність [89, 104].

Одними з важливих транспортних систем є система АТФ-залежних кальцієвих помп, які є характерними для всіх типів еукаріотичних клітин. Усі  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-ази – це АТФ-ази Р-типу (Е1-Е2-типу). Цей фермент завдяки порівняно простому виділенню, очищенню і реконструкції, є дуже зручним об'єктом для дослідження молекулярних механізмів функціонування та регулювання мембранних структур, що використовують вивільнену при гідролізі АТФ хімічну енергію для перенесення іонів через біологічні мембрани, а також тому, що різні ізоформи  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-ази відіграють ключову роль в обміні  $\text{Ca}^{2+}$  переважаючої більшості клітин і тканин [39, 126, 138, 144].

Молекули  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-ази орієнтовані строго певним чином, так що зв'язування іонів кальцію і АТФ відбувається із зовнішнього боку мембрани, а вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  – з внутрішнього. Оскільки перенесення іонів здійснює білкова молекула, то має відбуватися зміна її конформації, а також одночасно відбувається зміна спорідненості центрів зв'язування до іонів кальцію [1].

До складу  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-ази входять 3 глобулярних цитоплазматичних домени, які з'єднані 10–11 трансмембранними сегментами за допомогою спіральних стовбурових ділянок, орієнтованих у цитоплазму. До цитоплазматичних доменів належить домен А – це цитоплазматична петля, до складу якої входять 125 амінокислотних залишків, Р-домен,

який містить залишок аспарагінової кислоти, що фосфорилується під час гідролізу АТФ, і нуклеотид-зв'язуючий домен (N домен) [114, 145]. Останній зв'язує кальмодулін, містить ділянки узгодженого зв'язування протеїнкіназ А та С, а також ділянку алостеричного зв'язування  $\text{Ca}^{2+}$  [102]. У мембранах ендоплазматичного ретикулулу фермент утворює димери [106], проте в мономерному стані ензим також зберігає каталітичну функцію.

У літературі активно обговорюється можлива фізіологічна роль оксидантів у регуляції  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналу і фосфорилування білків, з якими пов'язані численні біохімічні процеси в клітині.  $\text{Ca}^{2+}$  – відомий вторинний месенджер, який бере участь у регуляції різних біологічних процесів, включаючи скорочення м'язів, ріст клітин тощо [120]. Підвищення рівня  $\text{Ca}^{2+}$  призводить до залучення каскаду реакцій, пов'язаних з активацією кальмодулін-залежних кіназ,  $\alpha$  і  $\beta$  форм протеїнкінази С, тропоніну, кальмодулін-залежної протеїнфосфатази тощо. У присутності оксидантів збільшується транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  через кальцієві канали і пригнічується АТФ-залежна  $\text{Ca}^{2+}$ -помпа.

Відомі експериментальні дані про безпосередній вплив фізіологічних концентрацій оксидантів ( $\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{OH}^-$ ) на стан  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів і помп, що супроводжується вивільненням кальцію з клітинних депо або із позаклітинного простору в цитоплазму клітин [86, 88, 97]. Так, інгібування  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи саркоплазматичного ретикулулу за рахунок дії  $\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  призводить до пасивного руху  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозольний простір і збільшенню цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  [85, 101, 136]. При окисленні 5-10% жирних кислот (ЖК) у мембранних фосфоліпідах саркоплазматичного ретикулулу знижується активність  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-ази та NADPH-дегідрогенази [17]. З огляду на вищезазначене, участь деяких представників класу ліпідів у формуванні та проведенні регуляторних сигналів є безперечною, що уможливорює зв'язок організму з навколишнім середовищем.

Оксиданти, що генеруються в системі ксантин-ксантинооксидаза, мають здатність вивільняти  $\text{Ca}^{2+}$  з інозитол-трифосфатидилчутливого депо клітин. Гіпоксантин-ксантинооксидазна система стимулює вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  зі саркоплазматичного ретикулулу гладенької мускулатури судин, і цей ефект блокується СОД, але не каталазою [151].

На сьогодні відомо про безпосередню взаємодію  $\text{Ca}^{2+}$ -помп і оксидантів, що супроводжується вивільненням  $\text{Ca}^{2+}$  зі саркоплазматичного ретикулулу скелетних та серцевих м'язів. Показано, що  $\text{H}_2\text{O}_2$  впливає на транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  через плазматичну мембрану [149]. Фізіологічні концентрації  $\text{H}_2\text{O}_2$  (3-5 ммоль) збільшують пропускну здатність  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів [79, 147–150], стимулюють вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  зі саркоплазматичного ретикулулу свіжоізолюваних міоцитів щура [149, 150].  $\text{H}_2\text{O}_2$  є причиною порушення балансу  $\text{Ca}^{2+}$  в клітинах гладенької мускулатури. Причин цих змін може бути дві: вивільнення кальцію з інозитол-трифосфатидилчутливих депо або зміна вольтаж-залежних каналів за рахунок окислення тіолів. Антиоксиданти, дисульфідвідновлюючі сполуки або блокатори  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів сповільнюють підвищення рівня  $\text{Ca}^{2+}$  при станах окислювального стресу [137]. Синглетний кисень також може впливати на функцію  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів [103, 162].  $\text{Ca}^{2+}$  може надходити і з мітохондрій. Проте у випадку з мітохондріями дуже важко віддиференціювати фізіологічну роль оксидантів у здійсненні клітинної сигналізації від їх токсичної дії [142]. Підвищення концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозолі зумовлено змінами проникності мембран органел. Однак ці зміни не пов'язані з пероксидацією мембранних ліпідів, що приводить до генералізованого збільшення проникності мембран.

Самі продукти ПОЛ можуть викликати підвищення кількості цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  за таким самим механізмом, що й інші оксиданти. Часовий і концентраційно-залежний ефект гідропероксидів ліпідів на внутрішньоклітинну концентрацію  $\text{Ca}^{2+}$  корелює з

інтенсивністю «дихального вибуху» в клітинах, що свідчить про можливу регуляцію цього процесу продуктами ПОЛ.

Здатність гідропероксидів збільшувати концентрацію внутрішньоклітинного  $\text{Ca}^{2+}$  пов'язана з окисненням глутатіону й інших тіолів, які взаємодіють з інозитол-трифосфатним рецептором [149]. Показано, що збільшення окисленого глутатіону призводить до вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з інозитол-1,4,5-трифосфатидилчутливого депо в ендотеліальних клітинах легеневої тканини [101].

Джерелом цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$ , окрім ендогенних депо, може бути і позаклітинний кальцій. У процесах регуляції рівня  $\text{Ca}^{2+}$  може брати участь кальмодулін, впливаючи на активність мембранної  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-ази.  $\text{H}_2\text{O}_2$  вибірково окислює метіонінові залишки в положенні 146 і 147 у С-термінальній ділянці кальмодуліну і знижує кальмодулін-залежну активацію мембранної  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-ази [163].

Клітинний поділ супроводжується змінами таких періодичних показників, як кількість тіолових груп, що вперше виявлено у морських їжаків [61, 133], ТМП [8, 18, 34], внутрішньоклітинних концентрацій іонів  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  [6, 7, 82] та  $\text{Ca}^{2+}$  [81, 82, 87, 111, 128, 129, 133, 134, 143].

Основним чинником збільшення кількості кальцію протягом клітинних поділів зародків більшість дослідників вважають АТФ-залежний транспорт іонів кальцію через мембрану.  $\text{Ca}^{2+}$  відіграє важливу роль у реалізації сигналу від цитоплазматичної мембрани до біосинтетичного апарату заплідненої яйцеклітини. Основна роль кальцієвого сигналу в заплідненні полягає в активації регуляторів клітинного циклу, таких як *cdk1* і циклін [159]. Під час активації запліднення в цитоплазмі яйцеклітини відбувається збільшення концентрації вільного кальцію. Це, у свою чергу, стимулює зв'язування значної його кількості ліпідами клітинних мембран, що пришвидшує їхнє пероксидне окислення [8]. Не виключено, що саме ця властивість кальцію відіграє важливу роль у процесах структурно-функціональної перебудови мембран, що особливо інтенсивно відбуваються протягом раннього ембріогенезу. Проте високі концентрації внутрішньоклітинного кальцію можуть запускати не лише активацію, а й також інгібування процесів ПОЛ [52]. Існує гіпотеза, що регуляція мітозу пов'язана зі змінами концентрації  $\text{Ca}^{2+}$ , оскільки цей катіон бере участь в організації мітотичного апарату. Максимальне збільшення концентрації кальцію проходить перед початком мітозу та незначно переважає підвищення кількості цАМФ у про- та метафазах клітинного циклу.

Важливість кальцієвої сигналізації при заплідненні не підлягає сумніву. Механізм кальцієвої сигналізації може мати важливе значення в подальшому процесі розвитку [31].

Функціонування кальцієвих pomp ендоплазматичного ретикулуму та плазматичної мембрани зазнає модулюючого впливу з боку зовнішньоклітинних і внутрішньоклітинних факторів. Деякі дослідники вважають, що регуляція  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-ази відбувається за рахунок кислих фосfolіпідів чи поліненасичених жирних кислот, протеїнази А та С. Відомо, що протеїнази шляхом фосфорилування білкових молекул модулюють активність багатьох трансмембранних білків плазматичної мембрани [80, 94, 108].

Відомо, що інсулін активує  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-азу, але інгібує  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-азу, а це призводить до прискорення обміну іонів  $\text{Na}^+$  на  $\text{Ca}^{2+}$  [118]. Іншими регуляторами активності ферменту в клітині вважають кількість SH-груп, НАД та НАДН [10, 116].

Існування складної системи контролю концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  забезпечує не тільки регуляцію клітинного метаболізму, але й закономірний зв'язок між метаболізмом та динамічними мембраноспряженими процесами в ранньому розвитку тварин. Тому можна

припустити, що зміни активності даних систем можуть викликати різноманітні клітинні ефекти та впливати на розвиток організму загалом.

Активність багатьох мембранних ферментів, включаючи  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-азу і  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-азу, істотно залежить від в'язкості й хімічної природи навколишніх ліпідів. Так, наприклад, змінюючи фосфоліпідний склад везикул, у які вмонтовано  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-ази, можна помітно впливати на активність ферменту, причому чим вища текучість (величина, зворотна в'язкості) ліпідного бішару ліпосом, тим вища швидкість гідролізу АТФ [15, 16].

При зміні температури одночасно змінюються плинність ліпідного шару у везикулах і активність  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-ази. Було також показано, що при збільшенні в'язкості ліпідного шару мембран, викликаному окисленням фосфоліпідів, відбувається зниження активності ферменту.

У живих клітинах зміни ліпідного складу мембран (наприклад, складу жирних кислот у молекулах фосфоліпідів, включення холестерину або окислення мембранних ліпідів) також можуть впливати на в'язкість ліпідного шару і тим самим на активність  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-ази. Можна припустити, що підвищення в'язкості клітинних мембран, зважаючи на надлишок холестерину або пероксидного окиснення, може призвести до погіршення роботи ферментних систем, що здійснюють транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  з клітини, і в результаті цього до підвищення концентрації цих іонів у клітинному соці зі всіма наслідками.  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-аза дуже чутлива до ПОЛ, при якому відбувається окислення SH-груп, що входять в активний центр ферменту. Зіпсована таким чином  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-аза перестає качати іони кальцію. З помпи вона перетворюється на канал для кальцію, через який ці іони починають переноситися не з цитозолу в депо, як їм належить, а навпаки – з депо, де їх концентрація вища, в клітинний сік, де їх концентрація нижча [15, 16].

Практично у всіх типах клітин спостерігаються періодичні зміни концентрації цитоплазматичного  $\text{Ca}^{2+}$  – від  $10^{-8}$ - $10^{-7}$  М до  $10^{-6}$ - $10^{-5}$  М, які індукуються різними фізіологічно активними агентами і забезпечують, регулюють або, принаймні, супроводжують прояв основних функцій клітин [15, 16].

Отже, процеси, що відбуваються в клітині протягом раннього ембріогенезу, є результатом взаємопов'язаних змін концентраційних іонних градієнтів, провідності іонних каналів, активного та спряженого іонного транспорту, процесів ПОЛ і ОМБ, та функціонування ферментів АОС. Хоча ці процеси є добре вивченими у нормі, залишається невідомою дія різних окисних сполук, наприклад  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{NaClO}$  тощо, на розвиток зародка та мембранопов'язані процеси, які відбуваються в цей період. Актуальність дослідження даних речовин пов'язана з використанням їх у медицині для лікування токсикозів різного походження.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Авдоніна П. В., Ткачук В. А. Рецептори і внутрішньоклітинний кальцій. М.: Наука, 1994. С. 50.
2. Арманица Н. М. К вопросу биоиндикации природных вод на рыбах // II Всесоюз. конф. по рыбхоз. токсикологии. СПб.: Б.и., 1991. Т.1. С. 29–30.
3. Бабак О. Я. Хронические гепатиты и обмен липидов // Здоров'я України. 2004. № 10 (95). С. 4.
4. Барабой В. А. Биоантиоксиданты. К.: Книга плюс, 2006. 460 с.
5. Барабой В. А. Механизмы стресса и ПОЛ // Успехи совр. биологии. 1991. Т. 111. №5. С. 922–930.

6. Бериташвили Д. Р., Квасилашвили И. Ш., Ротт Н. Н., Игнатъева Г. М. Накопление калия в развивающейся бластодерме форели // Онтогенез. 1970. Т. 1. № 6. С. 628–630.
7. Бериташвили Д. Р., Ротт Н. Н. Накопление калия в развивающейся бластодерме карпа // Онтогенез. 1973. Т. 4. № 4. С. 424–426.
8. Божкова В. П., Квасилашвили И. Ш., Чайлахян Л. М. Некоторые электрофизиологические характеристики дробящегося яйца аксолотля // Цитология. 1974. Т. 16. С. 590–596.
9. Бойко Н. М., Целевич М. В., Санагурський Д. І. Активність  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-ази мембран зародків в'юна (*Misgurnus fossilis* L.) за дії катіонів важких металів // Укр. біохім. журнал. 2004. Т. 76. № 2. С. 22.
10. Болдырев А. А. Биологические мембраны и транспорт ионов. М.: Изд-во МГУ, 1985. 208 с.
11. Болдырев А. А., Твердислов В. А. Молекулярная организация и механизм функционирования  $\text{Na}$ -насоса. М.: ВИНТИ, 1978. 156 с.
12. Ванханен В. В., Ванханен В. Д. Учение о питании. Донецк: Донеччина, 2000. 343 с.
13. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. ПОЛ в биологических мембранах. М.: Наука, 1972. 252 с.
14. Владимиров Ю. А. Свободные радикалы в биологических системах // Сорос. обр. журнал. 2000. № 12. С. 13–19.
15. Владимиров Ю. А. Кальциевые насосы живой клетки // Сорос. обр. журнал. 1998. № 3. С. 20–27.
16. Владимиров Ю. А., Ритов В. Б. Механизм работы  $\text{Ca}$ -транспортной АТФ-азы в мембранах саркоплазматического ретикулаума. Биомембраны: структура, функции, медицинские аспекты. Рига: Зинатне, 1981. С. 22–47.
17. Геннис Р. Биомембраны: молекулярная структура и функции / пер. с англ.. М.: Мир, 1997. 624 с.
18. Гойда Е. А. Биофизические аспекты раннего онтогенеза животных. К.: Наук. думка, 1993. 224 с.
19. Гойда Е. А., Медына И. Р., Чабан В. В., Тызьо Р. В. Роль активности  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-азы и уровня рН в регуляции ионной проводимости мембран эмбриональных клеток // Цитология. 1990. Т. 32. № 9. С. 924–925.
20. Головчак Н. П., Коцюмбас Г. І., Бішко О. І., Санагурський Д. І. Прооксидантно-антиоксидантний гомеостаз печінки птиці за дії гіпохлориту натрію різних концентрацій // Фізика живого. 2011. Т. 18. № 2. С. 146–152.
21. Головчак Н. П., Тарновська А. В., Бура М. В. та ін. Прооксидантно-антиоксидантний гомеостаз зародків в'юна за дії низькоінтенсивного лазерного опромінення // Фізика живого. 2009. Т. 17. № 1. С. 76–81.
22. Гудвин Б. Аналитическая физиология клеток и развивающихся организмов. М.: Мир, 1978. 237 с.
23. Данко И. М. Роль одновалентных катионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  в регуляции клеточной пролиферации и биосинтеза макромолекул // Успехи соврем. биологии. 1984. Т. 97. № 3. С. 366–377.
24. Деев А. И., Осис Ю. Г., Формазюк В. Е. и др. Увеличение содержания воды в липидной фазе липопротеидов при перекисном окислении // Биофизика. 1983. Т. 28. № 4. С. 629–631.
25. Дубиніна О. Ю. Окиснювальний стрес і окиснювальна модифікація білків // Мед. хімія. 2001. Т. 3. № 2. С. 5–12.



26. Дубинина Е. Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток (жизнь и смерть, созидание и разрушение). Физиологические и клинико-биохимические аспекты. СПб.: Мед. пресса, 2006. 400 с.
27. Дубинина Е. Е. Роль активных форм кислорода в качестве сигнальных молекул в метаболизме тканей при состоянии окислительного стресса // Вопр. мед. химии. 2001. Т. 76. № 6. С. 136–141.
28. Дубинина Е. Е., Пустыгина А. В. Окислительная модификация протеинов, ее роль при патологических состояниях // Укр. біохім. журнал. 2008. Т. 80. № 6. С. 5–18.
29. Зинь А. Р., Мандзинець С. М., Головчак Н. П. та ін. Зміни активності  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-ази мембран зародків в'юна *Misgurnus fossilis* L. впродовж раннього ембріогенезу за дії гіпохлориту натрію в різних концентраціях // Біологічні студії / *Studia Biologica*. 2011. Т. 5. № 3. С. 59–66.
30. Зинь А. Р., Головчак Н. П., Тарновська А. В. та ін. Вплив гіпохлориту натрію на про-оксидантно-антиоксидантний гомеостаз зародків в'юна протягом раннього ембріогенезу // Біологічні студії / *Studia Biologica*. 2012. Т. 6. № 1. С. 67–76.
31. Зинь А. Р., Головчак Н. П., Мандзинець С. М. Сумарна активність  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-ази мембран зародків в'юна упродовж раннього ембріогенезу за дії гіпохлориту натрію // Експер. та клінічна фізіологія і біохімія. 2012. № 2 (58). С. 39–44.
32. Калинина Е. В., Чернов Н. Н., Саприн А. Н. та ін. Изменение экспрессии генов антиоксидантных ферментов, гемоксигеназы-1, bcl-2, bcl-xl и уровня активных форм кислорода при формировании резистентности опухолевых клеток к доксорубину // Биохимия. 2006. Т. 71. Вып. 11. С. 1475–1487.
33. Капля А. А., Кравцов А. В. Изоформы каталитической субъединицы  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-азы в тканях животных // Укр. біохім. журнал. 1990. Т. 62. № 3. С. 17–28.
34. Квавилашвили И. Ш., Божкова В. П., Чайлахян Л. М. Периодические изменения сопротивления и мембранного потенциала яиц вьюна *Misgurnus fossilis*, сопровождающие деления дробления // Онтогенез. 1971. Т. 2. № 4. С. 425–430.
35. Кличханов Н. К., Исмаилова Ж. Г., Эмирбеков Э. З. Интенсивность окислительной модификации белков плазмы крови при гипотермии и на фоне введения даларгина // Бюлл. экпер. биологии и медицины. 2001. № 31 (3). С. 281–283.
36. Коган А. Х., Кудрин А. И., Николаев С. М. Свободнорадикальное окисление в норме и патологии. М.: Наука, 1978. С. 71–74.
37. Кольман Я., Рем К. Г. Наглядная биохимия. М.: Мир, 2000. 469 с.
38. Коршун М. М., Колесова Н. А., Ткаченко І. І. та ін. Закономірності вільнорадикального окислення та енергетичного обміну в життєвоважливих органах експериментальних тварин при тривалій поєднаній дії малих доз іонізуючої радіації та хімічних забруднювачів ґрунту // Совр. проблемы токсикологии. 2001. № 1. С. 32–38.
39. Костерин С. О. Транспорт кальция в гладких мышцах. К.: Наук. думка, 1990. 216 с.
40. Курський М. Д., Кучеренко С. М. Біомембранологія. К.: Вища школа, 1993. 259 с.
41. Курята А. В., Недзвецкий В. С. Полипептидный и липидный состав мембран эритроцитов у пациентов с гипертонической болезнью с различной активностью  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  АТФ-азы // Укр. мед. часопис. 1999. № 3. С. 138–141.
42. Ланкин В. З., Тихазе А. К., Беленков Ю. Н. Свободнорадикальные процессы при заболеваниях сердечно-сосудистой системы // Кардиология. 2000. Т. 40. № 7. С. 48–61.
43. Лопина О. Д.  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ - АТФ-аза: структура, механизм и регуляция активности // Биолог. мембраны. 1999. Т. 16. № 6. С. 584–603.

44. Луцак В. И. Свободнорадикальное окисление белков и его связь с функциональным состоянием организма // Биохимия. 2007. Т. 72. № 8. С. 995–1017.
45. Луцак В. И., Багнюкова Т. В., Лужна Л. И. Показники оксидативного стресу. 2. Пероксиди ліпідів // Укр. біохім. журнал. 2006. Т. 78. № 5. С. 113–119.
46. Ляхович В. В., Вавилин В. А., Зенков Н. К. Активная защита при окислительном стрессе. Антиоксидант-респонсивный элемент // Биохимия. 2006. Т. 71. Вып. 9. С. 1183–1197.
47. Медына И. Р., Гойда Е. А., Брежестовский П. Д. Механочувствительные калиевые каналы – один из факторов колебаний потенциала покоя в раннем эмбриогенезе вьюна // Биологические мембраны. 1988. Т. 5. № 9. С. 960–969.
48. Меньщикова Е. Б. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты. М.: Слово, 2006. 556 с.
49. Меццишен І. Ф., Польовий В. П. Механізм окиснювальної модифікації білків // Бук. мед. вісник. 1999. Т. 3. № 1. С. 196–205.
50. Модянов Н. Н., Аристархова Е. А., Кочергинская С. А. Структурные основы функционирования  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -насоса // Биол. мембраны. 1988. Т. 5. № 4. С. 341–383.
51. Мукалов И. О. Перекисное окисление липидов в раннем эмбриогенезе вьюна: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Тбилиси, 1986. 24 с.
52. Мукалов И. О., Гойда Е. А., Кусень С. И., Данилевич Н. И. Перекисное окисление липидов на раннем эмбриогенезе вьюна // Биофизика. 1984. Т. 29. № 1. С. 60–64.
53. Обухова Л. К., Эмануэль И. М. Молекулярные механизмы замедления старения антиоксидантами // Итоги науки и техники. 1984. Т. 4. С. 44–80.
54. Октябрьский О. Н., Смирнова Г. В. Редокс-регуляция клеточных функций // Биохимия. 2007. Т. 72. Вып. 2. С. 158–174.
55. 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.
56. Олексюк Н. П., Янович В. Г. Вплив сезону на перекисне окиснення у тканинах ставкових риб // Біологія тварин. 2003. Т. 8. № 1–2. С. 180–183.
57. Олексюк Н. П., Янович В. Г. Вплив сезону на активність антиоксидантних ферментів у тканинах коропа // Біологія тварин. 2006. Т. 8. № 1–2. С. 145–148.
58. Олексюк Н. П., Янович В. Г. Вплив сезону на активність системи антиоксидантного захисту в печінці і скелетних м'язах товстолобика // Біологія тварин. 2007. Т. 9. № 1–2. С. 123–126.
59. Осипов А. Н., Савов В. М., Яхьяев А. В. и др. Исследование радикалов, образующихся при взаимодействии органических гидроперекисей с ионами железа, методом спиновых ловушек // Биофизика. 1984. Т. 29. № 4. С. 533–536.
60. Прохоров Д. В., Притуло О. А. Молекулы средней массы — маркер эндогенной интоксикации у больных микробной экземой // Дерматовенерология, косметология, сексопатология. 2001. № 1 (4). С. 95–97.
61. Ротт Н. Н. Клеточные циклы в раннем эмбриональном развитии. М.: Наука, 1987. 207 с.
62. Рубцов А. М. Са-АТРаза саркоплазматического ретикулула: молекулярная организация, механизм функционирования и особенности регуляции активности // Успехи биол. химии. 2005. Т. 45. С. 235–268.
63. Руднева-Титова И. И. Изменения активности антиоксидантных ферментов в процессе раннего онтогенеза некоторых видов черноморских рыб // Укр. біохім. журнал. 1995. Т. 67. № 1. С. 92–95.

64. Руднева-Титова И. И. Соотношение активности антиоксидантных ферментов и процессов перекисного окисления липидов в эмбриогенезе черноморского бычка-кругляка // Онтогенез. 1994. Т. 25. № 3. С. 13–20.
65. Рябов Г. Я., Азизов Ю. М., Дорохов С. И. и др. Окислительная модификация белков плазмы крови у больных в критических состояниях // Анестезиол. и реаниматол. 2000. № 2. С. 72–75.
66. Саприн А. Н., Калинина Е. В. Окислительный стресс и его роль в механизмах апоптоза и развития патологических процессов // Усп. биол. химии. 1999. Т. 39. С. 289–326.
67. Семчишин Г., Багнюкова Т., Луцк В. Участие регулона soxRS в ответе *Esherichia coli* на окислительный стресс, индуцированный перекисью водорода // Биохимия. 2005. Т. 70. Вып. 11. С. 1506–1513.
68. Слепцова Л. А., Неклюдова И. В., Корвин-Павловская Е. Г. и др. Вьюн – объект экспериментально-эмбриологических исследований на кафедре эмбриологии // Онтогенез. 2000. Т. 31. № 5. С. 338–342.
69. Тарновська А. В., Санагурський Д. І. Вплив йонів кальцію, магнію та високомолекулярних сполук на виживання зародків риб // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2002. Вип. 31. С. 3–14.
70. Тарновська А., Смалюх Г., Санагурський Д. Інтенсивність процесів ліпопероксидації у зародках в'юна (*Misgurnus fossilis* L.) під впливом катіонів кальцію, магнію та антибіотиків класу фторхінолонів // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2003. Вип. 34. С. 19–25.
71. Турнаев К. Т. Активные формы кислорода и регуляция экспрессии генов // Биохимия. 2002. Т. 67. Вып. 3. С. 339–352.
72. Целевич М. В., Мандзинець С. М., Санагурський Д. І.  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-азна активність мембран зародків в'юна *Misgurnus fossilis* L. при дії антибіотиків // Фізіол. журнал. 2004. Т. 50. № 5. С. 64–68.
73. Целевич М. В., Фафула Р. В., Галан М. Б., Санагурський Д. І. Ідентифікація  $\text{Ca}^{2+}$ -активованої,  $\text{Mg}^{2+}$ -залежної АТФ-гідролазної ферментативної активності мікросомної фракції мембран зародків в'юна (*Misgurnus fossilis* L.) // Укр. біохім. журнал. 2007. Т. 79. № 1. С. 53–57.
74. Чернышов В. И. Синдром липопероксидации у гидробионтов: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Тбилиси, 1991. 47 с.
75. Шаповал Г. С., Громовая В. Ф. Механизмы антиоксидантной защиты организма при действии активных форм кислорода // Укр. біохім. журнал. 2003. Т. 75. № 2. С. 5–13.
76. Юшина О. Перекисне окиснення ліпідів і мембранний транспорт у зародках холоднокровних // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2009. Вип. 49. С. 3–12.
77. Яремкевич О., Перун М., Целевич М. та ін.  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-азна активність зародків в'юна *in vitro* за впливу поверхнево-активного полімеру // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол., 2008. Вип. 47. С. 32–41.
78. Arthur J. R. Functional indicators of iodine and selenium status // Proc. Nutr. Soc. 1999. N 58. P. 507–512.
79. Boraso A., Williams A. J. Modification of the gating of the cardiac sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -release channel by  $\text{H}_2\text{O}_2$  and dithiothreitol // Am. J. Physiol. 1994. Vol. 267. N3. (Pt 2). P. H1010-1016.
80. Bruce J. I., Yule D. I., Shuttleworth T. J.  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent protein kinase-A modulation of the plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in parotid acinar cells // J. Biol. Chem. 2002. Vol. 277. N 50. P. 48172–48181.

81. *Busa W. B., Nuccitelli R.* An elevated free cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  wave follows fertilization in eggs of the frog, *X. laevis* // *J. Cell Biol.* 1985. Vol. 100. N 4. P. 1325–1329.
82. *Ciapa B., de Renzis G., Girard J. P., Payan P.* Sodium-potassium exchange in sea urchin egg. I. Kinetic and biochemical characterization at fertilization // *J. Cell Physiol.* 1984. Vol. 121. N 1. P. 235–242.
83. *Dale B., Yazaki I., Tosti E.* Polarized distribution of L-type calcium channels in early sea urchin embryos // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 1997. Vol. 273. N 3. P. 822–825.
84. *Davies K. J. A., Delsignore M. E., Lin S. W.* Protein damage and degradation by oxygen radicals. II. Modification of amino acids // *J. Biol. Chem.* 1987. Vol. 262. N 20. P. 9902–9907.
85. *Dreher D., Jornot L., Junod A. F.* Effects of hypoxanthine-xantine oxidase on  $\text{Ca}^{2+}$  stores and protein synthesis in human endothelial cells // *Circ. Res.* 1995. Vol. 76. N 3. P. 388–395.
86. *Doan T. N., Gentry D. L., Taylor A. A.* et al. Hydrogen peroxide activates agonist-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$ -flux pathways in canine venous endothelial cells // *Biochem. J.* 1994. Vol. 297. N 1. P. 209–215.
87. *Dupont G., Golbeter A.* Oscillations et ondes de calcium intracellulaire // *Bul. Groupe Etude rythmes biol.* 1993. Vol. 25. N 4. P. 92.
88. *Elliott S. J., Meszarov J. G., Schilling W. P.* Effect of oxidant stress on calcium signaling in vascular endothelial cells // *Free Radic. Biol. Med.* 1992. Vol. 13. N 6. P. 635–650.
89. *Elmoselhi A. B., Butcher A., Samson S. E.* et al. Free radicals uncouple the sodium pump in pig coronary artery // *Am. J. Physiol.* 1994. Vol. 266. P. C720–C728.
90. *Erin A. N., Gulyaeva N. V., Nikushkin E. V.* Free-radical mechanisms in cerebral pathologies (Review) // *Bull. Eksp. Biol. Med.* 1994. Vol. 118. N 4. P. 1045–1049.
91. *Ewart H. S., Klip A.* Hormonal regulation of the  $\text{Na}^{+}$ - $\text{K}^{+}$ -ATPase: mechanisms underlying rapid and sustained changes in pump activity // *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 1995. Vol. 269. P. C295–C311.
92. *Feng J., Orłowski J.* Identification of a functional thyroid hormone response element in the upstream flanking region of the human  $\text{Na},\text{K}$ -ATPase beta 1 gene // *Nucl. Acid. Res.* 1993. Vol. 21. N 11. P. 2619–2626.
93. *Fielding C. J., Fielding P. E.* Membrane cholesterol and the regulation of signal transduction // *Biochem. Soc. Trans.* 2004. Vol. 32. P. 65–69.
94. *Furukawa K., Tawada Y., Shigekawa M.* Protein kinase C activation stimulates plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  pump in cultured vascular smooth muscle cells // *J. Biol. Chem.* 1989. Vol. 264. N 9. P. 4844–4849.
95. *Geering K.* The functional role of  $\beta$  subunits in oligomeric P-type ATPases // *J. Bioenerg. Biomembr.* 2001. Vol. 33. P. 425–438.
96. *Geisler M., Koenen W., Richter J., Schumann J.* Molecular aspects of higher plant P-type  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases // *Biochem. Biophys. Acta.* 2000. Vol. 1456. P. 52–781.
97. *Grover A. K., Samson S. E., Fomin V. P.* Peroxide inactivates calcium pumps in pig coronary artery // *Am. J. Physiol.* 1992. Vol. 263. N 2. (Pt 2). P. H537–H543.
98. *Hagiwara S., Ozawa S., Sand O.* Voltage clamp analysis of two inward current mechanisms in the egg cell membrane of a starfish // *J. Gen. Physiol.* 1975. Vol. 65. N 5. P. 617–644.
99. *Haila K.* Effects of carotenoids and carotenoid-tocopherol interaction on lipid oxidation in vitro // *Dissertation.* 1999. EKT series 1165. Univ. of Helsinki, Finland.
100. *Halliwell B., Packer L. Eds., Philipko L.* et al. Free Radical in the brain. Aging, neurological and mental disorders. Springer-Verlag, Berlin, N.Y., London, 1992. P. 21–40.
101. *Henschke P. N., Elliott S. J.* Oxidized glutathione decreases luminal  $\text{Ca}^{2+}$  content of the endothelial cell Ins (1,4,5)  $\text{P}_3$ -sensitive  $\text{Ca}^{2+}$  store // *Biochem. J.* 1995. Vol. 312. (Pt 2). P. 485–489.

102. Hofmann E., James P., Vorherr T. et al. The C-terminal domain of the plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -pump contains 3 high affinity  $\text{Ca}^{2+}$ -binding sites // *J. Biol. Chem.* 1993. Vol. 268. N 14. P. 10252–10259.
103. Holmberg S. R., Cumming D. V., Kusama Y. et al. Reactive oxygen species modify the structure and function of the cardiac sarcoplasmic reticulum calcium-release channel // *Cardioscience.* 1991. Vol. 2. N 1. P. 19–25.
104. Huang W.-H., Wang Y., Askari A. Na, K –ATPase: inactivation and degradation induced by oxygen radicals // *Int. J. Biochem.* 1992. Vol. 24. P. 621–626.
105. Huang W.-H., Wang Y., Askari A. et al. Different sensitivities of the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase isoforms to oxidants // *Biochim. Biophys. Acta, Biomembranes.* 1994. Vol. 1190. N 1. P. 108–114.
106. Hymel L., Maurer A., Berenski C. et al. Target size of calcium pump protein from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum // *J. Biol. Chem.* 1984. Vol. 259. N 14. P. 4890–4895.
107. Jorgensen P., Hakansson K., Karlsh S. Structure and mechanism of  $\text{Na},\text{K}$ -ATPase: functional sites and their interactions // *Annu. Rev. Physiol.* 2003. Vol. 65. P. 817–849.
108. Imai S., Yoshida Y., Sun H. T. Sarcolemmal ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ )-ATPase of vascular smooth muscle and the effects of protein kinases thereupon // *J. Biochem.* 1990. Vol. 107. N 5. P. 755–761.
109. Ishida K., Yasumasu I., Suzuki A. Cyclic AMP shortens mitotic phase of sea urchin egg cleavage cycle // *Cell Differ. Suppl.* 1985. P. 119.
110. Kaplan J. H. Biochemistry of  $\text{Na},\text{K}$ -ATPase // *Annu. Rev. Biochem.* 2002. Vol. 71. P. 511–535.
111. Keating T. J., Cork R. J., Robinson K. R. Intracellular free calcium oscillations in normal and cleavage-blocked embryos and artificially activated eggs of *Xenopus laevis* // *J. Cell Sci.* 1994. Vol. 107. N 8. P. 2229–2237.
112. Kim M. S., Kim M. K., Kim K. S. et al. Cytotoxicity of 1,2-diacetylbenzene in human neuroblastoma SHSY5Y cells is mediated by oxidative stress // *Toxicol.* 2008. Vol. 243. N 1–2. P. 216–223.
113. Kuhlbrandt W. Biology, structure and mechanism of P-type ATPases // *Nature.* 2004. N 5. P. 282–295.
114. Lee A. G. A calcium pump made visible // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2002. Vol. 12. P. 547–554.
115. Leong P. K., Manahan D. Metabolic importance of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase activity during sea urchin development // *J. Exp. Biol.* 1997. Vol. 200. N 15. P. 2881–2892.
116. Lim D., Kyojuka K., Gragnaniello G. et al.  $\text{NAADP}^+$  initiates the  $\text{Ca}^{2+}$  response during fertilization of starfish Oocytes // *FASEB J.* 2001. Vol. 15. N 12. P. 2257–2267.
117. Ma J. J., Pan Z. Junctional membrane structure and store operated calcium entry in muscle cells // *Front. Biosci.* 2003. Vol. 8. P. D242–D255.
118. Maller J. L., Koontz J. M. A study of the induction of cell division in amphibian oocytes by insulin // *Dev. Biol.* 1981. Vol. 85. N 2. P. 309–316.
119. Martines-Alvarez R. M., Morales A. E., Sanz A. Antioxidant defenses in fish: biotic and abiotic factors // *Rev. Fish Biol. Fish.* 2005. Vol. 15. N 1. P. 75–88.
120. McDonald T., Sachs H., Orr C. et al. External potassium and baby hamster kidney cells: intracellular ions, ATP, growth, DNA-synthesis and membrane potential // *Develop. Biol.* 1972. Vol. 28. N 1. P. 290–303.
121. Medina I., Bregestovski P. Sensitivity of stretch-activated  $\text{K}^+$  channels changes during cell-cleavage cycle and may be regulated by camp-dependent protein kinase // *Proc. Roy Soc. London.* 1991. Vol. 245. N 1278. P. 95–102.
122. Mense M., Rajendran V., Blostein R., Caplan M. J. Extracellular domains, transmembrane segments, and intracellular domains interact to determine the cation selectivity of  $\text{Na},\text{K}$ - and gastric  $\text{H},\text{K}$ -ATPase // *Biochem.* 2002. Vol. 41. P. 9803–9812.

123. Mercado A., de los Heros P., Vázquez N. et al. Functional and molecular characterization of the K-Cl cotransporter of *Xenopus laevis* oocytes // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2001. Vol. 281. N 2. P. 670–680.
124. Missiaen L., Taylor C. W., Berridge M. J. Spontaneous calcium release from inositol triphosphate-sensitive calcium stores // *Nature.* 1991. Vol. 352. N 6332. P. 241–244.
125. Mitsunaga-Nakatsubo K., Fujiwara A., Yasumasu L. Change in the activity of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase in embryos on the sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus*, during early development // *Dev. Growth. Differ.* 1992. Vol. 34. N 4. P. 379–385.
126. Moller J. V., Juul B., Le Maire M. Structural organization, ion transport, and energy transduction of P- type ATPases // *Biochim. Biophys. Acta.* 1996. N 286. P. 1–51.
127. Morris C. E. Mechanosensitive ion channels // *J. Membr. Biol.* 1990. Vol. 113. N 2. P. 93–107.
128. Muto A., Kumo S., Inoue T. et al. Calcium waves along the cleavage furrows in cleavage-stage *Xenopus* embryos and its inhibition by heparin // *J. Cell Biol.* 1996. Vol. 135. N 1. P. 181–190.
129. Nixon V. L., McDougall A., Jones K. T.  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations and the cell cycle at fertilisation of mammalian and ascidian eggs // *Biol. Cell.* 2000. Vol. 92. N 3–4. P. 187–196.
130. Noguchi S., Higashi K., Kawamura M. A possible role of the beta subunit of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase on the biogenesis of the enzyme // *J. UOEH.* 1990. Vol. 12. N 1. P. 67–75.
131. Okamura H., Yasuhara J. C., Fambrough D. et al. M. P-type ATPases in *Caenorhabditis* and *Drosophila*: implications for evolution of the P-type ATPase subunit families with special references to the  $\text{Na},\text{K}$ -ATPase and  $\text{H},\text{K}$ -ATPase subgroup // *J. Membr. Biol.* 2002. Vol. 191. P. 13–24.
132. Petzelt C. Further evidence that  $\text{Ca}^{2+}$  - activated ATP-ase is connected with the cell cycle // *Ibid.* 1972. Vol. 74. N 1. P. 156–162.
133. Rebhun L. I. Cyclic nucleotides, calcium, and cell division // *Int. Rev. Cytol.* 1977. Vol. 49. P. 1–54.
134. Rebhun L. I. Calcium, sulfhydryls and the mitotic apparatus // *Amer. Zool.* 1976. Vol. 16. N 3. P. 469–482.
135. Requena J. R., Fu M. X., Ahmed M. U. et al. Quantification of malondialdehyde and 4-hydroxynonenal adducts to lysine residues in native and oxidized human low-density lipoprotein // *Biochem. J.* 1997. Vol. 322. N 1. P. 317–325.
136. Rooney T. A., Renard D. C., Sass E. J. et al. Oscillatory cytosolic calcium waves independent of stimulated inositol 1,4,5-triphosphate formation in hepatocytes // *J. Biol. Chem.* 1991. Vol. 266. N 19. P. 12272–12282.
137. Roveri A., Coassin M., Maiorino M. et al. Effect of hydrogen peroxide on calcium homeostasis in smooth muscle cells // *Arch. Biochem. Biophys.* 1992. Vol. 297. N 2. P. 265–270.
138. Salvador J. M., Mata A. M. Characterization of intracellular and the plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases in fractionated pig brain membrane using calcium pumps inhibitors // *Arch. of Biochem. & Biophys.* 1998. Vol. 351. N 2. P. 272–278
139. Shacter E. Y. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples // *Drug metabolism reviews.* 2000. Vol. 32. N 3–4. P. 307–326.
140. Skou J. C. The Na-K Pump // *News Physiol. Sci.* 1992. N 7. P. 95–100.
141. Slack C., Warner A. E., Warner R. L. The distribution of sodium and potassium in amphibian embryos during early development // *J. Physiol.* 1973. Vol. 232. P. 297–312.
142. Staal F. J. T., Anderson M. T., Staal G. E. J. et al. Redox regulation of signal transduction: tyrosine phosphorylation and calcium influx // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1994. Vol. 91. N 9. P. 3619–3622.
143. Stephano J. L., Gould M. C. The intracellular calcium increase at fertilisation in *Urechis caupo* oocytes: activation without waves // *Development. Biol.* 1997. Vol. 191. N 1. P. 53–68.

144. Stokes D. L., Green N. M. Structure and function of the calcium pump // *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 2003. Vol. 32. P. 445–468.
145. Stokes D. L., Wagenknecht T. Calcium transport across the sarcoplasmic reticulum: Structure and function of Ca<sup>2+</sup>-ATPase and the ryanodine receptor // *Eur. J. Biochem.* 2000. Vol. 267. N 17. P. 5274–5279.
146. Suvitayavat W., Palfrey H. C., Haas M. et al. Characterization of the endogenous Na(+)-K(+)-2Cl- cotransporter in Xenopus oocytes // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 1994. Vol. 266. N 1 P. 284–292.
147. Suzuki Y. J., Cleemann L., Abernethy D. R. et al. Glutathione is a cofactor for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated stimulation of Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release in cardiac myocytes // *Free Radiac. Biol. Med.* 1998. Vol. 24. N 2. P. 318–325.
148. Suzuki Y. J., Ford G. D. Inhibition of Ca<sup>2+</sup>-ATPase of vascular smooth muscle sarcoplasmic reticulum by oxygen intermediates // *Am. J. Physiol.* 1991. Vol. 261. N 2. (Pt 2). P. H568–H574.
149. Suzuki Y. J., Forman H. J., Sevanian A. Oxidants as stimulators of signal transduction // *Free Radiac. Biol. Med.* 1997. Vol. 22. N 1/2. P. 269–285.
150. Suzuki Y. J., Ford G. D. Superoxide stimulates IP<sub>3</sub>-induced Ca<sup>2+</sup>-release from vascular smooth muscle sarcoplasmic reticulum // *Am. J. Physiol.* 1992. Vol. 262. N 1. (Pt 2). P. H114–H116.
151. Sweetman L. L., Zhang N. Y., Peterson H. et al. A. Effect of linoleic acid hydroperoxide on endothelial cell calcium homeostasis and phospholipid hydrolysis // *Arch. Biochem. Biophys.* 1995. Vol. 323. N 1. P. 97–107.
152. Tosti E., Boni R. Electrical events during gamete maturation and fertilization in animals and humans // *Human Reproduction Update.* 2004. Vol. 10. N 1. P. 53–65.
153. Toyoshima C., Nakasako M., Nomura H. et al. Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution // *Nature.* 2000. Vol. 405. P. 647–655.
154. Toyoshima C., Nomura H. Structural changes in the calcium pump accompanying the dissociation of calcium // *Nature.* 2002. Vol. 418. P. 605–611.
155. Underwood E. J., Suttle N. F. *The Mineral Nutrition of Livestock* // CABI Publishing. 1999. 614 p.
156. Vagin O., Denevich S., Munson K. et al. SCH28080, a K<sup>+</sup>-competitive inhibitor of the gastric H,K-ATPase, binds near the M5–6 luminal loop, preventing K<sup>+</sup> access to the ion binding domain // *Biochem.* 2002. Vol. 41. P. 12755–12762.
157. Volterra A., Trotti D., Tromba C., Neurosci J. Glutamate uptake inhibition by oxygen free radicals in rat cortical astrocytes // *J. Neurosci.* 1994. Vol. 4. P. 2924–2932.
158. Weiss T. F. *Cellular biophysics*. V. 1. England: Massachusetts Institute of Technology. 1996. 693 p.
159. Whitaker M. Calcium at fertilization and in early development // *Physiol. Rev.* 2006. Vol. 86. N 1. P. 25–88.
160. Winterbourn C. C., Buss I. H., Chan T. P. et al. Protein carbonyl measurements show evidence of early oxidative stress in critically ill patients // *Crit. Care. Med.* 2000. Vol. 28. N 1. P. 275–279.
161. Wu B. J., Else P. L., Storlien L. H. et al. Molecular activiti of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> ATPase from different sources is related to the packing of membrane lipids // *J. Exp. Biol.* 2001. Vol. 204. P. 4271–4280.
162. Xiong H., Buck E., Stuart J. et al. Rose bengal activates the Ca<sup>2+</sup> release channel from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum // *Arch. Biochem. Biophys.* 1992. Vol. 292. N 2. P. 522–528.
163. Yao Y., Yin D., Jas G. S. et al. Oxidative modification of a carboxyl-terminal vicinal methionine in calmodulin by hydrogen peroxide inhibits calmodulin-dependent activation of the plasma membrane Ca-ATPase // *Biochem.* 1996. Vol. 35. N 8. P. 2767–2787.

Стаття: надійшла до редакції 31.08.12

доопрацьована 02.11.12

прийнята до друку 15.11.12

## PROOXIDANT-ANTIOXIDANT HOMEOSTASIS AND MEMBRANE TRANSPORT IN LIVING ORGANISMS

A. Zyn

*Ivan Franko National University of Lviv  
4, Hrushevskiy St., Lviv 79005, Ukraine  
e-mail: avolina@yandex.ru*

Summarizes published data on the lipids and proteins free radical oxidation processes, membrane ion transport in warm-blooded and cold-blooded animals. The survey provides information on changing these processes in normal and in the action of various damaging factors, and describes the relationship between the functioning of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>- and Ca<sup>2+</sup>-ATPase and prooxidant-antioxidant system of living organisms. The accent is made on the change of intensity of lipid peroxidation, proteins oxidative modification and ion transport systems functioning in germinal cold objects, including loach *Misgurnus fossilis* L.

*Keywords:* lipid peroxidation, oxidative modification of proteins, antioxidant defense system, membrane transport, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase, Ca<sup>2+</sup>-ATPase, loach embryos.

## ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНЫЙ ГОМЕОСТАЗ И МЕМБРАННЫЙ ТРАНСПОРТ В ЖИВЫХ ОРГАНИЗМАХ

A. Зынь

*Львовский национальный университет имени Ивана Франко  
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина  
e-mail: avolina@yandex.ru*

Обобщены литературные данные о процессах свободнорадикального окисления липидов и белков, мембранного ионного транспорта теплокровных и холоднокровных. В обзоре представлены сведения об изменении данных процессов в норме и при воздействии разных повреждающих факторов, а также описана взаимозависимость между функционированием Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - и Ca<sup>2+</sup>-АТФ-аз, и прооксидантно-антиоксидантной системой живых организмов. Сделан акцент на изменении интенсивности процессов липопероксидации, окислительной модификации белков и функционировании ионтранспортных систем у зародышевых объектов холоднокровных, в частности вьюна *Misgurnus fossilis* L.

*Ключевые слова:* перекисное окисление липидов, окислительная модификация белков, антиоксидантная система, мембранный транспорт, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФ-аза, Ca<sup>2+</sup>-АТФ-аза, зародыши вьюна.



## ГІСТАМІН І БЛОКАТОРИ ГІСТАМІНОВИХ РЕЦЕПТОРІВ. СТРУКТУРНІ ТА ФУНКЦІОНАЛЬНІ АСПЕКТИ

О. Бішко

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

У статті розглянуто історію вивчення гістаміну. Описана його хімічна природа, шляхи синтезу, місце локалізації. Наведені дані про механізми вивільнення гістаміну. Проаналізовані можливі шляхи біотрансформації (інактивації) цього аміну. Детально описані рецептори, чутливі до гістаміну, які поділяються на H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub> та H<sub>4</sub>, а також наведені дані щодо проявів їхньої активації. Описані блокатори гістамінових рецепторів. Висвітлено дослідження екзогенного впливу даного аміну на функціонування окремих органів.

*Ключові слова:* гістамін, гістамінові рецептори, алергія.

На сьогоднішній день поширеними стають алергічні реакції організму на різні чинники. Відомо, що при алергії відбувається викидання гістаміну, який утворюється в організмі. При певних патологічних станах і під впливом деяких лікарських речовин (тубокурарин, морфін, антибіотики та ін.) підвищується вміст вільного гістаміну у кровотоці. Вільний гістамін має значну активність: він викликає спазм гладеньких м'язів (включаючи м'язи бронхів), розширення капілярів і зниження артеріального тиску; застій крові в капілярах і збільшення проникності їхніх стінок, викликає набрякання оточуючих тканин і згущення крові.

Метою роботи було проаналізувати сучасні дані щодо структурно-функціональних параметрів гістаміну в організмі та здійснити огляд відомих антигістамінних препаратів.

**Історія вивчення гістаміну.** Гістамін був синтезований у 1907 р. і описаний у 1910 р. як речовина ("beta-1") [53], яка зумовлює специфічне скорочення клубової кишки морської свинки та має вазодепресорну дію. Проте знадобилося 17 років, аби продемонструвати його присутність в інших тканинах [27]. Відношення між гістаміном і анафілактичною реакцією було доведено у 1929 р., і його ідентифіковано як посередник анафілактичних реакцій у 1932 р. [61]. Пошук сполук для нейтралізації патологічних ефектів гістаміну почався в Інституті Пастера в Парижі з 1930-х років. Незабаром такі сполуки (на етилендіаміновій основі) були знайдені, і вони частково нівелювали ефекти гістаміну. Першими антигістамінними хімічними препаратами були адренолітикбензодіоксан (adrenolyticbenzodioxan) і піпероксан (piregoxan). Про них повідомили др. Ungar, Parrot і Vovet у 1937 р. Ці автори показали блокування дії гістаміну на клубовій кишці морської свинки [73]. Згодом виявилось, що суміш даних препаратів надзвичайно небезпечна для організму; однак заміна ефірного кисню на аміногрупу в їхній структурі привела до появи анілінових похідних етилендіаміну. За це дослідження др. Vovet отримав Нобелівську премію в 1957 р. [91]. Перший антигістамінний препарат, що використовувався для лікування людей, був антерган (phenbenzamine, RP 2339), але його згодом замінив неоантерган (merugamine, pyrilamine, RP 2786), який все ще застосовують, щоб нейтралізувати побічні ефекти дії гістаміну. Після 1945 р. ці антигістамінні препарати широко використовуються в

лікуванні різних алергічних захворювань: сінної лихоманки, кропив'янки, алергічного риніту. Проте дані препарати мають побічні ефекти, серед яких є седативний прояв (седация) [85]. Антигістамінним препаратом, застосованим у клініці, був хлоропірамін (супрастин), запропонований і вивчений др. Halpern у 1942 р. Пізніше ним же були описані фенотіазин і його похідні, які широко застосовуються у клінічній практиці до теперішнього часу [102].

**Гістамін: структура, шляхи синтезу та вивільнення.** Гістамін – 5[2-аміноетил]імідазол – один із моноамінів, походить від грецького слова *histos*, має найширший спектр впливу, при різних фізіологічних і патологічних умовах, включаючи проліферацію та диференціацію клітин, кровотворення, ембріональний розвиток, регенерацію тканин, загоєння ран, численні мозкові функції (сон, вживання їжі й агресивна поведінка), секрецію гормонів гіпофізу, регуляцію шлунково-кишкового тракту і кровоносну функцію серцево-судинної системи (розширення судин і зниження артеріального тиску), також запальні реакції модуляційної імунної відповіді [49, 81, 105, 114]. У даний час задокументовано декілька досліджень, у яких наведені докази того, що гістамін має імуномодулюючі та протизапальні впливи через взаємодію з гістаміновими рецепторами (H1, H2, H3 і H4). Усі ці чотири типи рецепторів є членами 7-трансмембранної родини рецепторів, асоційованих з G-білками (GPCR), містяться в різних чутливих до гістаміну тканинах і клітинах [43, 63, 98].

Гістамін має дві основні функціональні можливості, які пов'язані з наявністю в його структурі первинного аліфатичного аміну (рKa1 9.4) й імідазолу (рKa2 5.8). Вони утворюють монокатіон з різними таутомерами [41]. Таутомерні форми гістаміну є істотними для його біології, включаючи синтез, регулювання, метаболізм, а також утворення його похідних (рис. 1).



Рис. 1. Таутомерні форми гістаміну.

Гістамін утворюється з амінокислоти гістидину при дії на неї ферменту – гістидиндекарбоксилази (рис. 2). Він не синтезується іншими ферментативними шляхами [46, 47, 51]. Гістидиндекарбоксилаза є ферментом, який експресується в різних клітинах організму, включаючи центральну нервову систему, нейрони, слизову оболонку шлунка, парієтальні клітини, тучні клітини і базофіли [42, 78, 88].

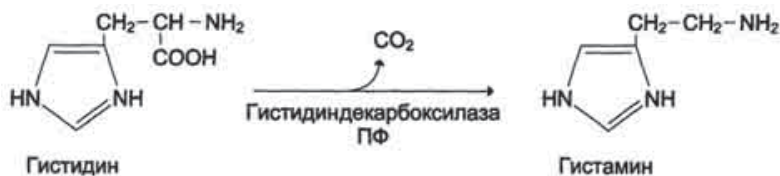


Рис. 2. Схема перетворення гістидину в гістамін.

Гістамін також є гормоноідом, який діє на багато фізіологічних процесів в організмі подібно до гормонів, але утворюється, на відміну від них, не в залозах внутрішньої секреції, а в деяких клітинах. Він перебуває у зв'язаному стані з гепарином і протеоглікановим матриксом цитоплазматичних гранул тучних клітин і базофілів [75]. Дещо менший

вміст гістаміну у тромбоцитах, проте тут він перебуває у незв'язаному стані. При активації тучних клітин і базофілів мікровезикули зливаються з плазматичною мембраною, після чого відбувається вивільнення гістаміну з гранул. У людини тучні клітини розташовані в сполучній тканині усіх органів. Вони виявлені навколо кровоносних і лімфатичних судин, нервових волокон. Значну їх кількість містять тканини й органи, які найбільш часто піддаються дії зовнішніх подразників – шкіра, слизова оболонка дихальних шляхів, шлунково-кишковий тракт і сечостатеві органи [89].

Вивільняючись із гранул, гістамін швидко дифундує в навколишні тканини і проникає в системний кровотік вже через 2–2,5 хв, досягаючи тут пікових значень через 5 хв. Проте вже через 15–30 хв його концентрація у крові повертається до вихідного рівня [26].

У кров'яному руслі в незв'язаному стані циркулює 0,2–0,4 нг гістаміну на 1 мл крові. Близько 3% вільно циркулюючого гістаміну виводиться з організму в незміненому вигляді зі сечею (10–15 мкг/добу). Вихід гістаміну з тучних клітин і базофілів пов'язаний із циркадними ритмами. Найактивніше його вивільнення спостерігається в ранкові години. Інша частина вільного гістаміну метаболізується імідазолметилтрансферазою і діаміноксидазою (гістаміназою), а потім виводиться зі сечею у вигляді метилгістаміну й імідазол-оцтової кислоти [13, 37, 117].

Підвищення вмісту гістаміну в плазмі крові і тканинній рідині відбувається як через вивільнення його з тучних клітин і базофілів при алергічній реакції негайного типу (IgE-залежний механізм) [107], так і внаслідок інших імунологічних та неімунологічних стимулів, що призводять до активації секреторних клітин і запуску секреторного процесу [109].

Фактори, що стимулюють вивільнення гістаміну, безпосередньо впливають на тучні клітини або базофіли і викликають їх руйнування, а отже, звільнення медіаторів, або, діючи на ці клітини через відповідні рецептори, активують їх і викликають секрецію гістаміну й інших медіаторів. У першому випадку діючі фактори називають неселективними, або цитотоксичними, у другому – селективними. Нерідко ця відмінність пов'язана з дозою діючого чинника. При великих концентраціях фактор може бути неселективним, при малих – селективним.

Гістамін із клітин вивільняється кількома шляхами:

1. Механічне пошкодження клітин спричиняє руйнування гранулоцитів і тучних клітин із виділенням гістаміну. Серед фізичних факторів цитотоксичну дію виявляють заморожування, висока температура, іонізуюча радіація, зокрема рентгенівські й УФ-промені [90]. Серед хімічних – детергенти, сильні луги, кислоти, органічні розчинники. Базофільні гранулоцити й тучні клітини руйнуються з виділенням гістаміну, кінінів, лейкотрієнів, простагландинів, серотоніну, АТФ [115, 108].

2. Багато хімічних речовин і лікарських засобів (апресин, декстран, тубокурарин, морфін, поліглюкін та інші) сприяють виділенню гістаміну.

3. Виділення гістаміну за допомогою імунних реакцій. На базофільні гранулоцити і тучні клітини впливають сенсibilізовані антитіла типу IgE, фіксовані на поверхні клітини. Імунологічні реакції, що зумовлені імуноглобулінами IgG або IgM, також сприяють виділенню гістаміну з тучних клітин і базофільних гранулоцитів [69].

Селективний ефект мають полімерні аміни, деякі антибіотики (наприклад, поліміксин В), кровозамінники (наприклад, декстрини), бджолина отрута, рентгеноконтрастні препарати, продукти життєдіяльності глистів, кальцієві іонофори ендогенно синтезованих речовин (катіонні білки лейкоцитів, протеази (трипсин, хімотрипін)), деякі компоненти комплементу (C4a, C3a, C5a). Так, після введення рентгено-контрастних лікарських засобів

у легеневу артерію відбувається збільшення концентрації гістаміну в периферичній крові з 0,5 нг/мл перед введенням до 7–32 нг/мл через 1 хв після введення. Гістамін у концентрації 2,4 нг/мл викликає почервоніння шкіри і головний біль. Властивості гістамінолібераторів (речовини, що сприяють вивільненню гістаміну) мають багато харчових продуктів: риба, томати, яєчний білок, полуниця, суниця [7, 20], шоколад.

**Шляхи інактивації гістаміну.** Є декілька шляхів інактивації гістаміну: окиснення діамінооксидазою, моноамінооксидазою або подібними ферментами, метилювання азоту в імідазольному кільці, метилювання й ацетилювання аміногрупи бокового ланцюга, зв'язування з білками плазми крові (гістамінопексія) і глікопротеїдами [12, 101]. Потужність інактивуючих механізмів настільки велика, що введення через зонд у дванадцятипалу кишку здорової дорослої людини до 170–200 мг гістамінхлориду (з розрахунку до 2,75 мг на 1 кг маси) викликає через кілька хвилин лише невелике відчуття припливу крові до обличчя, а рівень гістаміну в крові при цьому практично не підвищується. У людей із порушеною інактивуючою здатністю набагато менша доза гістаміну зумовлює різко виражені клінічні прояви у вигляді головного болю, кропив'янки, діареї. Ці симптоми супроводжуються значним збільшенням концентрації гістаміну в периферичній крові [90, 93].

Крім того, підвищення концентрації гістаміну відбувається при надходженні його та інших амінів із їжею. Є продукти, що містять аміни в досить значних кількостях. Так, у ферментованих сирах на 1 г продукту вміст гістаміну становить до 1300 мкг, у ковбасі «Саламі» – до 225 мкг, в інших ферментованих продуктах – до 160 мкг, в консервах – 10–350 мкг.

**Рецептори гістаміну та їхня біологічна дія.** Вивільнившись із тучних клітин і базофілів, гістамін взаємодіє зі специфічними рецепторами. Дія гістаміну на організм опосередковується через 4 типи гістамінових рецепторів – H1, H2, H3 і H4 (рис. 3) [58, 72, 87]. Гістамінові рецептори були вперше диференційовані на H1 і H2 рецептори у 1966 р. [67]. Незабаром, у 1999 р., виділений третій підтип рецепторів гістаміну і названий H3 [71, 76]. Доведено, що у розвитку алергічних реакцій беруть участь 2 типи рецепторів (H1- і H2-рецептори) [50, 64]. Згодом, у 2000 р., було повідомлено про четвертий підтип рецепторів гістаміну – H4.

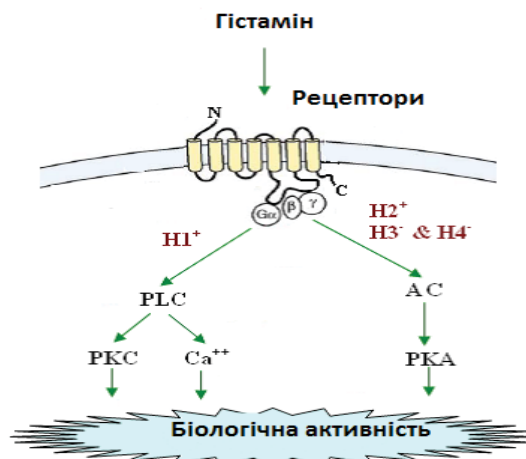


Рис. 3. Класична схема взаємодії гістаміну з рецептором до гістаміну та шляхи реалізації специфічних сигналів для H1-H4 рецепторів: AC (аденілатциклаза), PKC (протеїнкіназа C), PKA (протеїнкіназа A), PLC (фосфоліпаза C), H1<sup>+</sup> або H2<sup>+</sup> (стимуляція за допомогою рецепторів H1 або H2), H3<sup>-</sup> і H4<sup>-</sup> (гальмування за допомогою H3 і H4 рецепторів).

H1-рецептор складається з 487 амінокислот. Його молекулярна маса становить 56 кДа. H1-гістамінові рецептори містяться у гладеньких м'язах бронхів, артерій, травної системи і сечового міхура, серці та головному мозку [112]. Через H1-рецептор гістамін викликає скорочення гладенької мускулатури бронхів, шлунка, кишечника, жовчного та сечового міхура, судин малого кола кровообігу, підвищує судинну проникність, збільшує внутрішньоклітинний вміст цГМФ, посилює секрецію слизу в дихальних шляхах, викликає хемотаксис еозинофілів, нейтрофілів і посилює утворення простаноїдів (простагландинів F2a, F2, D2, тромбоксану, простацикліну) [44, 57]. H1-гістамінові рецептори конкурентно блокуються антигістамінними лікарськими засобами [80, 56].

З точки зору алергічних реакцій і захворювань, надзвичайно важлива роль активації H1-рецепторів, що призводить до гіперемії шкіри, набряку слизових оболонок і появи на них пухирів, свербіння [103], а при одночасній активації H1- та H2-рецепторів – до ринореї [39, 62].

H2-гістамінові рецептори містяться в парієтальних клітинах слизової оболонки шлунка, секреторних клітинах слинної залози, підшлунковій залозі, міометрії, гладеньких м'язах стінки артерій, жировій тканині, нейтрофільних гранулоцитах, тканинних базофілах, Т-лімфоцитах, рецепторах симпатичних нервів, нейронах (ЦНС) [104]. До складу H2 рецепторів входить 359 амінокислот. Молекулярна маса цього рецептора 40 кДа. Стимуляція цих рецепторів спричиняє підвищення секреторної активності екскреторних залоз шлунка, підшлункової залози, пригнічення скоротливої активності міометрію, підвищення вивільнення жирних кислот, пригнічення електричної активності нейронів кори великого мозку та інші [25, 48, 68].

Активацію недавно виявленого H3-підтипу гістамінових рецепторів пов'язують із впливом на нейронну передачу сигналу у вегетативній нервовій системі та симпатичних гангліях дихальних шляхів [30, 36, 110]. Молекулярна маса H3-рецепторів становить 70 кДа. Даний білок складається з 445 амінокислотних залишків. Передбачається, що експресія H3-рецепторів у різних зонах головного мозку може брати участь у різних функціях ЦНС: регуляції сенсорного сприйняття, ендокринної регуляції та розумової діяльності [40, 55, 113]. Крім того, активація H3-рецепторів може пригнічувати активність H1-гістамінових рецепторів. Отже, не можна виключити, що вплив на H3-рецептори, які перебувають у стані певного антагонізму з H1-рецепторами, може мати важливе значення при лікуванні алергічних захворювань, особливо органів дихання [33, 92].

До складу H4-рецептора входить 390 амінокислотних залишків. Ці рецептори містяться в кишковій тканині, селезінці, тимусі, мозкових клітинах, кістковому мозку, ацидофільних гранулоцитах, базофілах, тучних клітинах, Т-лімфоцитах, лейкоцитах і дендроцитах. Проте незначні сигнали їхньої локалізації виявлено в мозку, селезінці, тимусі, тонкому й товстому кишківнику, серці, печінці та легенях.

H4-рецептор є посередником хемотаксису тучних клітин і еозинофілів, а також залучений до контролю вивільнення цитокінів дендритними клітинами і Т-клітинами. Продемонстровано, що H4-рецептори, разом з H2-рецепторами, беруть участь у вивільненні IL із лімфоцитів людини. Була запропонована гіпотеза, що селективні антагоністи H4-рецепторів можуть бути використані для лікування запальних процесів при астмі, артриті, коліті та ін. Є декілька повідомлень у літературі, що доводять їхню хемотаксичну активність у тучних клітинах і еозинофілах. Це показує важливу роль H4-рецепторів у регулюванні імунної функції через дію на ліганди рецептора гістаміну в алергічному і запальному процесах [83].

Активация гистаминергичной системы выражается повышением судинной проницаемости; гиперсекрецией слизи; сокращением гладкой мускулатуры и появлением зудящих – реакциями, опосредованными H1-рецепторами [99, 100]. Увеличение синтеза простагландинов та рівня цАМФ пов'язане з активацией H2-рецепторів [74], а рівня цГМФ – H1-рецепторів [97]. Активация H1-рецепторів посилює, а активация H2-рецепторів, навпаки, гальмує хемотаксис нейтрофілів і еозинофілів. H3-рецептори визначають пригнічення вивільнення тахікінінів із нервових волокон [86].

**Патологічна дія гістаміну.** Клінічними проявами дії гістаміну з боку шкіри є сильне відчуття зчухання [8, 9, 19]; в дихальних шляхах – набряк слизової оболонки носа, гіперсекреція слизу в носі, бронхоспазм, гіперпродукція слизу бронхіальними залозами; у шлунково-кишковому тракті – біль, посилення продукції пепсину, соляної кислоти в шлунку, надмірне утворення слизу [2]; в серцево-судинній системі – падіння артеріального тиску, порушення серцевого ритму і згущення крові [26]. Виражена клінічна симптоматика, що виникає при дії на організм гістаміну, дає змогу розглядати гістамін як один з найважливіших медіаторів алергії [34]. У зв'язку з цим для лікування алергічних проявів найчастіше застосовують протигістамінні засоби [1, 29, 3210].

При з'ясуванні участі гістаміну на H1-рецептори ворітної системи печінки щурів *in vivo* встановлено, що при внутрішньопортальному введенні гістамін (у дозах 2–8 мкг/кг), діючи через специфічні H1-рецептори, зменшує локальний кровотік у печінці собак і підвищує ворітний тиск на фоні зниження системного артеріального тиску [11, 18]. Дія гістаміну в дозі 8 мкг/кг на кисневий баланс печінки щурів зумовлює звуження ворітних судин печінки, завдяки чому постачання кисню до її функціональних елементів зменшується. Водночас гістамін пригнічує споживання кисню печінкою, як наслідок рівень напруги кисню в ній майже не змінюється. Вплив гістаміну на тканинне дихання печінки реалізується через H1-рецептори [6, 17, 77, 95].

За даними др. Cook та співавт. [38], скорочення гладеньких м'язів ворітної вени щурів під дією гістаміну не опосередковується активацией ні H1-, ні H2-рецепторів. Надзвичайно великі концентрації блокатора H1-рецепторів пригнічували дію гістаміну. Але на фоні дії фентоламіну ефекти гістаміну на ворітні судини усувалися.

Деяко суперечливими є дані, отримані др. Toshimitsu і співавт. [6], які відзначали, що на мембрані гладеньком'язових клітин ворітної вени локалізовані H1- та H2-рецептори. Однак активация кожного із них призводить до протилежних реакцій: H1-рецепторів до скорочення гладеньких м'язів судини, а H2-рецепторів – до їхнього розслаблення.

Особлива роль у забезпеченні цілісності епітеліального бар'єру слизової оболонки шлунка (СОШ) належить гістамінопродуруючим клітинам. Доведено, що у щурів є багато секреторних клітин (ECL-клітини), які містять гістамін, але дуже мало тучних клітин; у людини, навпаки, багато тучних клітин, але в ECL-клітинах немає гістаміну. У щурів ECL-клітини становлять 65–75% ендокринних клітин, містять гістамін, хромогранін і ще не ідентифіковані пептидні гормони [93].

При вивченні впливу таурину на шлункову секрецію встановлено, що таурин значно посилює гістамінову секрецію пепсиногену [4].

Є відомості, що гістамін безпосередньо бере участь у регуляції процесів апоптозу лімфоїдних клітин [26]. У дозі 0,1 мкг/кг маси тіла щура гістамін індукує та прискорює розвиток апоптозу лімфоїдних клітин (ЛК) у щурів. Клітини лімфовузлів і тимоцити є більш чутливими до гістаміноіндукованого апоптозу, ніж спленоцити й мононуклеари периферичної крові (МНПК) [22].

Селективна блокада H1-гістамінових рецепторів дезлоратадином у дозах 0,007 мг/кг, 0,07 мг/кг та 0,7 мг/кг маси тіла у здорових щурів призводить до дозозалежного інгібування ранніх і пізніх стадій апоптозу спленоцитів і МНПК, та пізніх стадій апоптозу лімфоцитів і тимоцитів. Селективна блокада H2-гістамінових рецепторів фамотидином у дозах 0,06 мг/кг, 0,6 мг/кг та 6 мг/кг маси тіла у здорових щурів викликає дозозалежну індукцію апоптозу в усіх субпопуляціях ЛК як на ранніх, так і на пізніх стадіях апоптотичного процесу.

Селективна блокада H3-гістамінових рецепторів тіоперамідом у дозі 10 мг/кг маси тіла у здорових мишей в експерименті *in vivo* призводить до індукції пізньої стадії апоптозу лімфоїдних клітин. В експерименті *in vitro* на мононуклеарах периферичної крові людини тіоперамід у дозах 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M та 100  $\mu$ M призводить до модуляції процесів апоптозу, що доводить наявність H3-гістамінових рецепторів на поверхні лімфоїдних клітин і їхнього залучення в регуляцію процесів програмованої загибелі [26].

**Антигістамінні препарати.** Є три класифікації протигістамінних препаратів: за хімічною структурою, за клінічною ефективністю і переважним впливом на функціонування ЦНС, а також за часом впровадження в медичну практику – першого, другого і третього покоління [77].

За хімічною структурою блокатори гістамінових рецепторів (БГР) розподіляють на похідні [3, 5]:

1. Етаноламіну – димедрол, тавегіл.
2. Етилендіаміну – супрастин.
3. Фенотіазину – дипразин (піпольфен).
4. Тетрагідрокардоліну – діазолін.
5. Хінуклідину – фенкарол (квіфенадин).
6. Піперидину – терфенадин (селдан), лоратадин (klarитин), дескарбоетоксилоратадин.
7. Бензimidазолу – астемізол.
8. Бензолоттової кислоти – фексофенадин (телфаст).
9. Препарати лікарських рослин.

БГР за принципом конкурентного антагонізму запобігають або зменшують такі ефекти гістаміну: спазм гладеньких м'язів бронхів, кишечника, міометрію, проникність стінки капілярів з виникненням набряку та випотівання рідини, гіперемію, свербіння. Зниженню артеріального тиску, проявам алергічних реакцій і місцевим ефектам гістаміну (гіперемія шкіри, виникнення місцевого набряку у вигляді пухирця, болючість) дані препарати запобігають частково. В той же час, ці препарати не впливають на функцію ексреторних залоз шлунка і вивільнення гістаміну з тучних клітин [66, 70].

Протигістамінним препаратам властиві також побічні ефекти. У першу чергу – це пригнічувальна (седативна), снодійна дія, погіршення психомоторної функції ЦНС. Найбільш виражена ця дія у димедролу, дипразину, супрастину, діазоліну і тавегілу. Тому ці препарати не рекомендують призначати водіям, пілотам і операторам різних машин. БГР здійснюють протинудотний, протиблювотний, протипаркінсонічний, атропіноподібний, протиаритмічний, альфа-адреноблокувальний та місцевознеболювальний вплив [14].

Показаннями до застосування протигістамінних препаратів є алергічні стани, atopічний і контактний дерматит, сироваткова хвороба, екзема, укуси бджіл. Димедрол, дипразин застосовують як снодійні або місцево знеболювальні засоби. Протигістамінні препарати, що мають виражений вплив на функцію ЦНС, застосовують для лікування хворих на паркінсонізм, при виникненні вестибулярних розладів, блювання, для профілактики морської та повітряної хвороб [54].

За впливом на ЦНС протигістамінні препарати, які блокують H1 рецептори, поділяють на блокатори гістамінових рецепторів I, II та III поколінь (БГР-I, БГР-II та БГР-III, відповідно).

Антигістамінні ліки I покоління (класичні) мають специфічний спосіб дії, що полягає у блокуванні H1-гістамінових рецепторів. Вони не руйнують гістамін і не утворюють із ним сполук, проте ефективно пригнічують прояви його дії. Ці ліки пригнічують передусім прояви дії ендogenous гістаміну та, ймовірно, не мають впливу на сенсibiliзацію до алергену. Препарати всмоктуються з травного тракту, досягаючи максимальної концентрації у крові через 1–2 год, а їхня дія триває 3–6 год [21, 23].

Застосування БГР-I супроводжується певними незручностями. Вони блокують не тільки H1-рецептори, але і холінергічні (атропіноподібна дія), серотонінергічні, дофамінергічні й адренергічні рецептори. Така додаткова дія зумовлена структурною подібністю цих амінів і є причиною побічних ефектів. До них належать відчуття втоми, сонливість, запаморочення, біль голови, шум у вухах, порушення координації рухів, диспептичні явища, сухість у роті, нудота і тахікардія. Відзначають також вплив на концентрацію уваги та дієздатність. Такі прояви трапляються у 20–60% хворих, їх вираженість індивідуально дуже відрізняється. Побічні ефекти можуть знижувати якість життя більше, ніж прояви основної хвороби. Натомість зменшення дози призводить до недостатнього клінічного ефекту [102]. Недоліком блокаторів I покоління є також тахіфілаксія (звикання, зменшення ефективності препарату), що розвивається вже через 7–12 днів від початку прийому. Однією з парадоксальних побічних реакцій БГР-I є розвиток алергії: так – описано випадки алергії на дію препаратів фенотіазинового й етилендіамінового ряду, зрідка – на гідроксизин. Побічні ефекти обмежують застосування БГР-I для лікування хронічних алергічних хвороб. Препарати протипоказані при закритокутовій глаукомі, багато з них – при виразковій хворобі тощо. Крім того, ці ліки посилюють апетит, що створює проблеми для осіб із надмірною вагою [24].

Проте БГР-I мають і певні переваги. Порівняно з другою генерацією, вони мають швидшу дію, їх можна вводити парентерально, наприклад, в ургентних ситуаціях. Іноді додаткову холінергічну, серотонінергічну, дофамінергічну й адренергічну дію використовують свідомо: для знеболювання, потенціювання дії інших ліків (наприклад, при премедикації), зі снодійною метою [111].

На початку 80-х років з'явилася нова генерація ліків, які блокують H1-гістамінорецептори. Для них характерні селективне блокування H1-рецепторів, незначний побічний вплив на ЦНС або ж його відсутність, а також триваліша дія і відсутність тахіфілаксії [96, 106].

Протиалергічний ефект БГР-II не обмежується впливом на H1-рецептори, але й включає т. зв. позарецепторну дію. Вони гальмують вивільнення медіаторів ранньої та пізньої фази атонічної реакції (лейкотрієнів, простагландинів) у носі, шкірі, бронхах, стабілізують мембрани мастоцитів і базофілів, гальмують міграцію еозинофілів і агрегацію тромбоцитів. Деякі БГР-II зменшують вираженість на епітеліальних клітинах молекул міжклітинної адгезії, які також відіграють роль в алергічному запаленні [65].

Ці ліки мають значну клінічну ефективність у лікуванні багатьох алергічних захворювань, зокрема сезонного та цілорічного алергічного риніту, алергічного кон'юнктивіту, кропивниці й деяких форм бронхіальної астми. Деякі препарати є ефективними для профілактики нападів мігрені у дітей, зокрема астемізол і лоратадин [52].

При дії БГР-II гальмуються шкірні реакції на алергени та гістамін. Таке пригнічення триває набагато довше у разі призначення БГР-II. Тому шкірні проби на визначення



алергену треба проводити лише через 7 днів після відміни БГР-II, а у разі прийому астемізолу перерва має тривати 4–6 тижнів [21].

Різниця в індивідуальній реакції на БГР-II стосується також і клінічної ефективності. Важко виділити серед препаратів нової генерації ліки кращі чи гірші, сильніші чи слабші, проте можна припустити (як і у випадку класичних БГР-I) їх індивідуальну ефективність. Тому при недостатньому пригніченні проявів хвороби слід замінити препарат на інший замість того, щоб узагалі відмовитися від призначення антигістамінних ліків [23, 79].

До протигістамінних препаратів третього покоління (БГР-III) належать фексофенадин (телфаст), норастемізол і дескарбоетоксилоратадин (дезлоратадин), що є метаболітами препаратів другого покоління відповідно: терфенадину, астемізолу і лоратадину. Метаболіти виявилися більш ефективними і менш токсичними препаратами [52]. Це цікавий клініко-фармакологічний факт, що вперше проявився у групі протигістамінних засобів.

Фексофенадин (телфаст, алерга) дозволений до застосування в США з 1996 р. Тепер цей протигістамінний засіб найчастіше застосовують для лікування алергічних станів [16].

Результати доклінічних досліджень фексофенадину показали, що він є селективним антагоністом H1-гістамінових рецепторів, і на відміну від препаратів перших генерацій, не впливає на дофамінергічні, холінергічні, адренергічні й інші рецептори. В експериментах *in vitro* на ізольованих смужках трахеї і товстої кишки морських свинок фексофенадин блокував гістаміноіндуковані реакції більш вибірково, ніж терфенадин, не впливаючи при цьому на ефекти, індуковані ацетилхоліном і хлоридом кальцію. Він не накопичується в мозковій тканині та не змінює електричну активність кори головного мозку в анестезованих кроликів [82]. Широта терапевтичної дії фексофенадину дуже велика. У дослідях *in vivo* і *in vitro* було продемонстровано, що фексофенадин не має ембріотоксичності, тератогенності, мутагенності й не впливає на репродуктивну функцію [16].

Фексофенадин, будучи кінцевим продуктом метаболізму терфенадину, виводиться з організму практично в незміненому вигляді: 80% із фекаліями, 12% зі сечею і лише близько 5% прийнятої дози піддається деградації. Час напіввиведення фексофенадину з організму становить близько 14 годин, що дає підстави призначати препарат один раз на добу [94]. На відміну від терфенадину, фексофенадин не впливає на серцеву провідність і не змінює біотрансформацію інших ксенобіотиків (макролідів, кетоконазолу та ін.), окислюється системою цитохрому P-450 [28]. Фармакокінетика фексофенадину не змінюється у осіб із порушеннями функції печінки або нирок. Ця обставина дає змогу не змінювати режим використання препарату у пацієнтів, які страждають на відповідні захворювання [59].

Норастемізол порівняно з астемізолом має переваги. Норастемізол виявляє виражену протигістамінну дію завдяки більш вибірково блокуючому впливові на H1-гістамінові рецептори, тому клінічний ефект спостерігають швидше. Концентрація у крові норастемізолу досягає максимуму протягом 1 год і повністю залежить від дози. В організмі норастемізол не метаболізується і виводиться зі сечею у незміненому вигляді. Основною перевагою норастемізолу є відсутність кардіотоксичної дії та аритмій у пацієнтів із алергічними захворюваннями.

Дескарбоетоксилоратадин (дезлоратадин) має більш високу спорідненість до H1-гістамінових рецепторів, ніж лоратадин. На відміну від інших протигістамінних засобів нового покоління, дескарбоетоксилоратадин метаболізується в організмі за допомогою ферментів, тому його не можна одночасно застосовувати з препаратами, що перетворюються цитохромом P-450, зокрема, еритроміцином, фенобарбіталом та іншими. Деазлоратадин слід з обережністю застосовувати у пацієнтів із нирковою та печінковою недостатністю [31].

Медикаментозна блокада H<sub>2</sub>-рецепторів (наприклад, при лікуванні виразкової хвороби) викликає підвищення концентрації гістаміну, що може призвести до загострення наявних алергічних хвороб. Такий ефект слід передбачити й доповнювати лікування H<sub>1</sub>-блокаторами [100].

Після відкриття H<sub>2</sub>-рецепторів дослідники розпочали «конструювання» молекул, подібних на гістамін, але без його фізіологічних ефектів. Успіху досяг англійський вчений д-р. Дж. Блек зі співавторами, який до того подібним шляхом відкрив бета-адреноблокатори. У клінічній практиці використання H<sub>2</sub>-блокаторів стало поширеним із 1977 р., коли офіційно дозволили використовувати циметидин [21].

H<sub>2</sub>-блокатори добре всмоктуються з травного тракту. Максимальні концентрації препаратів у крові досягаються через 1–2 год після прийому. H<sub>2</sub>-блокатори зазнають часткової біотрансформації у печінці та у значній кількості (до 60%, особливо при парентеральному введенні) виводяться нирками як з ультрафільтратом, так і за механізмом канальцевої секреції. Це зумовлює необхідність коригування дози препарату при нирковій недостатності, цирозі печінки, а також пацієнтам старечого віку. Середній період напіввиведення коливається від 2 до 2,6 год [14].

Окремі з H<sub>2</sub>-блокаторів, зокрема циметидин, стимулюють ендогенний синтез простагландинів, що може відігравати певну роль у прискоренні загоєння виразок [68].

H<sub>2</sub>-блокатори менш ліпофільні, ніж H<sub>1</sub>-блокатори, тому гірше проникають у ЦНС. Нині випробовується золентидин – високоліпофільний H<sub>2</sub>-блокатор, який запобігає дії гістаміну в ЦНС, проте мало впливає на шлункову секрецію [54].

Іноді H<sub>2</sub>-блокатори призначають при шкірних захворюваннях. Деякі дослідники пропонують призначати H<sub>2</sub>-блокатори для лікування імуносупресії, спричиненої травмою, переливанням крові чи сепсисом.

H<sub>2</sub>-блокатори добре всмоктуються з травного тракту, тому здебільшого їх призначають *per os*, навіть при виразках і ерозіях, ускладнених кровотечею (в постгеморагічному періоді). Парентерально (внутрішньовенно повільно струменево або крапельно, внутрішньом'язово) H<sub>2</sub>-блокатори вводять у випадках неможливості прийому *per os*: післяопераційні, важкі або непритомні хворі у відділеннях інтенсивної терапії, стан стенозу, триваюча кровотеча або ранній постгеморагічний період (якщо у шлунок введено «контрольний» зонд) [118].

Для всіх H<sub>2</sub>-блокаторів характерний синдром відміни, тому, припиняючи лікування, дозу треба знижувати поступово. Для профілактики рецидивів препарати H<sub>2</sub>-блокаторів можна приймати кілька років. Лікування H<sub>2</sub>-блокаторами може маскувати прояви раку шлунка, тому при зміні чи появі нових симптомів диспепсії перед початком лікування слід виключити малігнізацію за допомогою ендоскопічного дослідження з біопсією. Крім того, при тривалому застосуванні H<sub>2</sub>-блокаторів відзначають «вислизання рецепторів» і зниження антисекреторного ефекту. Слід зазначити, що є певна група пацієнтів, резистентних до дії цих препаратів. Це зумовлено індивідуальними особливостями секреції (опосередкованої через ацетилхолінові та гастринові рецептори) [12].

Впровадження H<sub>2</sub>-блокаторів мало фактично революційний вплив на стратегію лікування пептичних виразок: воно значно спростилося, больовий синдром усувається протягом короткого часу, зникла потреба в госпіталізації більшості пацієнтів із неускладненими виразками, скоротилися терміни непрацездатності, переглянуто роль дієти в лікуванні [111].

Побічні ефекти при застосуванні H<sub>2</sub>-блокаторів виникають рідко. З боку шлунково-кишкового тракту зафіксовано зниження апетиту, нудоту, пронос або закреп, зміни

функціональних печінкових проб; іноді відзначають біль голови, артралгії, міалгії, слабкість, запаморочення, безсоння, сонливість, депресію. Рідко виникає тромбоцитопенія, лейкопенія, бронхоспазм (H2-рецептори у бронхах відіграють антагоністичну роль щодо H1-рецепторів) [60]. Описано також підвищення температури тіла й алергічні реакції. Проникаючи через гематоенцефалічний бар'єр, H2-блокатори інколи викликають дезорієнтацію і сплутаність свідомості, особливо у людей похилого віку [24].

H3-блокатори, як і H3-рецептори, вивчені недостатньо. До цієї групи належать тіоперамід, буримамід, формамідин, клозапін, клобенпропіт. Вважають, що H3-блокатори можуть бути корисними при ураженнях ЦНС типу нарколепсії, деменції, епілепсії. Бетагістин (бетасерк) є препаратом, який не має «чистої» H3-блокаторної дії. Це синтетичний аналог гістаміну, який не інактивується у шлунково-кишковому тракті. Препарат сильно пригнічує пресинаптичні H3-рецептори мозку, де, як з'ясовано, модулюється виділення гістаміну та, ймовірно, інших нейротрансмітерів. Він також прямо збуджує H1-рецептори внаслідок подібної до гістаміну хімічної будови. Із блокуванням бетагістином H3-рецепторів і підвищенням рівня нейротрансмітерів, які вивільнюються з нервових закінчень, пов'язують такі основні ефекти:

- гістамін, який вивільнюється з нервових закінчень, може збуджувати H1-рецептори. Це пояснює сильний судинорозширювальний вплив як на судини внутрішнього вуха, так і на мозкові судини;
- підвищений рівень у стовбурі мозку серотоніну й інших нейротрансмітерів гальмує активність присінкових ядер;
- суттєве поліпшення мозкового кровотоку у хворих похилого віку з атеросклеротичним ураженням судин, особливо у випадках звуження просвіту хребтових і основної артерій мозку.

Покази до застосування бетагістину: синдром і хвороба Мен'єра, вестибулопатії з запамороченням, шумом у вухах, нудотою, зниженням слуху. Нині бетагістин має ширші покази до застосування, аніж при лікуванні тільки гідропсу лабіринту (хвороба Мен'єра). Він успішно застосовується у випадках розладів кровотоку в центральній нервовій системі. Препарат суттєво зменшує частоту, тривалість і силу нападів запаморочення, які виникають із різних причин і на різних рівнях присінкового аналізатора.

Бетагістин не призводить до пригнічення психомоторних реакцій, сонливості, що дає змогу призначати його людям, які керують механічними чи транспортними засобами. Препарат не впливає на екстрапірамідну систему (не викликає паркінсоноподібних проявів), а також не має антихолінергічної дії (не спричинює сухості слизових оболонок тощо) [24].

Сучасна клінічна фармакологія має у своєму розпорядженні високоефективні протигістамінні препарати. Впровадження в медичну практику протигістамінних препаратів третього покоління, особливо фексофенадину (телфасту), дає змогу значно ефективніше лікувати алергічні захворювання [15, 16].

Наведені дані відображають важливе значення гістаміну в біологічних процесах організму, а також у розвитку патологічних станів. На сьогоднішній день кількість алергічних реакцій, за яких відбувається опосередковане вивільнення гістаміну, різко зросла, що зумовлює необхідність вивчення різних хімічних сполук, які призводять до зменшення вмісту даного медіатора у крові та нівелювання ефектів його дії.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Астафьева Н. Г., Горячкина Л. А. Лекарственная аллергия // Аллергология. 2000. № 2. С. 40–50.
2. Бабак О. Я., Фадеенко Г. Д. Фармакотерапия пептических язв желудка и двенадцатиперстной кишки. Харьков: Основа, 1997. 240 с.
3. Грэхам-Смит Д. Г., Аронсон Дж. К. Оксфордский справочник по клинической фармакологии. М.: Медицина, 2000. 744 с.
4. Грінченко О., Янчук П. Порівняльний аналіз впливу різних доз таурину на гістамінову шлункову секрецію // Вісник Львів. ун-ту. Сер. біол. 2011. Вип. 57. С. 222–235.
5. Катцунг Б. Г. Базисная и клиническая фармакология: в 2-х т. Т. 1 / пер. с англ. М.; СПб: Бином; Невский Диалект, 1998. 608 с.
6. Комаренко В. І., Терехов А. А., Воробйова А. П., Янчук П. І. Дослідження ролі n1-рецепторів у реакціях ворітних судин печінки щурів на гістамін // Черкас. нац. ун-т. Сер. біол. науки. 2008. Вип. 128. С. 54–58.
7. Лікарські рослини: енциклопед. довідник / відп. ред. А.М. Гродзінський. К.: Гол. ред. УРЕ, 1989. 544 с.
8. Лусс Л. В. Роль аллергии и псевдоаллергии в формировании аллергических заболеваний кожи // Аллергология. 2000. №3. С. 29–33.
9. Паттерсон Р., Грэммер Л. К., Гринберг П. А. Аллергические болезни: диагностика и лечение / пер. с англ.; под ред. А.Г. Чучалина и соавт. М.: ГЭОТАР, Медицина, 2000. 768 с.
10. Пыцкий В. И., Адоианова Н. В., Артамасова А. В. Аллергические заболевания. М.: Триада-Х, 1999. 472 с.
11. Подгорная Л. А., Чешивили А. П. Влияние гистамина на локальный кровоток в печени // Проблемы физиологии гипоталамуса. 1991. Вып. 9. С. 151–158.
12. Ройт А., Бростофф Д., Мейл Д. Иммунология. М.: Мир., 2000. 592 с.
13. Селиверстов В. В. Методические указания по количественному определению гистамина в рыбе с помощью тест-системы ридаскрин гистамин (ridascreEn® histamin) (производство фирмы Ар-Биофарм/г-biopharm, Германия) // 2000. Департамент ветеринари.
14. Сергеев Ю. В., Новиков П. Д. Опыт применения современных антигистаминных средств в дерматологической практике // Иммунопатология, аллергология, инфектология, N2-2001. С. 56–63.
15. Скульян Н. А. Аллергические болезни: дифференциальный диагноз, лечение. Мн.: Беларусь, 2000. 286 с.
16. Соколов А. С. Новые возможности антигистаминных препаратов (внимание на фексофенадин) // Пульмонология. 2000. № 2. С. 74–78.
17. Терехов А. А., Янчук П. І. Вплив гістаміну на кисневий баланс печінки // Вісн. Київ. ун-ту. 2009. Вип. 54. С. 14–16.
18. Цыбенко В. А., Янчук П. И., Симоненко П. Н. Применение импедансной плетизмографии для изучения депонирующей функции печени в остром эксперименте // Физиол. журнал. 1984. Т. 30. № 6. С. 756–758.
19. Чекман И. С. Биохимическая фармакодинамика. К.: Здоров'я, 1991. 201 с.
20. Чекман І. С. Клінічна фітотерапія. Природа лікує. К.: Рада, 2000. 510 с.
21. Чекман І. С. Клінічна фармакологія протигістамінних препаратів // Укр. журнал дерматології, венерології, косметології. 2002. № 2. С. 28–30.

22. Черкасов В. Г., Ковальчук О. І., Дзевульська І. В. Структурні зміни гістамінпродукуючих клітин слизової оболонки шлунка під дією метилтретбутилового ефіру в експерименті // Клінічна анатомія та оперативна хірургія. Т. 9. № 1. 2010. С. 67–72.
23. Юрочко Ф. Клінічна фармакологія блокаторів гістамінових рецепторів // Медицина світу. 2000. Т. 8. № 1. С. 8–16.
24. Юрочко Ф. Клінічна фармакологія блокаторів гістамінових рецепторів // Медицина світу. 2000. Т. 8. № 2. С. 97–105.
25. Ястремська І. А., Кайдашев І. П. Вплив селективного блокатора H<sub>2</sub>-гістамінових рецепторів фамотидіну на апоптоз лімфоїдних клітин у шурів // Ліки. 2005. № 5–6. С. 45–50.
26. Ястремська І. А. Регуляція гістаміном апоптозу лімфоїдних клітин – імунологія та алергологія: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.03.08. Донецьк, 2007. 22 с.
27. Akdis C. A., Blaser K. Histamine in the immune regulation of allergic inflammation // J. Allergy. Clin. Immunol. 2003. Vol. 112. P. 15–22.
28. Bachert C. A review of the efficacy of desloratadine, fexofenadine, and levocetirizine in the treatment of nasal congestion in patients with allergic rhinitis // *Clin Ther.* 2009. Vol. 31. P. 921–944.
29. Bernstein D. L., Van Veggel L., O'hanlon J. F. et al. Efficacy and safety of fexofenadine hydrochloride for treatment of seasonal allergic rhinitis // *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 1997. Vol. 79. P. 443–448.
30. Bongers G, Bakker RA, Leurs R. Molecular aspects of the histamine H<sub>3</sub> receptor // *Bio Pharmacol.* 2007. Vol. 73. P. 1195–1204.
31. Bousquet J., Bachert C., Canonica G. W. et al. Efficacy of desloratadine in persistent allergic rhinitis—a GA<sup>2</sup>LEN study // *Int. Arch Allergy Immunol.* 2010. Vol. 153. P. 395–402.
32. Brody T., Lerner J., Minneman K. Human Pharmacology. Molecular to Clinic. N.Y.: Mosby, 1998. 1001 p.
33. Bryce P. J., Mathias C. B., Harrison K. L. et al. The H<sub>1</sub> histamine receptor regulates allergic lung responses // *J. Clin. Invest.* 2006. Vol. 116. P. 1624–1632.
34. Buddenkotte J., Maurer M., Steinhoff M. Histamine and antihistamines in atopic dermatitis // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2010. Vol. 709. P. 73–80.
35. Church M. K. Efficacy and tolerability of rupatadine at four times the recommended dose against histamine- and platelet-activating factor-induced flare responses and ex vivo platelet aggregation in healthy males // *Br. J. Dermatol.* 2010. Vol. 163. P. 1330–1332.
36. Cogé F., Guénin S. P., Audinot V. et al. Genomic organization and characterization of splice variants of the human histamine H<sub>3</sub> receptor // *Biochem. J.* 2001. Vol. 355. P. 279–288.
37. Colucci R., Fleming J. V., Xavier R., Wang T. C. L-Histidine decarboxylase decreases its own transcription through down regulation of ERK activity // *Am. J. Physiol.* 2001. Vol. 281. P. G1081-G91.
38. Cook D. A., Macleod K. M. Responses of rabbit vein to histamine // *Br. J. Pharmacol.* 1978. Vol. 62. N 2. P. 165–170.
39. Delvalle J., Gantz I., Wang L. D. et al. Construction of a novel bifunctional biogenic amine receptor via 2 point mutations of the H<sub>2</sub>-histamine receptor // *Mol. Med.* 1995. Vol. 1. P. 280–286.
40. Drutel G., Peitsaro N., Karlstedt K. et al. Identification of rat H<sub>3</sub> receptor isoforms with different brain expression and signalling properties // *Mol. Pharmacol.* 2001. Vol. 59. P. 1–8.
41. Dunford P. J., Holgate S. T. The role of histamine in asthma // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2010. Vol. 709. P. 53–66.

42. *Dy M., Pacilio M., Arnould A.* et al. Modulation of histidine decarboxylase activity and cytokine synthesis in human leukemic cell lines: relationship with basophilic and/ or megakaryocytic differentiation // *Exp. Hematol.* 1999. Vol. 27. P. 1295–1305.
43. *Dy M., Schneider E.* Histamine-cytokine connection in immunity and hematopoiesis // *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004. Vol. 15. P. 393–410.
44. *Elz S., Kramer K., Pertz H. H.* et al. Histaprodifens: synthesis, pharmacological *in vitro* evaluation and molecular modeling of a new class of highly active and selective histamine (H1) receptor agonists // *J. Med. Chem.* 2000. Vol. 43. P. 1071–1084.
45. *Fajardo I., Urdiales J. L., Medina M. A., Sanchez-Jimenez F.* Effects of phorbol ester and dexamethasone treatment on histidine decarboxylase and ornithine decarboxylase in basophilic cells // *Biochem. Pharmacol.* 2001. Vol. 61. P. 1101–1106.
46. *Fleming J. V., Wang T. C.* Amino acid carboxy-terminal PEST domains mediate gastrin stabilization of rat L- histidine decarboxylase isoforms // *Mol. Cell. Biol.* 2000. Vol. 20. P. 4932–4947.
47. *Fleming J. V., Wang T. C.* The production of 53-55 kDa isoforms is not required for rat L-histidine decarboxylase activity // *J. Biol. Chem.* 2003. Vol. 278. P. 686–694.
48. *Fukushima Y., Oka Y., Saitoh T.* et al. Structural and functional analysis of the canine histamine H2-receptor by site-directed mutagenesis: N-glycosylation is not vital for its action // *Biochem. J.* 1995. Vol. 310. P. 553–558.
49. *Fumagalli F., Baiardini I., Pasquali M.* et al. Antihistamines: do they work? Further well-controlled trials involving larger samples are needed // *Allergy.* 2004. Vol. 59. P. 74–77.
50. *Gantz I., Munzert G., Tashiro T.* et al. Molecular cloning of the human histamine H2 receptor // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1991. Vol. 178. P. 1386–1392.
51. *Ghosh A. K., Hirasawa N., Ohtsu H.* et al. Defective angiogenesis in the inflammatory granulation tissue in histidine decarboxylase-deficient mice but not in mast cell-deficient mice // *J. Exp. Med.* 2002. Vol. 195. P. 973–982.
52. *Grubbe R. E., Lumry W. R., Anolik R.* Efficacy and safety of desloratadine/pseudoephedrine combination vs its components in seasonal allergic rhinitis // *J. Investig Allergol. Clin. Immunol.* 2009. Vol. 19. P. 117–124.
53. *Haas H., Panula P.* The role of histamine and the tuberomammillary nucleus in the nervous system // *Nat. Rev. Neurosci.* 2003. Vol. 4. P. 121–130.
54. *Haas H. L., Sergeeva O. A., Selbach O.* Histamine in the nervous system // *Physiol. Rev.* 2008. Vol. 88. P. 1183–1241.
55. *Hancock A. A., Brune M. E.* Assessment of pharmacology and potential antiobesity properties of H3 receptor antagonists/inverse agonists // *Exp. Opin Invest. Drugs.* 2005. Vol. 14. P. 223–241.
56. *Handley D., Magnetti A., Higgins A.* Therapeutic advantage antihistaminic drugs the third of generation // *Drugs.* 1998. Vol. 7. N.7. P. 1045–1054.
57. *Higuchi M., Yanai K., Okamura N.* et al. Histamine H (1) receptors in patients with Alzheimer's disease assessed by positron emission tomography // *Neurosci.* 2000. 1999: P. 721-729.
58. *Hill S. J., Ganellin C. R., Timmerman H.* et al. International Union of pharmacology. XIII. Classification of histamine receptors // *Pharmacol. Rev.* 1997. Vol. 49. N 3. P. 253–278.
59. *Horak F., Zieglmayer P., Zieglmayer R., Lemell P.* The effects of bilastine compared with cetirizine, fexofenadine, and placebo on allergen-induced nasal and ocular symptoms in patients exposed to aeroallergen in the Vienna Challenge Chamber. *Inflamm Res.* 2010. Vol. 59. P. 391–398.

60. Inove I., Taniuchi I., Kitamura D. et al. Characteristics of the mouse genomic histamine H1-receptor gene // *Genomics*. 1996. Vol.36. P. 178–181.
61. Jahn K., Haas H. L., Hatt H. Histamine activated currents in the olfactory bulb // *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 1995. Vol. 352. P. 386–393.
62. Juniper E. F. Rhinitis management: the patient's perspective // *Clin. Expe. Allergy*. 1998. Vol. 28. (suppl. 6) P. 34–38.
63. Jutel M., Watanabe T., Akdis M. et al. Immune regulation by histamine // *Curr Opin. Immunol.* 2002. Vol. 14. P. 735–740.
64. Jutel M., Watanabe T., Klunker S. et al. Histamine regulates T-cell and antibody responses by differential expression of H1 and H2 receptors // *Nature*. 2001. Vol. 413. P. 420–425.
65. Kaliner M. A., Berger W. E., Ratner P. H., Siegel C. J. The efficacy of intranasal antihistamines in the treatment of allergic rhinitis // *Ann. Allergy. Asthma Immunol.* 2011. Vol. 106 (suppl). P. S6–S11.
66. Kawakami T., Kitaura J. Mast cell survival and activation by IgE in the absence of antigen: a consideration of the biological mechanisms and relevance // *J. Immunol.* 2005. Vol. 175. P. 4167–4173.
67. Kitbunnadaj R. Histamine receptors and their ligands // *Naresuan Univ. J.* 2005. Vol. 13. P. 41–53.
68. Kobayashi T., Inove I., Jenkins N. A. et al. Cloning, RNA expression and chromosomal location of a mouse histamine H2-receptor gene // *Genomics*. 1996. Vol. 37. P. 390–394.
69. Kohno M., Yamasaki S., Tybulewicz V. L., Saito T. Rapid and large amount of autocrine IL-3 production is responsible for mast cell survival by IgE in the absence of antigen // *Blood*. 2005. Vol. 105. P. 2059–2065.
70. Kuramasu A., Saito H., Suzuki S. et al. Mast cell-/basophil-specefic transcriptional regulation of human L-histidine decarboxylase gene by CpG methylation in the promoter region // *J. Biol. Chem.* 1998. Vol. 273. P. 31607–31614.
71. Leurs R., Bakker R. A., Timmerman H., de Esch I. J. The histamine H3 receptor: from gene cloning to H3 receptor drug // *Nat. Rev. Drug Disc.* 2005. Vol. 4. P. 107–120.
72. Leurs R., Smit M. J., Timmerman H. Molecular pharmacological aspects of histamine receptors // *Pharmacol. Ther.* 1995. Vol. 66. P. 413–463.
73. Leurs R., Traiffort E., Arrang J. M. et al. Guinea-pig histamine H1 receptor: II-stable expression in Chinese hamster ovary cells reveals the interaction with three major signal transduction pathways // *J. Neurochem.* 1994. Vol. 62. P. 519–527.
74. Leurs R., Vischer H. F., Wijtmans M., de Esch I. J. P. En route to new blockbuster antihistamines: surveying the offspring of the expanding histamine receptor family // *Trends Pharmacol. Sci.* 2011. Vol. 32. P. 250–257.
75. Liu Y., Furuta K., Teshima R. et al. Critical role of PKC-II in activation of mast cells by monomeric IgE // *J. Biol. Chem.* 2005. Vol. 280. P. 38976–38981.
76. Lovenberg T. W., Roland B. L., Wilson S. J. et al. Cloning and functional expression of the human histamine H3 receptor // *Mol. Pharmacol.* 1999. Vol. 55. P. 1101–1107.
77. MacGlashan D. Histamine: a mediator of inflammation // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2003. Vol. 112. P. S53–S9.
78. Maeda K., Taniguchi H., Ohno I. et al. Induction of L-histidine decarboxylase in a human mast cell line, HMC-1 // *Exp. Hematol.* 1998. Vol. 26. P. 325–331.
79. Maintz L., Novak N. Histamine and histamine intolerance // *Am. J. Clin. Nutr.* 2007. Vol. 85. P. 1185–1193.

80. *Markham A., Wagstaff A. J.* Fexofenadine // *Drugs*. 1998. N.55. P. 269–274.
81. *Masahito O., Kohei Y., Yoh-Ichi S.* et al. Recent advances in molecular pharmacology of the histamine system: organic cation transporter as a histamine transporter and histamine metabolism // *J. Pharmacol. Sci.* 2006. Vol. 101. P. 24–30.
82. *Mason J., Reynord R., Rao N.* Systemic safety of fexofenadine hydrochloride // *Clin. Exp. Allergy*. 1999. Vol. 29. Suppl. 3. P. 163–170.
83. *Mohammad S., Tripathi T., Sobial F.* Histamine, histamine receptors, and their role in immunomodulation: an updated systematic // *Section of Immunology, The Open Immunology J.* 2009. Vol. 2. P. 9–41.
84. *Mona-Rita Yacoub, Cristoforo Incorvaia, Marco Caminati.* Immune Mechanisms of Allergen-Specific Immunotherapy // *Open Allergy J.* 2012. Vol. 5. P. 47–52.
85. *Nakagawa S., Okaya Y., Yatsunami K.* et al. Identification of multiple regulatory elements of human L-Histidine decarboxylase gene // *J. Biochem.* 1997. Vol. 121. P. 935–940.
86. *Nijmeijer S., Leurs R., Vischer H. F.* Constitutive activity of the histamine H(1) receptor // *Methods Enzymol.* 2010. Vol. 484. P. 127–147.
87. *Oda T., Morikawa N., Saito Y.* Molecular cloning and characterization of a novel type of histamine receptor preferentially expressed in leukocytes // *J. Biol. Chem.* 2000. Vol. 275. P. 36781–36786.
88. *Oh C. K., Filler S. E., Cho S. H.* Eukaryotic translation initiation factor 6 enhances histamine and IL-2 production in mast cells // *J. Immunol.* 2001. Vol. 166. P. 3606–3611.
89. *Ohtsu H., Tanaka S., Terui T.* et al. Mice lacking histidine decarboxylase exhibit abnormal mast cells // *FEBS Lett.* 2001. Vol. 502. P. 53–56.
90. *Ozdemir C., Kukuszsezer U. C., Akdis M., Akdis C. A.* Specific immunotherapy and turning off the T cell: how does it work? // *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2011. Vol. 107. P. 381–392.
91. *Parsons M. E., Ganellin C. R.* Histamine and its receptors // *Br. J. Pharmacol.* 2006. Vol. 147. P. S127-S35.
92. *Passani M. B., Lin J. S., Hancock A., Crochet S.* The histamine H3 receptor as a novel therapeutic target for cognitive and sleep disorders // *Trends Pharmacol. Sci.* 2004. Vol. 25. P. 618–625.
93. *Patil S. U., Shreffler W. G.* Immunology in the clinic review series; focus on allergies: basophils as biomarkers for assessing immune modulation // *Clin. Exp. Immunol.* 2012. Vol. 167. P. 59–66.
94. *Paul E., Berth-Jones J., Ortorine J-P., Stern M. A.* Fexo fenadine hydrochloride in the treatment of chronic idiopathic urticaria: a placebo-controlled, parallel-group, dose-ran ging study // *J. Dermatol. Treat.* 1998. N.9. P. 143–149.
95. *Rothe C. F., Maass-Moreno R.* Hepatic venular resistance responses to norepinephrine, isoproterenol, adenosine, histamine, and ACh in rabbits // *Am. J. Physiol.* 1998. Vol. 274. Pt 2. P. 777–785.
96. *Salerno E.* Pharmacology for Health professionals. N.Y.: Mosby, 1999. 827 p.
97. *Sanderson E. M., Iredale P. A., Hill S. J.* Role of Ca<sup>2+</sup> ions in the stimulation of cAMP accumulation by histamine in CHO-K1 cells transfected with the bovine H1-receptor (Abstract) // *Br. J. Pharmacol.* 1996. Vol. 117. 7 P.
98. *Schneider E., Rolli-Derkinderen M., Arock M., Dy M.* Trends in histamine research: new functions during immune responses and hematopoiesis // *Trends Immunol.* 2002. Vol. 23. P. 255–263.
99. *Sharma A., Hamelin B. A.* Classic histamine H1 receptor antagonists: a critical review of their metabolic and pharmacokinetic fate from a bird's eye view // *Curr. Drug. Metab.* 2003. Vol. 4. P. 105–129.



100. Shimamura T., Shiroishi M., Weyand S. et al. Structure of the human histamine H1 receptor complex with doxepin // *Nature*. 2011. Vol. 475. P. 65–70.
101. Shiraishi M., Hirasawa N., Oikawa S. et al. Analysis of histamine-producing cells at the late phase of allergic inflammation in rats // *Immunol.* 2000. Vol. 99. P. 600–606.
102. Simons F. E. R., Akdis C. A. Histamine and H<sub>1</sub>-antihistamines // *Clin. Exp. Allergy*. 2009. P. 1517–1548.
103. Smit M. J., Hoffmann M., Timmerman H., Leurs R. Molecular properties and signaling pathways of the histamine H1 receptor // *Clin. Exp. Allergy*. 1999. Vol. 29. P. 19–28.
104. Smit M. J., Leurs R., Alevijnse A. E. et al. Inverse agonism of histamine H2-antagonists accounts for up-regulation of spontaneously active histamine receptors // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1996. Vol. 93. P. 6802–6807.
105. Steinhoff M., Griffiths C., Church M., Luger T. A. Histamine, in Rook's textbook of dermatology // Blackwell Science 2004. P. 50–52.
106. Szeberenyi J. B., Pallinger E., Zsanko M. et al. Inhibition of effect of endogenously synthesized histamine disturbs *in vitro* human dendritic cell differentiation // *Immunol. Lett.* 2001. Vol. 76. P. 175–182.
107. Tanaka S., Ichikawa A. Recent advances in molecular pharmacology of the histamine systems: immune regulatory roles of histamine produced by leukocytes // *J. Pharmacol. Sci.* 2006. Vol. 101. P. 19–23.
108. Tanaka S., Mikura S., Hashimoto E. et al. Ca<sup>2+</sup> influx- mediated histamine synthesis and IL-6 release in mast cells activated by monomeric IgE // *Eur. J. Immunol.* 2005. Vol. 35. P. 460–468.
109. Tanaka S., Takasu Y., Mikura S. et al. Antigenindependent induction of histamine synthesis by immunoglobulin E in mouse bone marrow derived mast cells // *J. Exp. Med.* 2002. Vol. 196. P. 229–235.
110. Teuscher C., Subramanian M., Noubade R. et al. Central histamine H3 receptor signaling negatively regulates susceptibility to autoimmune inflammatory disease of the CNS // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007. Vol. 104. P. 10146–10151.
111. Thakkar M. M. Histamine in the regulation of wakefulness // *Sleep. Med. Rev.* 2011. Vol. 15. P. 65–74.
112. Toghiani A. H1-receptors: localization and role in airway physiology and in immune functions // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2003. Vol. 112. P. S60–S8.
113. Wellendorph P., Goodman M. W., Burstein E. S. et al. Molecular cloning and pharmacology of functionally distinct isoforms of the human histamine H(3) receptor // *Neuropharmacol.* 2002. Vol. 42. P. 929–940.
114. Yokoyama H. The role of central histaminergic neurin system as an anticonvulsive mechanism in developing brain // *Brain. Dev.* 2001. Vol. 23. P. 542–547.
115. Yoshimoto T., Tsutsui H., Tominaga K. et al. IL-18, although antiallergic when administered with IL-12, stimulates IL-4 and histamine release by basophils // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1999. Vol. 96. P. 13962–13966.
116. Yusuke Nagashima, Koichiro Kako, Jun-Dal Kim, Akiyoshi Fukamizu. Enhanced histamine production through the induction of histidine decarboxylase expression by phorbol ester in Jurkat cells. *Molecular medicine reports*, August 27. 2012. P. 60–65.
117. Zhao C. M., Chen D., Yamada H. et al. Rat stomach ECL cells: mode of activation of histidine decarboxylase // *Regul. Pept.* 2003. Vol. 114. P. 21–27.
118. Zuberbier T. Pharmacological rationale for the treatment of chronic urticaria with second-generation non-sedating antihistamines at higher-than-standard doses // *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 2012. Vol. 26. N 1. P. 9–18.

## HISTAMINE AND HISTAMINE RECEPTOR BLOCKERS. STRUCTURAL AND FUNCTIONAL ASPECTS

**O. Bishko**

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

The article reviews the history of histamine studing. Its chemical nature, pathways of synthesis, cell localization and the mechanisms of histamine release are described here. It is analized possible ways of biotransformation (inactivation) of this amine. Detailly are described histamine sensitive receptors, which are divided into H1, H2, H3 and H4, as well as the data about their activation. It is observed histamine receptor blockers. The author studies the impact of exogenous histamine on the some organs.

*Keywords:* histamine, histamine receptors, allergy.

## ГИСТАМИН И БЛОКАТОРЫ ГИСТАМИНЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ РЕЦЕПТОРОВ. СТРУКТУРНЫЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ АСПЕКТЫ

**О. Бишко**

*Львовский национальный университет имени Ивана Франко  
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина  
e-mail: oliabishko@gmail.com*

В статье рассмотрена история изучения гистамина. Описаны его химическая природа, пути синтеза, место локализации. Приведены данные о механизмах освобождения гистамина. Проанализированы возможные пути биотрансформации (инактивации) этого амина. Подробно описаны рецепторы, чувствительные к гистамину, которые делятся на H1, H2, H3 и H4, а также приведены данные относительно их активации. Описаны блокаторы рецепторов гистамина. Освещены исследования экзогенного влияния этого амина на функционирование отдельных органов.

*Ключевые слова:* гистамин, гистаминовые рецепторы, аллергия.

БІОТЕХНОЛОГІЯ

УДК 582.548.25: 57.085.23

**ІНДУКЦІЯ МОРФОГЕНЕЗУ КАННИ САДОВОЇ (*CANNA* × *HYBRIDA HORT.*)  
ЗА УМОВИ *IN VITRO***

**А. Тевфік, І. Митрофанова**

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

Індуковано регенерацію *in vitro* мікропагонів з вегетативних бруньок канни садової (*Canna* × *hybrida hort.*) сорту Suevia. Показано особливості розвитку мікропагонів, а також вивчено життєздатність листових експлантів на різних поживних середовищах.

*Ключові слова:* канна, морфогенез, вегетативна брунька, листок, культура *in vitro*.

На сьогоднішній день прискорене розмноження цінних сортів декоративних рослин становить великий інтерес для зеленого будівництва. Застосування біотехнологічних методів дає змогу отримати оздоровлений посадковий матеріал, депонувати найбільш цінні сорти і підтримувати їх у вигляді повільно зростаючих колекцій *in vitro*.

Канна садова (*Canna* × *hybrida hort.*) широко використовується у декоративному садівництві та привертає увагу, завдяки великим малиновим, червоним, помаранчевим, лососевим і жовтим квітам, зібраним у суцвіття, а також листкам від сизо-зеленого до фіолетово-червоного забарвлення. Види роду *Canna* L. походять із тропічних і субтропічних районів Америки та Південно-Східної Азії. У 1815 р. рослини канни вперше були інтродуковані до Нікітського ботанічного саду (НБС) [2, 6]. На теперішній час колекція канни садової налічує 26 сортів селекції НБС і 23 сорти зарубіжної селекції. Достатньо вивчені питання селекції та розмноження *C. hybrida* [6, 7]. Поряд із цим, опубліковано лише поодинокі повідомлення про результати біотехнологічних досліджень *Canna indica* L. і *Canna edulis* Ker.: методи стерилізації; абіотичні фактори, які впливають на культивування первинних експлантів; власне мікророзмноження та ризогенез *in vitro* [8–11].

Метою нашої роботи було виявити морфогенетичний потенціал різних органів і тканин цінних сортів канни садової в умовах *in vitro*.

**Матеріали та методи**

Як об'єкти дослідження використано перспективні сорти канни садової з колекційних насаджень Нікітського ботанічного саду – Національного наукового центру (НБС–ННЦ): 2 сорти селекції НБС–ННЦ (Дарунок Сходу, Лівадія) та 2 сорти зарубіжної селекції (President, Suevia).

Дослідження проводили у лабораторії біохімії, біотехнології та вірусології рослин Нікітського ботанічного саду. У роботі використано методи культури органів і тканин: загальноприйняті [1] та розроблені у відділі біотехнології рослин НБС–ННЦ [4, 5].

Як вихідні експланти взято сегменти кореневищ канни садової, відібрані у листопаді 2011 р. Для введення у культуру *in vitro* виділено вегетативні бруньки. Рослинний матеріал стерилізували у декілька етапів: промивали у проточній водопровідній воді з мильним розчином, ополіскували проточною водопровідною водою, протирали марлевою серветкою,

змоченою у 70%-ному етанолі. Потім відділяли забруднені тканини від вегетативної бруньки, експлантати розміщували у стерильні склянки та послідовно обробляли розчинами стерилізуючих агентів (табл. 1).

Таблиця 1

Схема ступінчастої стерилізації первинних експлантів канти садової

Етап стерилізації	Стерилізуючий розчин	Виробник	Експозиція
1	70% C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	Септол, Україна	1 хв
2	3% NaClO	Доместос, Україна	17 хв
3	5-разове промивання у стерильній дистильованій воді		

Експлантати після стерилізації, в асептичних умовах розміщали у пробірки на агаризоване поживне середовище. Як базове середовище використовували поживне середовище Murashige, Skoog (МС) [12] із додаванням різних концентрацій цитокінінів і ауксинів.

Вичленяли висічки листка розміром 0,7–1,2 см<sup>2</sup> від культивованих за умов *in vitro* рослин. Потім їх також розміщували на поживне середовище, доповнене БАП (6-бензиламінопурин), НОК ( $\alpha$ -нафтилоцтова кислота), ІОК ( $\beta$ -індоліл-3-оцтова кислота), 2,4-Д (2,4-дихлорфеноксіоцтова кислота), ТДЗ (тидіазурон).

Для індукції розвитку експлантати культивували при температурі 24±1°C, 16-годинному фотоперіоді й інтенсивності освітлення 2–3 клк. Частину висічок листка розміщували у термостаті й культивували без освітлення.

Опрацювання результатів експериментів проводили за допомогою методів статистичного аналізу [3].

### Результати і їхнє обговорення

Одним із найважливіших факторів, які впливають на регенерацію мікропагонів на початковому етапі культивування є генотип рослинного матеріалу [4]. Так, у життєздатних експлантів канти садової сорту Дарунок Сходу не було відзначено збільшення довжини мікропагонів. Разом з тим, на 25 добу культивування відбувалося подовження життєздатних експлантів сортів Лівадія та Президент до 1 см, а також було відзначено формування 1–2 розгорнутих листків на мікропагін. Однак у більш пізні строки культивування краї листків потемніли (рис. 1), що призводило згодом до відмирання цілого мікропагона.

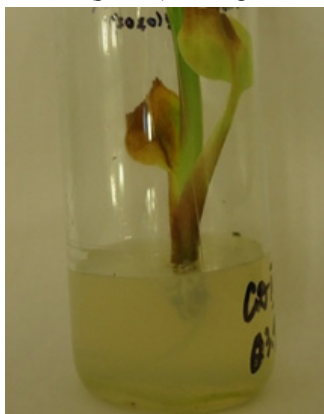


Рис. 1. Потемніння листків канти садової сорту Президент, культивованого в умовах *in vitro* (масштаб 1 см).

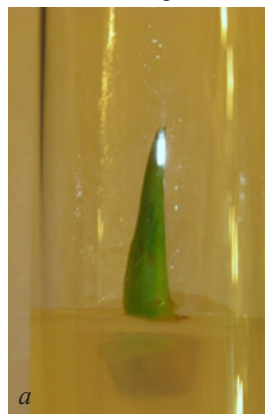


Рис. 2. Експлантати канти садової сорту Suevía (масштаб 1 см): а - на початковому етапі культивування; б - на 30-ту добу культивування.

У результаті проведених досліджень було відзначено подовження мікропагонів сорту *Suevia* на 10-ту добу культивування; на 30-ту добу культивування їхня довжина збільшилася на 2,5 см (рис. 2, а, б). Через три місяці культивування в умовах *in vitro* відзначено утворення  $3,33 \pm 0,36$  розгорнутих листків на експлант (табл. 2). Разом з тим, довжина мікропагонів збільшилася на  $5,5 \pm 0,74$  см.

Таблиця 2

Зміни морфологічних ознак експлантів сорту *Suevia* при культивуванні *in vitro*

Морфологічні ознаки	Тривалість культивування, міс		
	3	6	9
Збільшення довжини мікропагонів, см	$5,5 \pm 0,74$	$8,92 \pm 0,63$	$11,33 \pm 0,87$
Кількість розгорнутих листків на мікропагін, шт.	$3,33 \pm 0,36$	$4,67 \pm 0,46$	$5,33 \pm 0,46$

Залежно від тривалості культивування, у експлантів сорту *Suevia* спостерігали зміни їх морфологічних ознак. Так, на 180-ту добу культивування довжина мікропагонів зросла в 1,4 рази більше ніж на 270-ту добу. При цьому в експлантів після закінчення 2-го кварталу культивування (6 місяців) сформувалося удвічі більше розгорнутих листків, ніж за 3-й (9 місяців).

Як показали наші дослідження, появу адвентивних пагонів у окремих експлантів сорту *Suevia* спостерігали на 65-ту добу культивування. Мікропагони кани садової, які зберегли життєздатність на 90-ту добу культивування, сформували 1,25 додаткового пагона на експлант (табл. 3). Через 6 місяців культивування за умови *in vitro* кількість сформованих адвентивних пагонів на експлант збільшилася до 1,6. Але при подальшому культивуванні цей показник залишався незмінним.

Таблиця 3

Зміни морфологічних ознак адвентивних пагонів сорту *Suevia* при культивуванні *in vitro*

Морфологічні ознаки	Тривалість культивування, міс		
	3	6	9
Кількість утворених адвентивних пагонів на експлант, шт.	$1,25 \pm 0,22$	$1,6 \pm 0,27$	$1,6 \pm 0,27$
Збільшення довжини адвентивних пагонів, см	$1,1 \pm 0,22$	$5,38 \pm 0,71$	$7,2 \pm 0,97$
Кількість розгорнутих листків на адвентивний пагін, шт.	–	$1,2 \pm 0,22$	$2,4 \pm 0,27$

Разом із цим, у експлантів сорту *Suevia* при культивуванні *in vitro* збільшилася довжина адвентивних пагонів (рис. 3). При цьому подовження мікропагонів у другому кварталі культивування (4,28 см) було значно більшим, ніж у третьому (1,82 см).

Поряд із цим, спостерігали поступове розгортання листків адвентивних пагонів. Так, на 180-ту добу культивування на 1 адвентивний пагін утворилося 1,2 листка. При подальшому тримісячному культивуванні їх кількість збільшилася у 2 рази.

Наші дослідження показали, що життєздатність експлантів (висічок листків) сорту *Suevia* залежить від режиму освітлення та складу поживного середовища. Так, оптимальним для культивування експлантів як у темряві, так і при освітленні виявилось поживне середовище RG6. Високу життєздатність експлантів відзначали також при культивуванні без освітлення на середовищі RG8 (86%).

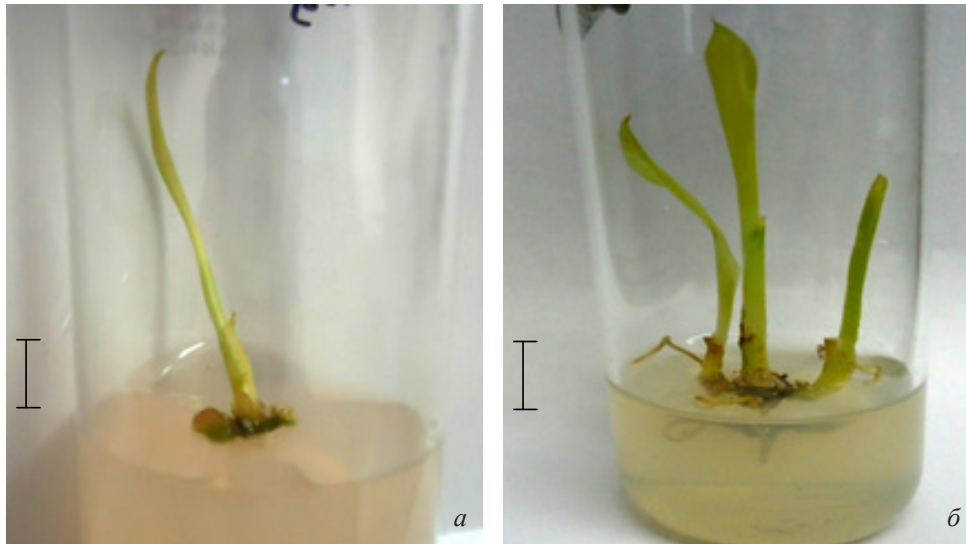


Рис. 3. Адвентивне пагоноутворення канни садової сорту Suevia (масштаб 1 см): а - на 85-ту добу культивування; б - на 210-ту добу культивування.

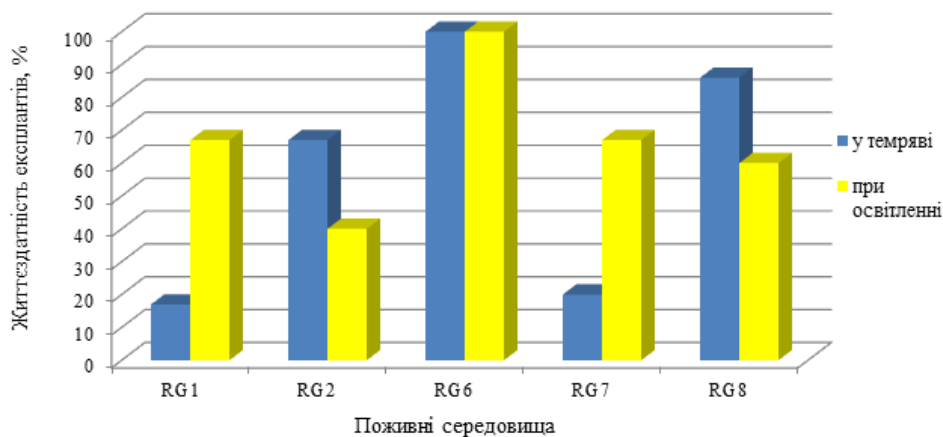


Рис. 4. Життєздатність експлантів (всічок листка) сорту канн Suevia на 14-ту добу культивування залежно від режиму освітлення та концентрацій регуляторів росту в поживному середовищі МС (RG1 – 1,5 БАП+1,5 НОК; RG2 – 1,5 БАП+1,5 ІОК; RG6 – 1,5 мг/л 2,4-Д; RG7 – 6 мкМ ТДЗ; RG8 – 9 мкМ ТДЗ).

Однак при культивуванні у термостаті на поживних середовищах RG1 і RG7, а також при освітленні на середовищі RG2 життєздатність експлантів була низькою (17–40%). При цьому значна частина експонатів потемніла та загинула.

Таким чином, вивчаючи особливості морфогенезу вегетативних бруньок і листових експлантів канни садової, нами відзначено різні шляхи регенерації рослин. На 180-ту добу культивування вегетативних бруньок за умови *in vitro* утворилося 1,6 адвентивного пагона на експлант. **Оптимальним поживним середовищем для підтримки життєздатності листових експлантів сорту Suevia на 14-ту добу культивування є середовище МС, доповнене 1,5 мг/л 2,4-Д.** Показано можливість отримання регенерантів сорту Suevia.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Бутенко Р. Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. М.: Наука, 1964. 272 с.
2. Дашкеев Е. А. Канны в Молдавии. Кишинев: Штиинца, 1975. 65 с.
3. Лакин Г. Ф. Биометрия: учеб. пособие для биол. спец. вузов. М.: Высш. школа, 1990. 352 с.
4. Митрофанова И. В. Соматический эмбриогенез и органогенез как основа биотехнологии получения и сохранения многолетних садовых культур. К.: Аграрна наука, 2011. 344 с.
5. Митрофанова О. В., Михайлов А. П., Чехов А. В. Биотехнологические аспекты освобождения от вирусов и клонального микроразмножения некоторых экономически важных многолетних культур // Сб. научн. трудов Никит. ботан. сада. Ялта, 1997. Т. 119. С. 5–12.
6. Феофилова Г. Ф. Ассортимент и технология выращивания перспективных сортов канны для южных районов страны // Сб. научн. трудов Никит. ботан. сада. Ялта, 1991. Т. 112. С. 41–50.
7. Шолохова Т. А. Изучение морфогенеза вегетативных органов канны садовой (*Canna × hybrida hort.*) в онтогенезе // Вивчення онтогенезу рослин природних і культурних флор у ботанічних закладах і дендропарках Євразії: Матеріали 12 Міжнар. конф. Полтава, 2000. С. 355–357.
8. Borroto-Fernandez E. G., Maghuly F., Fellner A., Laimer M. Determination of viral infections in an austrian collection of *Canna indica* // J. of Plant Diseases and Protection. 2008. Vol. 3. N 115. P. 102–103.
9. Hosoki T., Sasaki H. *In vitro* propagation of *Canna edulis* Ker. by longitudinal shoot-split method // Plant Tissue Culture Letters. 1991. Vol. 3. N 8. P. 175–178.
10. Kromer K. Biological activity of endogenous and influence of exogenous growth regulators on *Canna indica* regeneration *in vitro* // Acta Hort. 1979. N 91. P. 295–300.
11. Kromer K., Kukulczanka K. *In vitro* cultures of meristem tips of *Canna indica* // Acta Hort. 1985. N 167. P. 279–286.
12. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* 1962. Vol. 15. N 3. P. 473–497.

Стаття: надійшла до редакції 14.09.12

доопрацьована 18.10.12

прийнята до друку 22.10.12

**INDUCTION OF CANNA GARDEN (*CANNA × HYBRIDA HORT.*)  
MORPHOGENESIS *IN VITRO***

**A. Tefvik, I. Mitrofanova**

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

Regeneration *in vitro* of microshoots from vegetative buds of canna garden (*Canna × hybrida hort.*) cv. Suevia has been induced. Peculiarities of vegetative buds differentiation

and leaf explants viability on different culture medium have been shown.

*Keywords:* canna, morphogenesis, vegetative bud, leaf, culture *in vitro*.

## ИНДУКЦИЯ МОРФОГЕНЕЗА КАННЫ САДОВОЙ (*CANNA* × *HYBRIDA HORT.*) В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

А. Тевфик, И. Митрофанова

*Никитский ботанический сад – Национальный научный центр,*

*НААН Украины*

*г. Ялта, пгт Никита 98648, АР Крым, Украина*

*e-mail: in\_vitro@ukr.net*

Индукцирована регенерация *in vitro* микропобегов из вегетативных почек канны садовой (*Canna* × *hybrida hort.*) сорта Suevia. Показаны особенности развития микропобегов, а также жизнеспособность листовых эксплантов на различных питательных средах.

*Ключевые слова:* канна, морфогенез, вегетативная почка, лист, культура *in vitro*.



**THE ANTIOXIDANT EFFECT OF NATURAL POLYPHENOLIC COMPLEXES  
OF GRAPE WINE IN THE RAT PERIPHERAL NERVOUS SYSTEM UNDER  
STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETES MELLITUS**

**A. Gnatush<sup>1</sup>, V. Drel<sup>1</sup>, N. Hanay<sup>2</sup>, A. Yalaneckyy<sup>2</sup>, V. Mizin<sup>3</sup>, N. Sybirna<sup>1</sup>**

*<sup>1</sup>Ivan Franko National University of Lviv  
4, Hrushevskiyi St., Lviv 79005, Ukraine  
e-mail: gnatuk88@ukr.net*

*<sup>2</sup>National Institute for Vine and Wine "Magarach"  
31, Kirov St., Yalta, Crimea 98600, Ukraine*

*<sup>3</sup>Crimean University for the Humanities  
2, Sevastopolska St., Yalta, Crimea 98635, Ukraine*

It has been established, that the specimen of natural polyphenols complexes of grape wine contribute to the normalization of the antioxidant enzyme system (superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione reductase) of the sciatic nerves, dorsal root ganglia and spinal cord of rats, whose activity **is disrupted as a result of oxidative-nitrosative stress** development of which is characteristic for diabetes mellitus. Significant increase in body weight of control rats and animals with diabetes under consumption of specimen by 36% and 18% **accordingly has been established. The results indicate the perspectives** of application of specimen of natural polyphenols complexes of grape wine for the prevention and treatment of diabetes mellitus complications.

*Keywords:* diabetes mellitus, oxidative-nitrosative stress, the specimen of natural polyphenols complexes of grape wine, diabetic neuropathy, antioxidant protection.

Diabetes mellitus (DM) - is one of the most common, not infection diseases, which are characterized by the development of micro- and macrovascular complications that can often lead to disability. According to World Health Organization, in 2010 for over 290 million people suffer from diabetes. In Ukraine more than 1 million patients with DM are registred.

In 40% of patients with diabetes that control blood glucose level and take antidiabetic drugs chronic complications in the peripheral nervous system are developed [16]. Diabetic neuropathy (DN) is one of the most common complications of diabetes [9, 10, 24].

Hyperglycemia is the main established pathogenetic factor for the development of DM, which occurs against the background of insulin deficiency, which is determinant of the diagnosis of type 1 DM. The violation of the electron transport chain that leads to the overproduction of superoxide anion, which, interacting with other reactive oxygen species (ROS), activates free radical oxidation leads to oxidative stress (OS) [11]. OS, in its turn, leads to the disruption of cellular homeostasis, accumulation of molecules with altered structure, damages the structure of lipids, proteins and DNA. In response to DNA damage the nuclear enzyme poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1) is activated. Poly-ADP-ribosilation of numerous nuclear proteins takes place causing significant energy depletion of cells with the participation of the PARP-1. Under certain conditions, it can cause cell death [23] (it is proved that PARP-1 can poly-ADP-ribosilate glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (the enzyme of glycolysis) that leads to the inhibition of glycolytic glucose utilization at the level of glyceraldehyde 3-phosphate formation, with

subsequent accumulation of intermediate products of glycolysis). This leads to the activation of a number of signaling and metabolic pathways. Such changes in metabolism (accumulation of fructose, sorbitol, methylglyoxal, advanced glycation end products etc) is a trigger for the development of DN. Primary metabolic changes occurring in nerve fibers in the beginning cause disruption of their functions, and eventually lead to changes in their structure. In particular, the activation of the polyol pathway in nervous tissue with the characteristic accumulation of sorbitol and fructose which consistently causes a decrease in activity of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase and the level of mioinozytol, leads to the retention of  $\text{Na}^+$  and water, swelling of the myelin sheath, its further demyelination and reduction of motor and sensory nerve conduction velocity of the peripheral nervous system [10].

In parallel, there is total destruction of the organism by ROS that in addition to DNA damage, causes damage of axons membrane structures of peripheral nerve fibers and the results in damage of the structures and functions of nerve cells. In addition to the direct damaging effects, accumulation of ROS affects the energy metabolism in neurocytes and development of endoneurial hypoxia. Such a comprehensive total damage causes demyelination and degeneration of nerve fibers, reduces their functional activity [10].

Imbalance between production of free radicals and the activity of enzymes of antioxidant system which is reduced under DM is made by significant contribution into formation of late diabetic complications [4]. Strengthening of the work of antioxidant system by exogenous antioxidants has a protective effect on all body systems and reduces the "area of damage".

Researches into natural antioxidant - polyphenol complexes of grape wine, including proanthocyanidins, derived flavan-3-ols and several other derivatives of flavonoids which are effective in preventing cardiovascular diseases, have become promising recently [19]. It is known that polyphenols of grape wine are able to interact with plasma proteins and cellular elements of blood, prevent premature oxidation of their molecular complexes, which occurs under the oxidative and nitrative stress. Significant bactericidal and antiviral effect of the given substances has been shown [12]. The protective effects of the polyphenols complexes of grape wine on some systems and organs under oxidative stress and during the metabolic syndrome have been detected [20, 21].

As protective properties of natural grape polyphenol complexes under streptozotocin-induced DM and their effect on the enzymic antioxidant system during the development of neuropathy have been investigated very little, the goal of our work has been to investigate the protective antioxidant effect of polyphenol complexes of grape wine on the enzymatic antioxidant system in the tissues of peripheral nervous system of Wistar rats under streptozotocin-induced diabetes mellitus.

### Materials and methods

All animal care and procedures were carried out in accordance with the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes Directive of 24 November 1986 (86/609/ECC) and were approved by Bioethics Committee of Ivan Franko National University of Lviv Protocol for Animal Studies, Lviv, Ukraine. Male Wistar rats, of 190–210 g body weight, were fed a standard rat chow and had access to water ad libitum.

The specimen of natural polyphenols complexes of grape wine (speciment) was received by evaporation of red wine in rotary evaporators LABOROTA 4000 (Heidolph, Germany) at 36 °C. Amount of polyphenols determined by the Lowry method.

The red wine was made by the classical technology from Cabernet Sauvignon (clone C337/S04C3) grapes and contained phenolic compounds 2309.31 mg/l, proanthocyanidines 936.0 mg/l and pigment polymers 443.8 mg/l.

Wistar rats were separated into four groups of seven animals each: Group 1 – normal untreated control; Group 2 – polyphenols treated; Group 3 – STZ treated and Group 4 – polyphenol and STZ treated. The STZ treatment was a single i.p. injection of 50 mg/kg body weight. The specimen treatment was an oral dose (300 ml/70 kg body weight/day) that constituted 23.5 mg/kg body weight/day, administered daily for 2 weeks prior to the STZ injection and daily for 4 weeks after the STZ injection. Group 2 received specimen of natural polyphenols complexes of grape wine for 6 weeks. Blood samples for glucose measurements were taken from the tail vein, 72 h after the STZ injection and the day prior to the study termination. All the rats with blood glucose of 14 mmol/l or more were considered diabetic. The level of glucose in the blood was determined by Aviva Accu Check glucose meter.

The animals were sedated by CO<sub>2</sub> and immediately killed by cervical dislocation. Selected tissues were frozen immediately in liquid nitrogen. Tissues homogenization was carried out using hand homogenizers in the presence of 0.1 M phosphate buffer (1:10 wt/vol) pH 7.0 on the ice. Homogenized samples of spinal cord were centrifuged for 30 min at speed of 14000 g at 4 °C. After removal of a thin lipid layer recentrifuged for 15 min at 10000 g at 4 °C. Samples of sciatic nerves and dorsal root ganglia were centrifuged for 20 min at 10000 g at 4 °C.

The activity of superoxide dismutase (SOD) was determined by Chevari method [8], catalase (CAT) – by the Corolyk method [3], glutathione peroxidase (GPO) – by Moin method [5], glutathione reductase (GR) – by Goldberg method [14]. MDA level was analyzed with 2-thiobarbituric acid by Timyrbulatov method [7]. The concentration of protein was determined by Lowry method [18]

Data are expressed as mean ± SD. Differences among experimental groups were determined by ANOVA (analysis of variance), and the significance of between-group differences was assessed by Student–Newman–Keul’s multiple range test. Significance was defined at  $P \leq 0.05$ .

### Results and discussion

At the end of the experiment, the final body weight of control rats and rats consuming the specimen of natural polyphenol complexes of grapes grew by 36%, compared with the body weight of animals before the experiment (Table 1). In contrast to the control groups, the body weight of rats with diabetes slightly decreased. At the same time the body weight of rats with diabetes which consumed the specimen increased by 18%. In groups of rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus this phenomenon can be explained by the fact that diabetes is characterized by “overproduction” of urea. The latter, due to osmotic diuresis, was excreted from the body with the necessary for this amount of water and electrolyte K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> ions [15]. This process leads to dehydration, which further increases due to the induction of the release of free fatty acids from adipocytes and the followed by conversion to ketone bodies (acetoacetate and β-hydroxybutyrate) leading to ketoacidosis [1]. Ketone bodies “provoke” an increase in osmotic diuresis and loss of electrolytes [17]. Such changes of the level in body water can help to affect the general metabolism and body weight.

The indices of body weight in groups of rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus that consumed the specimen significantly increased to control values. Obtained data are consistent with our previous results of using red wine [1, 2]. Unfortunately, the polyphenols complexes of grape wine in studied concentrations do not have corrective effect on blood glucose both in control and groups with DM, because the concentration of glucose in the blood of infected animals has increased throughout the experiment (Table 1).

Possibly, the protective effect of polyphenols complexes is detected by reducing the level of ketone bodies on the stage of their utilization, or excretion from the body system of glomeru-

lus and tubules of the kidneys that is followed by stimulation of reabsorption of electrolytes and water from primary urine [1].

Table 1

Body weight and blood glucose concentration in control and diabetic rats with or without polyphenol speciment consumption (M±m. n=5-7)

indicators Rodent group	Blood glucose (mmol/l)		Body weight (g)	
	Initial §	Final	Initial §	Final
C	5.72±0.46	6.2±0.51	206±16.1	279±19.6
C+S	5.92±0.16	6.3±0.19	202±17.35	276±20
D	18.54±0.89**	26.82±2.23**	200±6.78	209±30**
D+S	20±0.29**	26.88±1.87**	198±6.41	234±10.47*, #

**Comments.** C – control; C+S – control+ speciment of polyphenols; D – diabetic; D+S – diabetic+ speciment of polyphenols. \*, \*\* P<0.05 and < 0.01 against the control group. # P<0.05 against the control and diabetic group without polyphenol speciment consumption. § – 3rd day after induction of diabetes.

The presence of increased of the level of ketone bodies is directly connected with the intensification of free radical oxidation in the body that is typical for DM [22]. The consequences that come, depend on various factors, but primarily, they are determined by the coordinated functioning of enzymes of antioxidant system, among which the main role belongs to superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione reductase.

Under diabetes mellitus the activity of enzymes of antioxidant system in the tissues of the peripheral nervous system has decreased, that indicates to the OS and the development of neuropathy in this tissue [13].

The activity of SOD in the group of rats with DM has decreased (by 40%, 25.8% and 32% in the sciatic nerve, dorsal root ganglia and spinal cord, respectively) (Fig. 1).

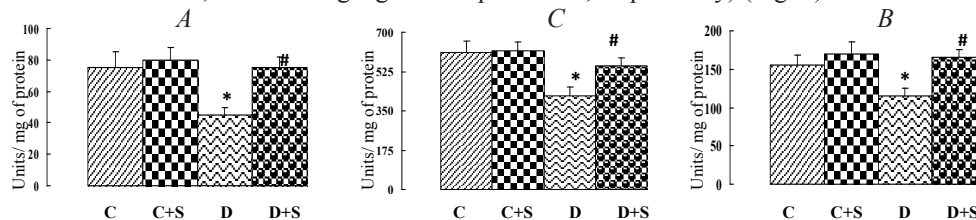


Fig. 1. The activity of superoxide dismutase in peripheral nervous system: A – in sciatic nerve, B – in spinal cord, C – in dorsal spinal ganglia. C – control; C+S – control + speciment of polyphenols; D – diabetic; D+S – diabetic + speciment of polyphenols, (M ± m, n = 5-7). \*P<0.05 compared with controls. #P<0.05 compared with diabetic rats without speciment of polyphenols consumption.

Decrease in the activity of SOD is directly associated with the accumulation of superoxide anion, which is typical for most tissues under DM conditions. Violations of the mechanism of utilization of this anion leads to the formation of other oxidant – peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>), which interacting with proteins, nitrite them by tyrosine, altering their biological properties [25]. Besides the peroxynitrite, the formation of products of protonation of nitric oxide (NO<sup>+</sup>, NO<sup>•</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NO<sub>2</sub>), which are especially dangerous for the enzymes, because they can modify amino acid residues of proteins that can be manifested in the decrease of the activity of SOD has been reported. The direct interaction of NO with Cu<sub>2</sub><sup>+</sup> in the active center of SOD causes inhibition of it activity. It is complemented by the non enzymatic glycosylation of amino acid residues, part of which is included in the active center of the enzyme, which also affects the superoxide dismutase activity.

Under consumption of speciment of natural polyphenols complexes of grape wine by the rats treated by DM the activity of SOD in the sciatic nerve, dorsal root ganglia and spinal cord

have been respectively increased by 67.6%, 43.5% and 32.5% compared with a group of diabetic rats without consumption of specimen (Fig. 1). It is caused by antioxidant properties of natural polyphenols complexes of grape wine that are scavengers of ROS. Polyphenols are able to “weight down” on a newly created ROS, particularly superoxide anion, which reduces the formation of dangerous compounds, including peroxynitrite [1].

Under DM, catalase activity has decreased in all tissues of the peripheral nervous system: the sciatic nerve - by 27% in the spinal cord by 20.5% and dorsal ganglia by 38.6% compared to controls. Specimen consumption did not affect catalase activity in nondiabetic rats. A decrease in the activity of this enzyme can be explained by similar mechanisms to SOD. Additionally, nitric oxide can directly contact with ferum-porphyrine complex of catalase, forming nitric derivatives. The appearance of heme-NO complexes prevents binding of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the active center of catalase, and hence its expansion. Nitrite ions are also able to directly communicate with ferum of heme of enzyme that can cause the decrease in the activity of the enzyme [20].

Under consumption of the specimen by the rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus, the activity of CAT increase. Particularly, in the sciatic nerve by 43.7%, in the spinal cord and dorsal ganglia of 24.2% and 44% respectively (Fig. 2). It almost corresponds to the values of activity enzyme in the control group. The use of natural antioxidants leads to a decrease in free-flow oxidation and, as a result - increases the activity of the enzyme. This mechanism is common to all enzymes of antioxidant system.

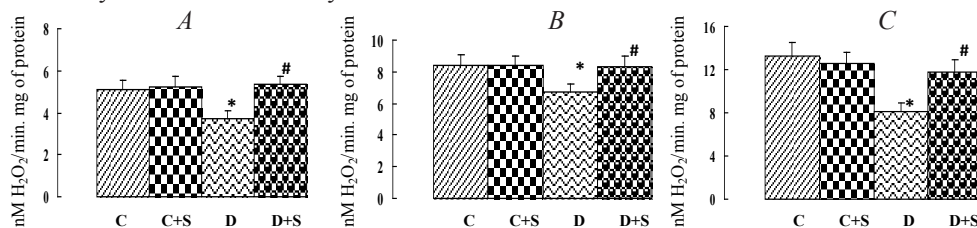


Fig. 2. The activity of catalase in peripheral nervous system: *A* – in sciatic nerve, *B* – in spinal cord, *C* – in dorsal spinal ganglia. C – control; C+S – control+ specimen of polyphenols; D – diabetic; D+S – diabetic+ specimen of polyphenols, ( $M \pm m$ ,  $n = 5-7$ ). \* $P < 0.05$  compared with controls. # $P < 0.05$  compared with diabetic rats without specimen of polyphenols consumption.

The work of glutathione system (GS) is especially important under OS. GS effectively protects cells from the effects of ROS and therefore the violation of its normal work - serious consequences for the organism have been observed. Glutathione system eliminates ROS directly, or as the “second line of defense” after SOD and CAT, complements and completes the work of the “first line” and correctes its errors. [6].

Apart from CAT, the neutralization of hydrogen peroxide is also carried out by GPO, whose affinity to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is significantly higher than in catalase. Under DM the activity of GPO and GR in the sciatic nerve, spinal cord and dorsal ganglia is reduced by 33%, 34.7%, 30% and 37.2%, 30.5%, 15%, respectively (Fig. 3). GPO activity depends on the content of reduced glutathione, the level of which is supported by intracellular concentration of GR. As for glutathione reductase functioning is determined by the level of reduced nicotinamide coenzymes. The energy depletion of the body, which causes deficiency of energy substrates that has directly proportional effect on the efficiency of protective systems, has been observed under DM. There is no effective protection without enough quantity of energy substrates.

Under consumption of the specimen of natural polyphenols complexes of grape wine has been observed the recovery of activity of GPO and GR in the sciatic nerve, spinal cord and dorsal

ganglia by 33.3%, 60.5%, 35.8% and 24.3%, 43.7%, 17%, respectively, compared with animals with DM without specimen consumption (Fig. 3). This increase in the activity of the HR can be explained by improvement of the energy of the body that may be caused by the protective effect of natural polyphenols complexes.

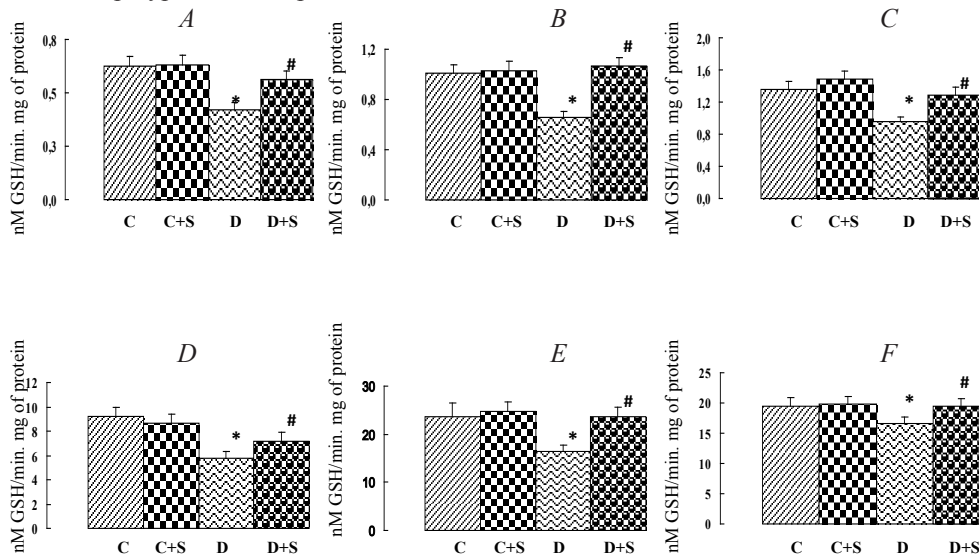


Fig. 3. The activity of antioxidant glutathione system in peripheral nervous system: *A* – activity GPO in sciatic nerve, *B* – activity GPO in spinal cord, *C* – activity GPO in dorsal spinal ganglia, *D* – activity GR in sciatic nerve, *E* – activity GR in spinal cord, *F* – activity GR in dorsal spinal ganglia, ( $M \pm m$ ,  $n = 5-7$ ). \* $P < 0.05$  compared with controls. # $P < 0.05$  compared with diabetic rats without specimen of polyphenols consumption.

Thus, change of the activity of antioxidant enzymes system underlies in the neurodegenerative processes that occurs in the peripheral nervous system and is indicator of DN. Evidence of this is the accumulation of primary and secondary products of oxidation. The one of the main marker of lipid peroxidation is the presence of sulfocarbaniide-positive products. Thus, under DM, their concentrations has increased in the sciatic nerve by 85%, in the spinal cord and in the dorsal root ganglia by 59.3% and 66.5%, respectively (Fig. 4). The level of this product has decreased by 37.7%, 25% and 35.3% respectively under consumption of specimen.

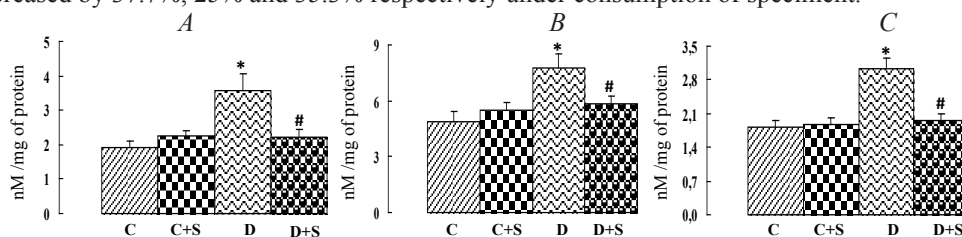


Fig. 4. TBK-positive content of LPO products in peripheral nervous system: *A* – in sciatic nerve, *B* – in spinal cord, *C* – in dorsal spinal ganglia. C – control; C+S – control+ specimen of polyphenols; D – diabetic; D+S – diabetic+ specimen of polyphenols, ( $M \pm m$ ,  $n = 5-7$ ). \* $P < 0.05$  compared with controls. # $P < 0.05$  compared with diabetic rats without specimen of polyphenols consumption.

Thus, natural polyphenols complexes of grape wine have a significant antidiabetic effect on the level of the whole organism: they protect it from the dehydration, by the way of increase in the activity of antioxidant enzyme system in the tissues of peripheral nervous system. Particularly, the activity of SOD, CAT, GPO and GR in groups with DM with specimen consumption normalizes to control values. The level of sulfocarbaniide-positive products decreases to control values.

Biochemical mechanisms of action of natural polyphenol complexes of grape wine are the subject of further research, but certainly these natural complexes can be used in the treatment of complications of diabetes and the development of new antidiabetic drugs.

*We express our sincere gratitude to the Western Ukrainian Biomedical Research Center (WUBMRC, 2011-2012), for a grant provided to conduct our researches.*

#### REFERENCES

1. Дрель В. Р., Гнатуш А. Р., Яланецький А. Я. та ін. Поліфеноли виноградних вин запобігають накопиченню нітротирозину та активації PARP-1 у сітківці ока шурів із стрептозотозиніндукованим цукровим діабетом // Медична хімія. 2010. Т. 1. № 42. С. 25-33.
2. Дрель В. Р., Гнатуш А. Р., Яланецький А. Я. та ін. Протекторна дія виноградних вин за нітрозативного стресу, зумовленого експериментальним цукровим діабетом // Укр. біохім. журнал. 2010. Т. 82. № 1. С. 108-116.
3. Королюк М. А., Иванова И. Г., Майорова И. Г. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. 1988. № 1. С. 16-18.
4. Меньшикова Е. Б., Ланкин В. З., Зенков Н. К. и др. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты. Москва, 2006. С. 411-413.
5. Моин В. М. Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах // Лаб. дело. 1986. № 12. С. 124-126.
6. Сибірня Н. О., Маєвська О. М., Барська М. Л. Дослідження окремих біохімічних показників за умов оксидативного стресу. Львів: Видавничий центр ЛНУ ім. І. Франка, 2006. 60 с.
7. Тимирбулатов Р. А., Селезнев Е. И. Метод повышения интенсивности свободнорадикального окисления липидсодержащих компонентов крови и его диагностическое значение // Лаб. дело. 1981. № 4. С. 209-211.
8. Чевари С.И, Андял Т. Д., Штиренгер Д. А. Определение антиоксидантных параметров крови и их диагностическое значение в преклонном возрасте // Лаб. дело. 1991. № 10. С. 9-13.
9. Boulton A., Malik R., Arezzo J. et al. Diabetic Somatic Neuropathies // Diabetes Care. 2004. № 27. P. 1458-1486.
10. Boulton A., Vinik A., Arezzo J. Diabetic neuropathies: a statement by the American Diabetes Association // Diabetes Care. 2005. № 28. P. 956-962.
11. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism // Diabetes. 2005. Vol. 54. № 6. P. 1615-1625.
12. Daglia M., Papetti A., Grisoli P. et al. Antibacterial activity of red and white wine against oral streptococci // Agric. Food Chem. 2007. Vol. 55. № 13. P. 5038-5042.
13. Feldman E. Oxidative stress and diabetic neuropathy: a new understanding of an old problem // J. Clin. Invest. 2003. Vol. 111. № 4. P. 431-433.
14. Goldberg D., Spooner R., Bergmeyer H. Methods of Enzymatic Analysis, 3rd ed // Verlag Chemie. 1983. Vol. 5. № 3. P. 258-265.
15. Gouni-Berthold I, Krone W. Diabetic ketoacidosis and hyperosmolar hyperglycemic State // Med. Klin. (Munich). 2006. Vol. 101. № 1. P. 100-105.

16. King H., Aubert R. E., Herman W. H. Global burden of diabetes, 1995–2025: prevalence, numerical estimates, and projections // *Diabetes Care*. 1998. Vol. 21. № 9. P. 1414–1431.
17. Kitabchi A., Umpierrez G., Fisher J., et al. Thirty years of personal experience in hyperglycemic crises: diabetic ketoacidosis and hyperglycemic hyperosmolar state // *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2008. Vol. 93. № 5. P. 1541–1552.
18. Lowry O., Rosenbraugh M., Pori A. Protein measurement with the Folin phenol reagent // *Biol. Chem.* 1951. Vol. 193. № 1. P. 265–275.
19. Marfella R., Cacciapuoti F., Siniscalchi M. et al. Effect of moderate red wine intake on cardiac prognosis after recent acute myocardial infarction of subjects with Type 2 diabetes mellitus // *Diabet Med*. 2006. Vol. 23. № 9. P. 974–981.
20. Montilla P., Barcos M., Munoz M. et al. Red wine prevents brain oxidative stress and nephropathy in streptozotocin-induced diabetic rats // *Biochem. Mol. Biol.* 2005. Vol. 38. № 5. P. 539–544.
21. Napoli C., Balestrieri M., Sica V. et al. Beneficial effects of low doses of red wine consumption on perturbed shear stress-induced atherogenesis // *Heart Vessels*. 2008. Vol. 23. № 2. P. 124–133.
22. Naso F., Dias A., Porawski M. et al. Hepatic nitrosative stress in experimental diabetes // *Experimental Diabetes Research*. 2011. P. 1–6.
23. Pacher P., Beckman J. S., Liaudet L. Role of nitrosative stress and peroxynitrite in the pathogenesis of diabetic complications. Emerging new therapeutical strategies // *Physiol. Rev.* 2007. Vol. 87. № 1. P. 315–424.
24. Sumner C., Sheth S., Griffin J. et al. The spectrum of neuropathy in diabetes and impaired glucose tolerance // *Neurology*. 2003. № 60. P. 108–111.
25. Viktor Drel, Nataliya Sybirna. Protective effects of polyphenolics in red wine on diabetes associated oxidative/nitrate stress in streptozotocin-diabetic rats // *Cell Biol. Int.* 2010. 34. P. 1147–1153.

Стаття: надійшла до редакції 23.08.12

доопрацьована 24.10.12

прийнята до друку 29.10.12

**ПРИРОДНІ ПОЛІФЕНОЛЬНІ КОМПЛЕКСИ ВІНОГРАДУ ЗАПОБІГАЮТЬ  
РОЗВИТКОВІ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕСУ В ТКАНИНАХ ПЕРИФЕРИЧНОЇ  
НЕРВОВОЇ СИСТЕМИ ЩУРІВ ЗІ СТРЕПТОЗОТОЦИН-ІНДУКОВАНИМ  
ЦУКРОВИМ ДІАБЕТОМ**

**А. Гнатуш<sup>1</sup>, В. Дрель<sup>1</sup>, Н. Ганай<sup>2</sup>, А. Яланецький<sup>2</sup>,  
В. Мізін<sup>3</sup>, Н. Сибірна<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Львівський національний університет імені Івана Франка,  
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна  
e-mail: gnatuk88@ukr.net

<sup>2</sup>Національний інститут винограду та вина “Магарач”,  
вул. Кірова, 31, Ялта, АР Крим 98600, Україна

<sup>3</sup>Кримський державний гуманітарний університет  
вул. Севастопольська, 2, Ялта, АР Крим 98635, Україна

Встановлено, що препарат природних поліфенольних комплексів винограду



сприяє нормалізації роботи ензимів системи антиоксидантного захисту (супероксиддисмутази, каталази, глутатіонпероксидази і глутатіонредуктази) сідничного нерва, дорсальних спинномозкових гангліїв та спинного мозку щурів, чия активність порушується унаслідок оксидативно-нітративного стресу, розвиток якого є характерним для цукрового діабету 1-го типу. Встановлено достовірне зростання маси тіла контрольних щурів і тварин із цукровим діабетом, що споживали препарат поліфенольних комплексів винограду на 36 і 18% відповідно. **Отримані результати свідчать про перспективність застосування препаратів природних поліфенольних комплексів винограду для профілактики та лікування ускладнень цукрового діабету 1-го типу.**

*Ключові слова:* цукровий діабет, оксидативно-нітративний стрес, препарат природних поліфенольних комплексів винограду, діабетична нейропатія, антиоксидантний захист.

## АНТИОКСИДАНТНИЙ ЕФФЕКТ ПРИРОДНИХ ПОЛИФЕНОЛЬНИХ КОМПЛЕКСОВ ВИНОГРАДА В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ КРЫС СО СТРЕПТОЗОЦИН-ИНДУЦИРОВАННЫМ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ

А. Гнатуш<sup>1</sup>, В. Дрель<sup>1</sup>, Н. Ганай<sup>2</sup>, А. Яланецкий<sup>2</sup>,  
В. Мизин<sup>3</sup>, Н. Сибирная<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Львовский национальный университет имени Ивана Франко,  
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина  
e-mail: gnatik88@ukr.net

<sup>2</sup>Национальный институт винограда и вина "Магарач",  
ул. Кирова, 31, Ялта, АР Крым, 98600, Украина

<sup>3</sup>Крымский государственный гуманитарный университет  
ул. Севастопольская, 2, Ялта, АР Крым 98635, Украина

Установлено, что препарат природных полифенольных комплексов винограда способствует нормализации работы энзимов системы антиоксидантной защиты (супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза и глутатионредуктаза) седалищного нерва, дорсальных спинномозговых ганглиев и спинного мозга крыс, чья активность нарушается вследствие оксидативно-нитративного стресса, развитие которого характерно для сахарного диабета 1-го типа. Установлено достоверное возрастание массы тела контрольных крыс и животных с сахарным диабетом, потреблявших препарат полифенольных комплексов винограда на 36 и 18% соответственно. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности **применения препаратов** природных полифенольных комплексов винограда для профилактики и лечения осложнений сахарного диабета 1-го типа.

*Ключевые слова:* сахарный диабет, оксидативно-нитративный стресс, препарат природных полифенольных комплексов винограда, диабетическая нейропатия, антиоксидантная защита.

## DEVELOPMENT AND EVALUATION OF HPLC METHOD FOR ARGININE ASSAY IN BIOLOGICAL SAMPLES

O. Chen<sup>1,2</sup>, M. Barska<sup>1</sup>, N. Sybirna<sup>2</sup>, O. Stasyk<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Cell Biology of NAS of Ukraine  
14–16, Drahomanov St., Lviv 79005, Ukraine*

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

*e-mail: stasyk@cellbiol.lviv.ua*

We developed a method for monitoring L-arginine content in cell culture media, human blood plasma and tumor cells lysates using reverse-phase high-performance liquid chromatography (HPLC) with phenyl isothiocyanate (PITC) derivatization. The biological fluids were deproteinized by acetonitrile solvent. Tumor cells were homogenized by 60% aqueous acetonitrile quenching solution. PITC solution was used as a derivatization reagent and a gradient elution was carried out. The peak of amino acid L-arginine was completely separated in all tested biological samples. The linearity of the assay for L-arginine ranged from 5 to 2500  $\mu\text{mol/L}$ . The method is characterized by its simplicity, the use of relatively inexpensive Supelco C<sub>18</sub> column, simple gradient and small amount of solvents needed for the analysis. The developed and validated procedure is a reliable analytical method suitable for routine arginine detection in scientific laboratories.

*Keywords:* amino acid analysis, HPLC, L-Arginine, PITC.

Amino acid analysis is an important technique for detection of different disorders in organism. Amino acid arginine and its metabolites play an important role in physiology, including cellular proliferation, vasodilation, neurotransmission, calcium release, and immunity [21]. Arginine is involved in the synthesis of a wide range of peptides and proteins, production of nitric oxide (NO), citrulline, ornithine, urea, creatine, polyamines, proline, agmatine and other biological compounds via the citrulline – NO pathway and the urea cycle [15]. Recent studies showed that arginine levels were significantly altered in the cerebrospinal fluid (CSF) of patients with Alzheimer's disease (AD) and in different types of cancer [14, 20].

Metabolic enzymotherapy based in arginine starvation is a promising approach for cancer treatment effective for growth inhibition and decreasing viability of human hepatocellular carcinoma, malignant melanoma, renal carcinoma and leukemic cells [2, 8, 13, 19, 20]. Recombinant arginine-degrading enzymes are now in phase II–III of clinical trials and have demonstrated strong anticancer activities [1, 13]. Therefore, it is important for the ongoing scientific research and in clinical practice to develop a simple and accurate analytical method for analysis arginine level in cultured cells, biological fluids or tissues.

Since the end of 1980s, the classical ion-exchange chromatographic method for the analysis of amino acids has been replaced by reversed-phase high-performance liquid chromatographic (HPLC) methods that are faster, more sensitive, simple in instrumentation and inexpensive. One of the two most widely used HPLC methods involves pre-column derivatization of the amino acids with phenyl isothiocyanate (PITC) [3, 12]. Different derivatization reagents were utilized that included 9-fluorenylmethyl chloroformate (FMOC-Cl), ortho-phthalaldehyde (OPA), phenyl isothiocyanate (PITC), 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene, 1-fluoro-2,4-dinitrophenyl-5-L-alanine amide, and dansyl chloride [7, 10, 16–18]. Each of these reagents has specific advantages and

limitations [6, 11]. Only PITC, FMOC-Cl, and OPA are currently used for analysis of amino acids, but PITC derivatization methods are less sensitive as compared with those based on fluorimetric detection; OPA does not react with secondary amino acids and FMOC-Cl reacts rapidly [6]. During last years, many researchers used the “Waters Pico Tag” system for the quantification of amino acids in food and biological samples with PITC derivatization.

In this study we describe a modified HPLC method that utilizes derivatization with phenyl isothiocyanate for the analysis of L-arginine in Supelco LC18 column. Previously, we analysed amino acids by pre-column derivatization with dabsyl chloride (DABS) in Supelco LC18 column. But this method gave poor yields and resolution of amino acid peaks such as arginine. Next, we used alternative derivatization procedure with PITC reagent and derivatives separated in Supelco LC18 column. Our method is overall similar to Cohen’s “Waters Pico Tag” system and we proposed it for analyzing L-arginine content in different biological samples such as cell culture medium, tumor cells extracts and blood plasma.

### Materials and methods

#### *Reagents*

HPLC grade acetonitrile, methanol, triethylamine (TEA), PITC, and amino acids were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). HPLC-grade water was used from a Milli-Q water system (Millipore, Bedford, MA, USA). Amino acid standards were produced freshly by diluting the stock of standard solutions with ultra-pure water for each assay. The concentration series of each standard were made at 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000  $\mu\text{mol/L}$ , respectively along a blank control sample. The qualitative analysis was conducted using the method of retention time and the quantitative analysis was performed using the method of external standardization. The calibration curves were evaluated by plotting the L-arginine peak area values against the respective concentrations of L-arginine standards.

#### *Cell culture and amino acids extraction*

Monolayer human melanoma SK-MEL-28 and suspension leukemic Jurkat cells were cultured in Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium (DMEM) or RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 300 mg/L glutamine and 50  $\mu\text{g/ml}$  gentamicine solution. Cell cultures were maintained in a humidified atmosphere of 5%  $\text{CO}_2$  at 37°C. For intracellular arginine analysis, cells were washed three times in ice-cold PBS and frozen or lysed. Briefly,  $5 \times 10^6$  cells in dish were lysed in 200  $\mu\text{l}$  of 60% ice-cold acetonitrile quenching solution, vortexed and incubated on ice for 10 min. The extracts were centrifuged at 13,000 x g for 15 min and 50  $\mu\text{l}$  of supernatant was used for amino acids derivatization.

#### *Sample Preparation*

Normal blood samples were collected in heparinized tubes and immediately centrifuged at 3000 rpm for 10 min to separate the plasma. Before analysis, plasma samples (50-100  $\mu\text{l}$ ) were deproteinized with 200-400  $\mu\text{l}$  of **100 % acetonitrile, containing 0.2 mmol/l D-nor-valine as internal standard**. The 200  $\mu\text{L}$  of supernatant was transferred into another tube and evaporated for derivatization. Cell culture medium – RPMI-1640 with 10 % FBS deproteinized analogously to blood samples.

#### *Pre-column derivatization*

**200  $\mu\text{L}$  of each deproteinized biological sample and 50  $\mu\text{L}$  of arginine standard were transferred** into another tube and dried under vacuum. Next, the dried matrix of samples was dissolved in 25  $\mu\text{L}$  of a 2:2:1 mixture of ethanol : water : TEA (v/v), by vortexing and then evaporated. Derivatization was performed by adding into tube 25  $\mu\text{L}$  of a mixture of 7:1:1:1 ethanol : water :

TEA : PITC (v/v), which was fresh-made and mixing in vortex. The reaction between PITC and the sample to produce phenylthiocarbamyl (PTC) amino acids was allowed to continue for 20 min at room temperature. Samples were then completely dried-out under vacuum and stored in a freezer.

#### *Apparature and chromatographic conditions*

The HPLC system from PerkinElmer Series 200 (PerkinElmer, USA) was used in this work. The system consisted of binary pump, vacuum degassator, variable-wavelength uv-visible range detector (UV/VIS) and TotalCrom analytical software. The separation of PITC-amino acids was performed using a 3  $\mu\text{m}$  Supelcosil LC-18 column (150 mm x 4.6 mm i.d.) protected with a 5  $\mu\text{m}$  Supelcosil LC-18 guard column (20 mm x 4.6 mm i.d.) (Supelco, Bellefonte, PA).

The PITC amino acids were separated using a multistep linear gradient with two phases. The mobile phase A consisted of 70 mM sodium acetate buffer with 2.5 vol. % acetonitrile (pH 6.5), while the mobile phase B consisted of 15% methanol, 45% acetonitrile, and 40% water. Prior to the use, the mobile phase solutions were filtered using 0.40- $\mu\text{m}$  membrane. The flow rate was 1 mL/min throughout, and the gradient consisted of the following profiles: 100% A at start, 97% A at 13.5 min, 94% A at 10.5 min (concave curve), 91% A at 6 min (convex curve), 66% A at 5 min, 0% A at 1 min, 0% A hold at 3 min and reequilibration at 100% A. The wavelength of detection was 254 nm, column temperature 46 C°. Vacuum-dried samples with PITC-amino acids were dissolved in 250- $\mu\text{L}$  of phase A pH 7.5 containing 5% acetonitrile by vortex mixing. The new and freshly reconstituted samples were filtered through a 0.2- $\mu\text{m}$  and 20 microliters of sample were injected by manual injector.

#### *Statistical analysis*

All statistical analyses were performed using Microsoft Excell software. Arginine content in biological fluids was expressed as the mean $\pm$ standard deviation (mean $\pm$ SD). Differences of average values between groups were assessed using the Student's t-test, and p-values less than 0.05 were considered statistically significant.

### **Results and discussion**

At the first stage, we prepared standard solutions of free amino acid L-arginine and analyzed them versus a blank sample under the conditions described in Materials and Methods. Comparison of chromatograms allowed to identify a peak that corresponds to L-arginine with 20.4 min retention time point (Fig. 1, A). To confirm the identity of a presumable arginine peak, we have used arginine-degrading enzyme – recombinant human arginase (rhARG) which converts L-arginine to L-ornitine and urea (at concentration of 2 U/mL). The chromatogram of the sample supplemented with rhARG is shown on Fig. 1, B and the peak presumed to be that corresponding to L-arginine was not observed. Thus, the peak corresponding to free L-arginine was correctly identified and clearly separated.

The reaction of protein amino groups with PITC is the basis of the Edman degradation of polypeptides, one of the famous methods in classic biochemistry [3]. Phenylthiocarbamylation of the amino groups of amino acids was conducted under the conditions described in Materials and Methods. We analyzed the stability of derivatized products under different conditions. We found that after the derivatization reagent is removed under vacuum, the derivatized amino acids can be stored dry and frozen for several days with no significant degradation. Dissolved in solution prior to injection into the liquid chromatographic system, degradation will occur if the samples are not kept cold. After 6 h of incubation at the room temperature, a 5–10% drop in the response occurred for arginine. Therefore, we propose to inject only a freshly-prepared samples for quantitative analysis of L-arginine.

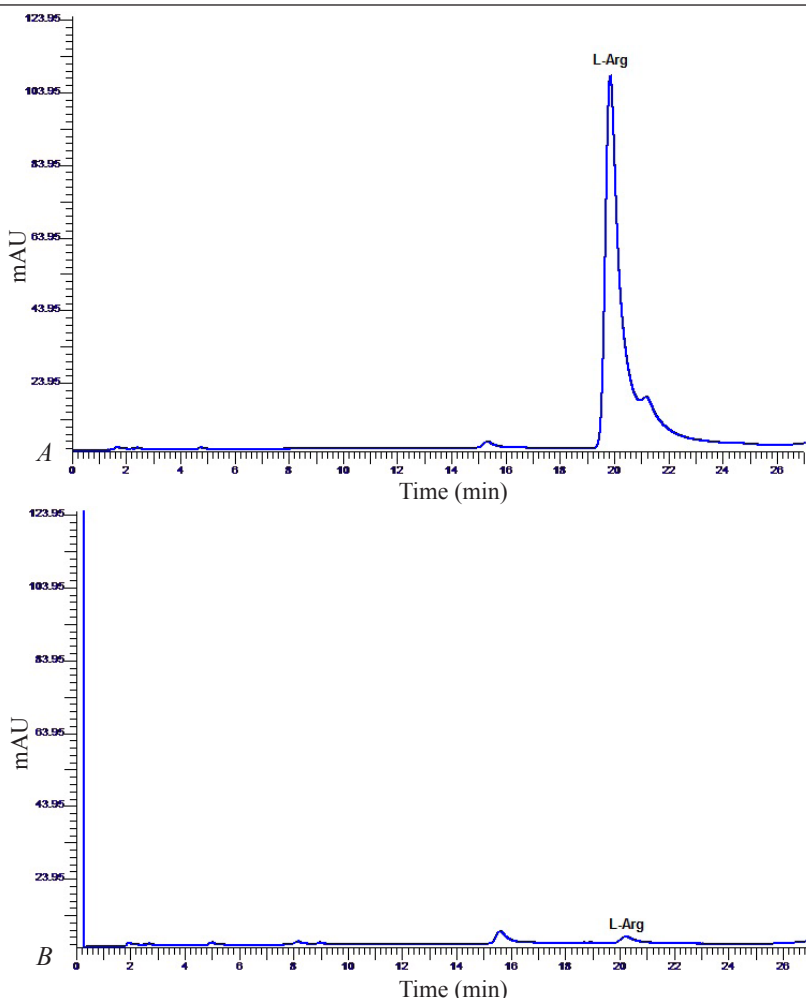


Fig. 1. Chromatograms of the standard L-arginine solution (A), and of the same L-arginine solution supplemented with rhARG in concentration of 2 U/mL (B). L-Arg – arginine (retention time was 20.4 min).

In many chromatographic analyses, it is important to achieve a linear regression of an analysed compound in the range of analytical interest. L-arginine standards varying from 5 to 5000  $\mu\text{M/L}$  were derivatized and analyzed. Samples were run in triplicate and the corresponding peak areas were calculated. The data are presented on Fig. 2 and demonstrate the linear response in the range of 5-2500  $\mu\text{M/L}$ . Correlation coefficients for these data exceeded 0.999. The poor linearity was obtained in the range 2 mM/L and higher. The lower detection limit was 0.5  $\mu\text{M/L}$  (corresponding to 2 pmoles in the injected sample).

As the next experimental step, we monitored arginine content in selected biological samples of practical interest. First, we used for the analysis RPMI-1640 cultural medium for tumor cells which a defined mixture of different amino acids. There are different deproteinization methods for detecting amino acid in biological samples, including strong acids, organic solvents, ultrafiltration, high-speed centrifugation and dialysis, etc. [11, 18]. We tested different deproteinization agents and have chosen acetonitrile, which is more suitable for our chromatographic conditions but requires larger volumes and dilutes a sample.

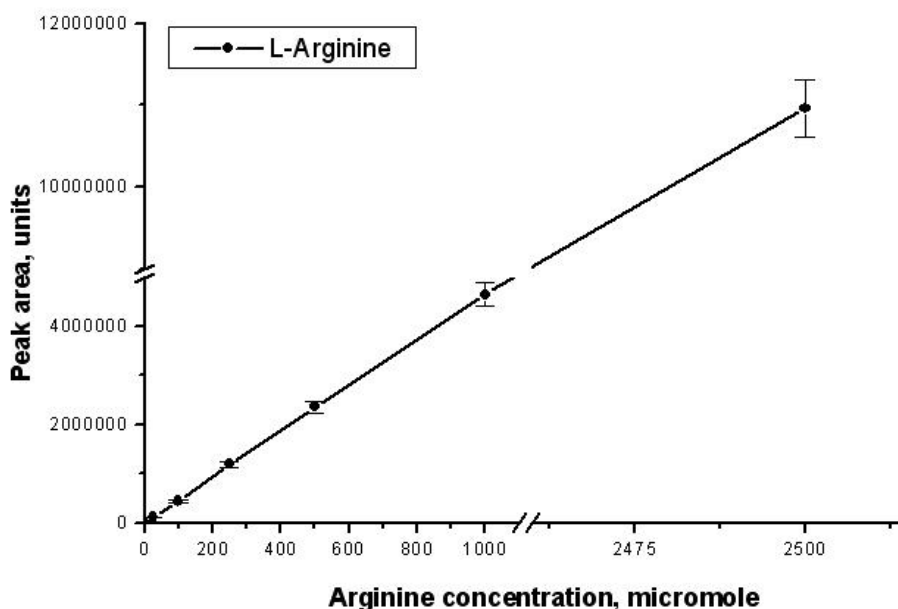


Fig. 2. Linearity of the detector response to PITC derivatized L-arginine standard solutions.

Fig. 3 shows a chromatographic profile of cell cultural medium sample where, as predicted, significant number of peaks was detected. The representative chromatogram exhibits good peak resolution. For the optimization of elution conditions, we investigated the effect of changing the pH of the sodium acetate buffer, and finally selected pH 6.5 as the optimum. The peak of L-arginine present in RPMI-1640 medium at high concentration was identified. According to our calibration curve, the L-arginine concentration in this medium without FBS was estimated as  $1020 \pm 30 \mu\text{M/L}$  what is in agreement with a datasheet specification. In order to verify the specific peak of arginine, we analyzed culture medium with administrated recombinant human arginase (rhARG) and compared the obtained chromatograms. The arginine peak was clearly separated and disappeared in the sample treated with rhARG.

For the next analysis, we utilized a more complex biological sample, blood plasma, which contains all amino acids and other amino-compounds. We deproteinized blood plasma samples analogously to the culture medium. The work with blood plasma must be conducted in cold because the arginase from erythrocytes can be released into plasma and decrease physiological arginine level. The chromatogram of the separated blood plasma amino acids is provided on Fig. 3, C. The arginine peak was found to be clearly separated too. It has to be mentioned that arginine analysis in blood plasma is very important for clinical medicine to control effectiveness of administered rhARG as an antitumor agent in cancer patients.

As the last step, we examined the alterations in free arginine level in selected tumor cells cultured under different conditions. It was especially interesting to establish, whether a predicted drop in free intracellular arginine correlates with sensitivity of different model tumor cells to arginine deprivation. These data may also provide new insight into question, what intracellular mechanisms and when may be induced in tumor cells in response to alterations in free intracellular arginine pool.

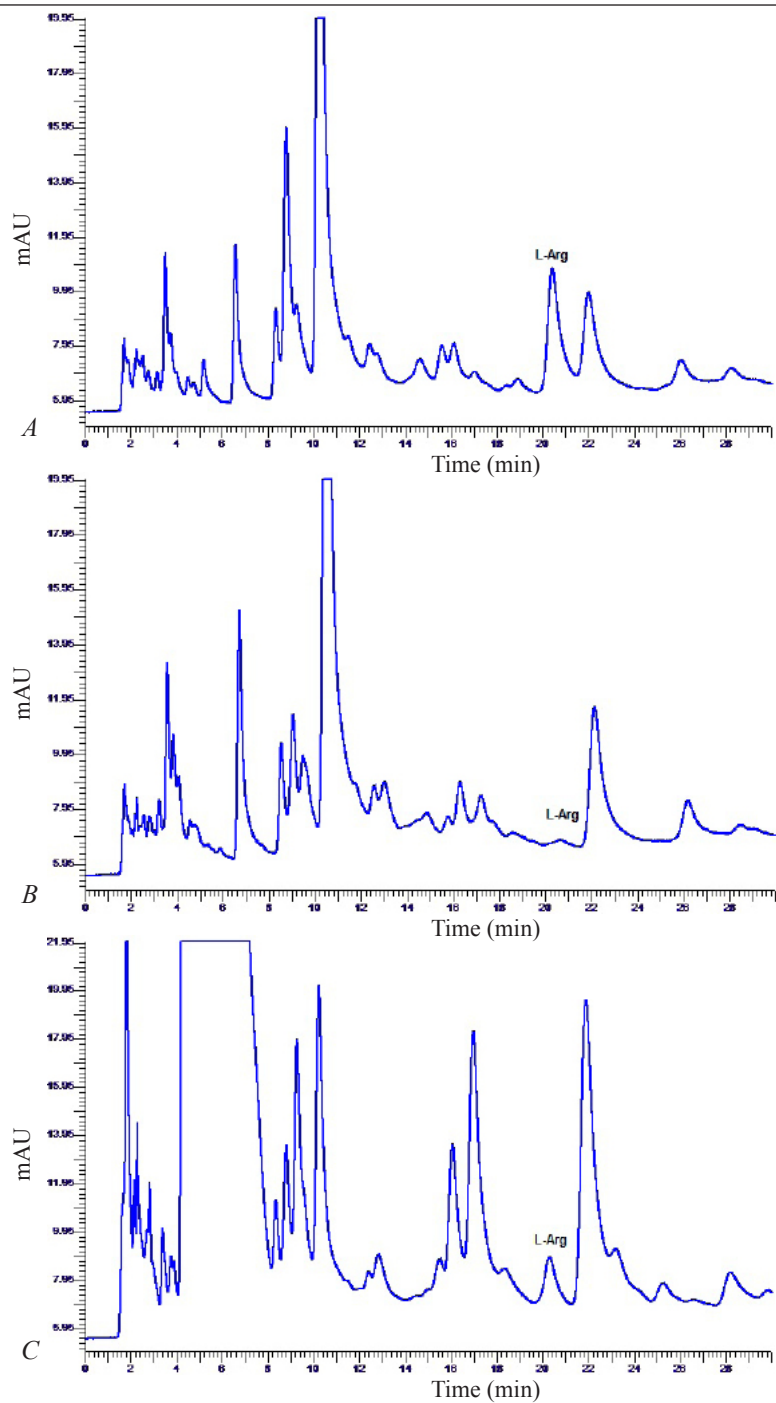


Fig. 3. Chromatograms of PITC derivatized amino acids by reverse-phase HPLC. *A* – RPMI-1640 cell culture medium; *B* – RPMI-1640 culture medium with added rhARG (2 U/ml); *C* – deproteinized normal human plasma.

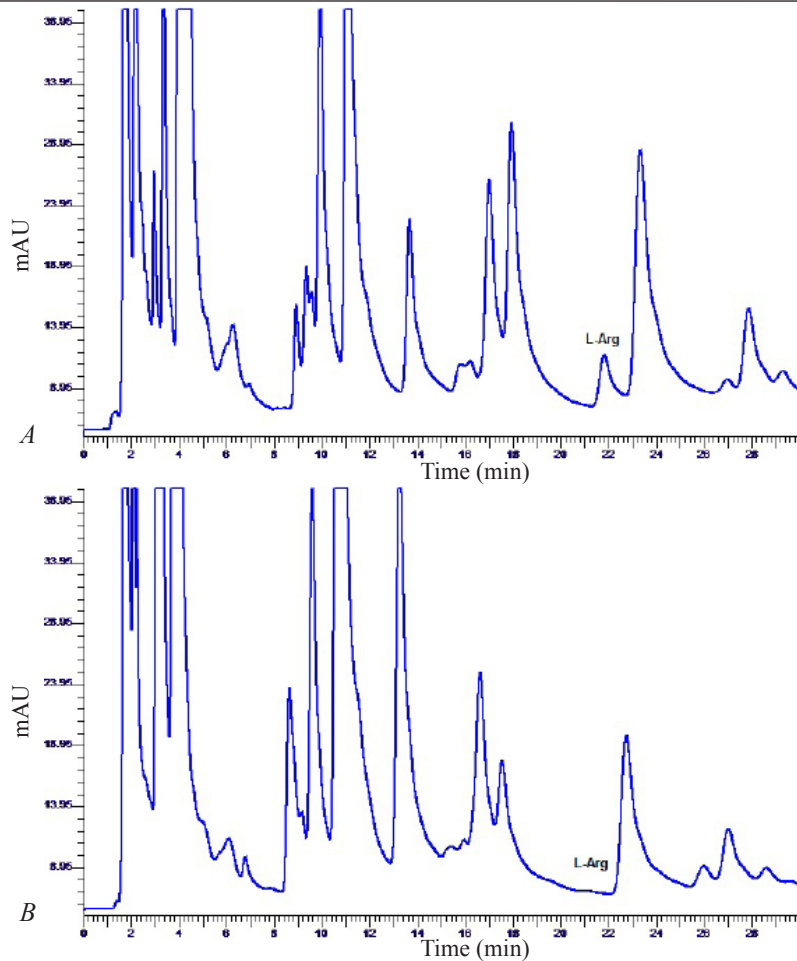


Fig. 4. Chromatograms of PITC derivatized amino acids by reverse-phase HPLC from Jurkat cell extracts: *A* – Control cell extract (arginine-sufficient medium); *B* – Cell extract after 30 min of full arginine deprivation.

Determination of amino acids levels in the cell is a difficult process, because there are many omnipresent metabolites that may interfere with the efficient separation. A key challenge in cell metabolite analysis is the design of a metabolite extraction protocol for different initial samples, which have very diverse chemical and physical properties (e.g., size, weight, polarity, volatility, solubility, stability). According to the literature data, the most suitable for amino acids analysis is 60 % cold acetonitrile quenching solution, which quantitatively yields higher amino acids titres. We analyzed the intracellular content of arginine in two cancer cell lines: cultured as a monolayer human melanoma SK-MEL-28 and in grown in suspension human leukemic Jurkat cells, both in complete or the formulated arginine-deficient media. Fig 4 shows typical chromatograms of extracts from Jurkat cells. Quantitative data of intracellular arginine pool in the tested cancer cells are represented in Table 1. The results are expressed as nmole/mg cellular protein. The basal level of the arginine in Jurkat cells ( $2.5 \pm 0.45$  nM/mg) was higher then in SK-MEL-28 cells ( $1.32 \pm 0.5$  nM/mg) Our experiments demonstrate dramatical and fast reduction of free intracellular arginine already after 30 min of arginine starvation. This observation is very important



for elucidating early signalling mechanisms of cancer cells response to arginine deficiency, both *in vitro* and *in vivo*.

Table 1

Intracellular L-arginine concentration in tumor cells cultivated in standard and arginine-deficient media (in nmole/mg of cellular protein; M $\pm$ m; n=3)

Cell lines	Control	30 min of starvation
Jurkat	2.5 $\pm$ 0.45	0.23 $\pm$ 0.07
SK-MEL-28	1.32 $\pm$ 0.5	0.36 $\pm$ 0.09

In conclusion, the described here elaborated RT-HPLC method for monitoring of L-arginine in different biological samples is characterized by relative simplicity, the use of inexpensive C<sub>18</sub> column, exhibits good precision, linearity and satisfactory recovery from different samples. We propose this method for utilization in laboratory and clinical practice.

## LITERATURE

1. *Ascierto P. A., Scala S., Castello G.* et al. Pegylated arginine deiminase treatment of patients with metastatic melanoma: results from phase I and II studies // *J. Clin. Oncol.* 2005. Vol. 23. P. 7660–7668.
2. *Cheng P. N., Lam T. L., Lam W. M.* et al. Pegylated recombinant human arginase (rhArg-peg5000mw) inhibits the *in vitro* and *in vivo* proliferation of human hepatocellular carcinoma through arginine depletion // *Cancer Res.* 2007. Vol. 67. P. 309–317.
3. *Cohen S. A., Strydom D. J.* Amino acid analysis using phenylisothiocyanate derivatives // 1988. *Anal. Biochem.* Vol. 174. P. 1–16.
4. *Dietmair S., Timmins N., Gray P.* et al. Towards quantitative metabolomics of mammalian cells: Development of a metabolite extraction protocol // *Analytical Biochem.* 2010. Vol. 404. N 3. P.155–164.
5. *Ding Y. S., Mou S. F.* Development of analytical methods for amino acids and their applications // *Chin. J. Chromatogr.* 2004. Vol. 22. P. 210–215.
6. *Fekkes D.* State-of-the-art of high-performance liquid chromatographic analysis of amino acids in physiological samples // *J. Chromatography B.* 1996. Vol. 682. P. 3–22.
7. *Fekkes D., Dalen A., Edelman M.* et al. Validation of the determination of amino acids in plasma by high-performance liquid chromatography using automated pre-column derivatization with *o*-phthaldialdehyde // *J. Chromatography B.* 1995. Vol. 669. P. 177–186.
8. *Feun L., You M., Wu C. J.* et al. Arginine deprivation as a targeted therapy for cancer // *Curr. Pharm. Des.* 2008. Vol. 14. P. 1049–1057.
9. *Glazer E. S., Piccirillo M., Albino V.* et al. Phase II study of pegylated arginine deiminase for nonresectable and metastatic hepatocellular carcinoma // *J. Clin. Oncol.* 2010. Vol. 28. N 13. P. 2220–2226.
10. *Gustavsson B., Betner I.* Fully avtomated amino acids analysis for protein and peptide hydrolysates by pre-column derivatization with 9-fluorenyl methylchloroformate and 1-aminoadamantane // *J. Chromatogr.* 1990. Vol. 507. P. 67–77.
11. *Hariharan M., Naga S., VanNoord T.* Systematic approach to the development of plasma amino acid analysis by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection with pre-column derivatization using phenil isothiocyanate // *J. Chromatogr.* 1993. Vol. 621. P. 15–22.
12. *Heinrikson R. L., Meredith S. C.* Amino acid analysis by reverse-phase high-performance liquid chromatography: pre-column derivatization with phenyl isothiocyanate // *Anal Biochem.* 1984. Vol. 136. P. 65–74.

13. Hernandez C. P., Morrow K., Lopez-Barcons L. A. et al. Pegylated arginase I: a potential therapeutic approach in T-ALL // *Blood*. 2010. Vol. 115. P. 5214–5221.
14. Kaiser E., Schoenknecht P., Kassner S. Cerebrospinal fluid concentrations of functionally important amino acids and metabolic compounds in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease // *Neurodegener. Dis.* 2010. Vol. 7. P. 251–259.
15. Morris S. M. Arginine: beyond protein // *Am. J. Clin. Nutr.* 2006. Vol. 83 (Suppl). P. 508–512.
16. Sarwar G., Botting H. Evaluation of liquid chromatographic analysis of nutritionally important amino acids in food and physiological samples // *J. Chromatography*. 1993. Vol. 615. P. 1–22.
17. Sethuraman R., Lee T., Tachibana S. Simple quantitative HPLC method for measuring physiologic amino acids in cerebrospinal fluid without pretreatment // *Clin. Chem.* 2004. Vol. 50. P. 665–669.
18. Sherwood R. A., Titheradge A. C., Richards D. A. Measurement of plasma and urine amino acids by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection using phenyl isothiocyanate derivatization // *J. Chromatogr.* 1990. Vol. 528. P. 293–303.
19. Vynnytska B. O., Mayevska O. M., Kurlishchuk Y. V. et al. Canavanine augments proapoptotic effects of arginine deprivation in cultured human cancer cells // *Anticancer Drugs*. 2011. Vol. 22. P. 148–157.
20. Wheatley D. N., Kilfeather R., Stitt A. et al. Integrity and stability of the citrulline-arginine pathway in normal and tumour cell lines // *Cancer Letter*. 2005. Vol. 227. P. 141–152.
21. Wu G., Morris S. M. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond // *Biochem. J.* 1998. Vol. 336. № 1. P. 1–17.

Стаття: надійшла до редакції 31.08.12

прийнята до друку 23.10.12

## РОЗРОБКА І ОЦІНКА ВЕРХ МЕТОДУ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ АРГІНІНУ В БІОЛОГІЧНИХ ЗРАЗКАХ

О. Чень<sup>1,2</sup>, М. Барська<sup>1</sup>, Н. Сибірня<sup>2</sup>, О. Стасик<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Інститут біології клітини НАН України  
вул. Драгоманова, 14–16, Львів 79005, Україна

<sup>2</sup>Львівський національний університет імені Івана Франка  
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна  
e-mail: stasyk@cellbiol.lviv.ua

Розроблено метод аналізу концентрації аргініну в культуральному середовищі, плазмі крові та у зразках із екстрактів пухлинних клітин за допомогою зворотно-фазової високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) шляхом дериватизації з фенілізотіоціанатом (ФІТЦ). Біологічні зразки депротейнізували ацетонітрилом. Пухлинні клітини гомогенізували у 60% водному розчині ацетонітрилу. Використовували градієнтну елюцію та розчин ФІТЦу як дериватизуючий реагент. Пік аргініну повністю розділявся у всіх протестованих біологічних зразках. Лінійність аналізу L-аргініну спостерігалась у діапазоні 0–2500 мкмоль/л. Метод характеризується простотою, використанням відносно недорогої Supelco C<sub>18</sub> колонки, простим градієнтом і невеликою кількістю розчинників, необхідних для аналізу. Розроблений метод пропонується як аналітичний для рутинної детекції аргініну в наукових лабораторіях.

*Ключові слова:* амінокислотний аналіз, ВЕРХ, L-аргінін, ФІТЦ.

**РАЗРАБОТКА И ОЦЕНКА ВЭЖХ МЕТОДА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АРГИНИНА В  
БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦАХ****О. Чень<sup>1,2</sup>, М. Барская<sup>1</sup>, Н. Сибирная<sup>2</sup>, О. Стасык<sup>1</sup>***<sup>1</sup>Институт биологии клетки НАН Украины  
ул. Драгоманова, 14–16, Львов 79005, Украина**<sup>2</sup>Львовский национальный университет имени Ивана Франко  
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина  
e-mail: stasyk@cellbiol.lviv.ua*

Разработан метод анализа концентрации аргинина в культуральной среде, плазме крови и в образцах из экстрактов опухолевых клеток при помощи обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) путем дериватизации с фенилизотиоцианатом (ФИТЦ). Биологические образцы депротеинизировали ацетонитрилом. Опухолевые клетки гомогенизировали в 60% водном растворе ацетонитрила. Использовали градиентную элюцию и раствор ФИТЦа в качестве дериватизирующего реагента. Пик аргинина разделялся полностью во всех протестированных биологических образцах. Линейность анализа L-аргинина наблюдалась в диапазоне 0–2500 мкмоль/л. Метод характеризуется простотой, использованием относительно недорогой Supelco C<sub>18</sub> колонки, простым градиентом и небольшим количеством растворителей, необходимых для анализа. Разработанный метод предлагается в качестве аналитического для рутинной детекции аргинина в научных лабораториях.

*Ключевые слова:* аминокислотный анализ, ВЭЖХ, L-аргинин, ФИТЦ.

## КОРИГУЮЧИЙ ВПЛИВ ПРИРОДНОГО ПОЛІФЕНОЛЬНОГО КОМПЛЕКСУ ВИНОГРАДУ ЗА РАДІОІНДУКОВАНОГО ОКСИДАТИВНОГО СТРЕСУ У ТКАНИНІ НИРКИ

У. Старанко, Л. Дацюк, М. Сабадашка, Н. Сибірна

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

Вивчено вплив препарату природного поліфенольного комплексу винограду на активність антиоксидантних ферментів і вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів у кірковому шарі нирки за дії **низькоінтенсивного іонізуючого випромінювання**. Виявлено **коригуючі властивості поліфенольних сполук винограду на антиоксидантний статус тканини нирки та їхню здатність запобігати змінам, характерним для оксидативного стресу**.

*Ключові слова:* **низькоінтенсивне рентгенівське випромінювання, поліфенольні сполуки винограду, оксидативний стрес, нирка.**

Небезпека використання атомної енергії постійно проявляється в аварійних ситуаціях на АЕС, радіонуклідному забрудненні навколишнього середовища, можливому ураженні обслуговуючого персоналу, який працює з різними типами джерел іонізуючих випромінювань.

За дії іонізуючих випромінювань на біологічні системи в широкому діапазоні доз і потужностей основним фактором ураження є посилення генерації активних метаболітів Оксигену, які індують реакції перекисного окиснення ліпідів [1]. Ефективне знешкодження супероксиданіону супероксиддисмутазою, пероксиду водню каталазою та глутатіонпероксидазою запобігають спонтанному утворенню ще одного, найагресивнішого продукту – гідроксильного радикала, який здатен вступати у взаємодію зі значною кількістю сполук і не інактивується ензиматичним шляхом. Радіоіндукована модифікація всіх класів біомолекул послаблює виконання ними біологічних функцій і призводить до розвитку оксидативного стресу та, як наслідок, різних патологічних змін в організмі. Певні особливості тканини нирок, зокрема, надзвичайно висока швидкість метаболічних процесів може визначати характер патологічних змін за дії радіації. Наслідком впливу оксидативного стресу може бути зміна структурно-функціональної організації клубочків через вплив активних метаболітів Оксигену (АМО) на мезангіальні й ендотеліальні клітини. Клубочки значно чутливіші до окиснювального стресу, ніж інші сегменти нефрону [12].

Можливий механізм захисної дії поліфенольних сполук рослинного походження полягає у сповільненні розвитку оксидативного стресу, викликаного дією як екзогенних, так і ендогенних чинників [17, 18]. Поліфеноли, безпосередньо реагуючи з вільними радикалами, перетворюють їх у продукти зі значно нижчою реактивністю. Крім того, вони можуть підвищувати потужність ендогенної системи антиоксидантного захисту і модулювати відновний потенціал клітини. Саме зміни в окисно-відновному статусі клітини, пов'язані з передачею фізіологічних стимулів шляхом регулювання сигнальних шляхів, можуть мати далекосяжні наслідки для клітинного росту і диференціювання [11]. Широко досліджено здатність поліфенолів модулювати активність кіназ [6], протеїназ [13],

виступати як ліганди для транскрипційних факторів [7]. Добре відомо, що поліфенольні сполуки мають протизапальні, антиагрегаційні властивості й можуть посилювати обмін ліпідів [14, 16].

У складі виноградного червоного вина є такі поліфенольні сполуки як антоціаніни, ресвератрол, галова кислота, катехін, мірестин, кверцетин тощо. Усі ці компоненти сприяють підвищенню антиоксидантного потенціалу плазми крові людей [8, 9], тим самим модулюючи систему антиоксидантного захисту.

Одним із чутливих тестів для виявлення змін, які ведуть до виникнення оксидативного стресу, є дослідження антиоксидантного статусу організму. Великий науковий інтерес і актуальність мають способи корекції цих змін природним поліфенольним комплексом винограду за дії низькоінтенсивного рентгенівського випромінювання.

Метою даної роботи було дослідити вплив препарату природного поліфенольного комплексу винограду на активність ензимів антиоксидантного захисту кіркового шару нирки білих щурів за дії одноразового низькоінтенсивного рентгенівського опромінення.

#### **Матеріали та методи**

Досліди були проведені на 64 білих безпородних щурах-самцях масою 180–220 г у відповідності до конвенції Ради Європи щодо захисту хребетних тварин, які використовуються у наукових дослідженнях. Тварини впродовж експерименту перебували у стаціонарних умовах віварію і були поділені на чотири групи: перша – контрольні тварини (К); друга – тварини, яким за 10 діб до початку та впродовж 3 діб експерименту давали з питною водою препарат природного поліфенольного комплексу, отриманий перегонкою червоного сухого вина марки Каберне-Совіньйон (наданого Національним інститутом винограду і вина «Магарач», Крим) на роторному випарювачі «Labogota – 4001» з такими параметрами:  $t=40^{\circ}\text{C}$ , тиск 0,8–0,9 кгс/см<sup>2</sup>, 60 об./хв), з розрахунку щодобової дози 300 мл/70 кг маси (К+П); третя – тварини, яких піддавали одноразовому опроміненню дозою 30 сГр (шкірно-фокусна відстань 95 см, напруга 130 кВ, сила струму 10 мА, фільтри Cu 0,5 мм і Al 1,0 мм, потужність дози – 8,3 мГр·с<sup>-1</sup>) (О); четверта – тварини, яким вводили з питною водою препарат, як і другій групі, та піддавали радіаційному впливу (О+П). Дозу опромінення контролювали клінічним дозиметром типу 27012 (Otto Shon, Німеччина).

Активність супероксиддисмутази (СОД) визначали за методом С. Чеварі та ін. [5], каталази – М.А. Корольок та ін. [2], глутатіонпероксидази (ГПО) – В.М. Моїн [3], глутатіонредуктази (ГР) – D.M. Goldberg, R.J. Spooner [10]. Вміст ТБК-позитивних продуктів (ТБК-ПП) визначали згідно з методом Р. А. Тимирбулатова, Є. І. Селезневої [4], білок – за загальноприйнятим методом Лоурі.

Результати досліджень обробляли статистично з використанням програми Origin Pro. Відмінність досліджуваних показників вважалася статистично вірогідною при  $P<0,05$ .

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

Як видно з результатів, представлених у таблиці, споживання препарату поліфенольного комплексу винограду зумовлює достовірне зростання на 25% активності каталази й тенденцію до збільшення інших досліджуваних показників порівняно з показниками інтактної групи тварин. Відомо, що поліфенольні сполуки підвищують антиоксидантний потенціал плазми як у людини, так і у гризунів, мають здатність модулювати активність низки ферментів, зокрема антиоксидантних, тим самим запобігаючи розвиткові оксидативних змін у тканинах нирки [15].

Активність антиоксидантних ензимів і вміст ТБК – позитивних продуктів у кірковому шарі нирки за умов низькоінтенсивного рентгенівського опромінення в дозі 30 сГр та на фоні споживання препарату природного поліфенольного комплексу винограду ( $M \pm m$ ,  $n=6-8$ )

Умови експерименту	СОД, ум. од.	Каталаза, мкмоль/мг білка	ГПО, ммоль/мг білка	ГР, нмоль/мг білка	ТБК, нмоль/г тканини
К	75,12±4,51	211,39±9,51	5,54±0,45	130,88±5,24	171,77±15,97
К+П	84,65±5,08	264,99±21,20*	6,01±0,61	140,39±7,02	181,47±9,61
О	24 год 118,74±11,87*	235,32±23,53	7,59±0,48*	143,24±17,18	153,46±12,89
О	48 год 79,96±5,99	266,83±13,34*	5,87±0,25	165,04±8,25*	151,15±8,16
О	72 год 51,36±5,27*	214,96±15,66	6,32±0,32	116,70±7,65	338,33±13,16*
О+П	24 год 77,61±5,04#	293,12±28,11*	6,12±0,55	151,26±5,30*	142,69±15,69
О+П	48 год 98,78±3,46*	265,29±15,47*	5,43±0,09	153,00±12,11	121,15±7,51*#
О+П	72 год 68,44±4,11*	226,54±20,85	5,36±0,37	121,42±11,40	237,25±15,90*#

**Примітка.** \* – достовірно порівняно з контролем ( $P<0,05$ ), # – достовірно порівняно з опроміненням ( $P<0,05$ ).

У пострадіаційний період у тканині нирки виявлено зростання в 1,6 разу активності СОД на 24 год досліду з поступовим зниженням до 68% на 72 год експерименту (рис. 1) порівняно з контролем. За опромінення на фоні споживання поліфенольного препарату спостерігається підвищення ензиматичної активності в 1,3 разу на 48 год експерименту. Очевидно, що зростання генерації супероксиданіону за радіаційного впливу та посилення його утилізація супероксиддисмутазою в ранні терміни експерименту нівелювалися споживанням поліфенольного комплексу. Таким чином, споживання препарату сприяло збереженню на рівні контрольних показників активності СОД після дії іонізуючого випромінювання, тоді як за радіаційного впливу відзначено різке зниження активності СОД на 3 добу порівняно з показниками інтактних тварин.

Опромінення тварин одноразовою дозою 30 сГр призводило до підвищення активності каталази на 26% на 48 год експерименту (рис. 2), тоді як за введення поліфенольних сполук спостерігалось зростання активності ензиму як на 24, так і на 48 год експерименту, відповідно, на 39 і 25% порівняно з контролем. Зростання активності каталази можна розглядати як реакцію на інтенсифікацію окисних процесів, тоді як за опромінення на фоні введення з питною водою препарату достовірних змін в активності каталази у нирці по-

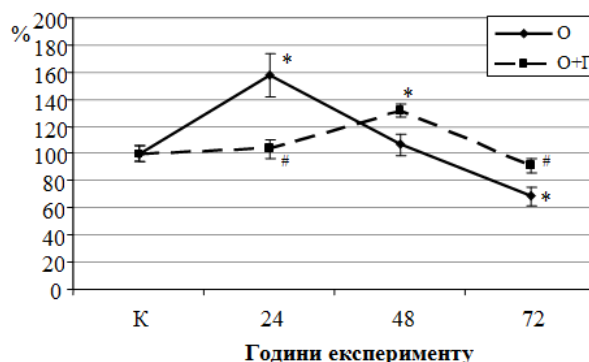


Рис. 1. Відносна активність супероксиддисмутази у кірковому шарі нирки через 24, 48, 72 год після опромінення дозою 30 сГр та на фоні введення природного поліфенольного комплексу винограду.

**Примітка.** \* – достовірно порівняно з контролем ( $P<0,05$ ), # – достовірно порівняно з опроміненням ( $P<0,05$ ).

рівняно з показниками тварин, які споживали препарат, не виявлено, оскільки вихідний показник у цій групі був достовірно вищим ніж у контрольної групи (див. таблицю).

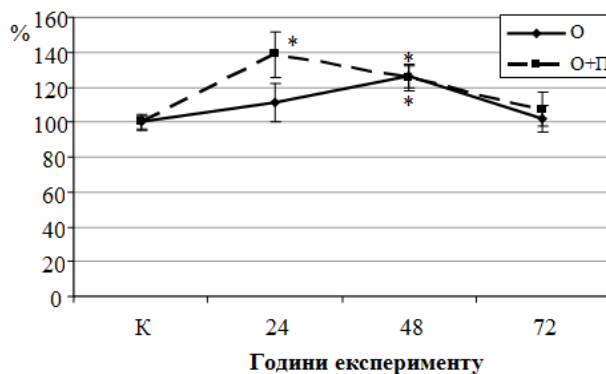


Рис. 2. Відносна активність каталази у кірковому шарі нирки через 24, 48, 72 год після опромінення дозою 30 сГр та на фоні введення природного поліфенольного комплексу винограду.

**Примітка.** \* – достовірно порівняно з контролем ( $P < 0,05$ ).

Виявлено зростання активності ГПО за дії рентгенівського опромінення на 37% на 24 год експерименту порівняно з контрольними показниками (рис. 3), тоді як за радіаційного впливу на фоні споживання піддослідними тваринами препарату природного поліфенольного комплексу винограду активність ензиму перебувала в межах контролю у всі терміни експерименту.

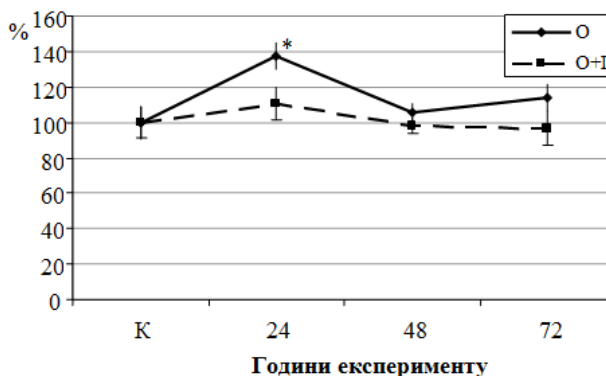


Рис. 3. Відносна активність глутатіонпероксидази у кірковому шарі нирки через 24, 48, 72 год після опромінення дозою 30 сГр та на фоні введення природного поліфенольного комплексу винограду.

**Примітка.** \* – достовірно порівняно з контролем ( $P < 0,05$ ).

Біологічна роль глутатіонредуктази полягає у підтриманні високої внутрішньоклітинної концентрації відновленого глутатіону. Очевидно, що використання відновленого глутатіону за рахунок підвищення активності ГПО, яке спостерігалось на 24 год після радіаційного впливу (рис. 3), призводило до активації ГР на 48 год після дії згаданого чинника (рис. 4) і, як наслідок, до зростання її активності на 26%. Компенсаторно-адаптивне зростання активності ензиму встановлено і за умов введення препарату на фоні опромінення на 24 год досліді порівняно з контролем.

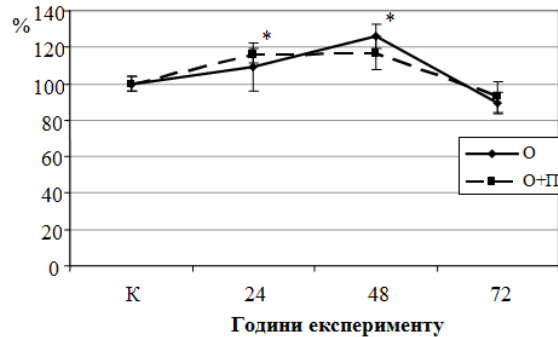


Рис. 4. Відносна активність глутатіонредуктази у кірковому шарі нирки через 24, 48, 72 год після опромінення дозою 30 сГр та на фоні введення природного поліфенольного комплексу винограду.

**Примітка.** \* – достовірно порівняно з контролем ( $P < 0,05$ ).

Інтенсивність окисних процесів оцінювали за вмістом ТБК-позитивних продуктів – кінцевих продуктів перекисного окиснення ліпідів. Можливо, різке зниження на 72 год після опромінення активності СОД (рис. 1) і призводило до значного підвищення рівня ТБК-ПП майже удвічі (рис. 5), спричиненого інтенсифікацією утворення активних форм кисню та продуктів ліпопероксидації у тканині нирки. Введення препарату на фоні опромінення характеризувалося зниженням до 71% вмісту ТБК-позитивних продуктів на 48 год дослідю. Однак зниженню вмісту ТБК-позитивних продуктів передувала активація ензимів антиоксидантного захисту (каталази на 24 і 48 год та СОД на 48) у відповідь на дію радіаційного чинника. Хоча у пізні терміни експерименту виявлено інтенсифікацію на 38% на 72 год процесів окисної модифікації ліпідів за споживання препарату, зростання вмісту ТБК-позитивних продуктів – в 1,4 разу нижче порівняно з даними за дії радіаційного чинника, що свідчить про розширення адаптивних можливостей організму при споживанні природного поліфенольного комплексу винограду.

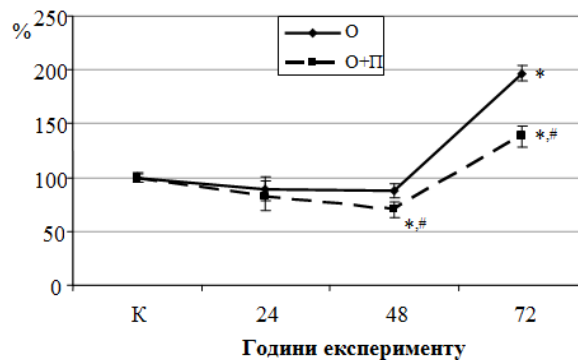


Рис. 5. Відносний вміст ТБК-позитивних продуктів у кірковому шарі нирки через 24, 48, 72 год після опромінення дозою 30 сГр та на фоні введення природного поліфенольного комплексу винограду.

**Примітка.** \* – достовірно порівняно з контролем ( $P < 0,05$ ), # – достовірно порівняно з опроміненням ( $P < 0,05$ ).

Отримані результати свідчать про індукцію в післярадіаційний період ланцюгової реакції вільнорадикальних процесів і порушення прооксидантно-антиоксидантної



рівноваги в клітинах кіркового шару нирки, що призводить до розвитку оксидативного стресу. Адаптивно-компенсаторна реакція на дію іонізуючого випромінювання в дозі 30 сГр характеризується коливним характером змін активностей антиоксидантних ферментів у різні терміни дослідження та різким збільшенням продуктів оксидної модифікації ліпідів на 3 добу досліду, тоді як за дії цього ж чинника на фоні споживання препарату природного поліфенольного комплексу винограду виявлені незначні зміни в активності ферментів та істотно нижчий рівень ТБК-позитивних продуктів. Отримані дані вказують на здатність поліфенольного комплексу винограду підвищувати антиоксидантний статус організму, сприяти найповнішому використанню адаптивних ресурсів за рахунок насичення ним різних тканин і виступати ефективним коригуючим фактором при станах, які ведуть до розвитку глибоких оксидативних змін в організмі.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Барабой В. А., Сутковой Д. А.* Окислительно-антиокислительный гомеостаз в норме и патологии. К.: Чернобыльинтерформ, 1997. Ч. 1. 202 с.; Ч. 2. 220 с.
2. *Королюк М. А., Ивановна И. Г., Майорова И. Г.* и др. Метод определения активности каталазы // Лабораторное дело. 1988. № 1. С. 16–18.
3. *Моин В. М.* Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах // Лабораторное дело. 1986. № 12. С. 124–126.
4. *Тимирбулатов Р. А.* Метод повышения интенсивности свободнорадикального окисления липидсодержащих компонентов крови и его диагностическое значение // Лабораторное дело. 1981. № 4. С. 209–211.
5. *Чевари С., Андял Т. Д., Штиренгер Д.* Определение антиоксидантных параметров крови и их диагностическое значение в преклонном возрасте // Лабораторное дело. 1991. № 10. С. 9–13.
6. *Agarwal R.* Cell signaling and regulators of cell cycle as molecular targets for prostate cancer prevention by dietary agents // *Biochem. Pharmacol.* 2000. N 60. P. 1051–1059.
7. *Amakura Y., Tsutsumi T., Nakamura M.* et al. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by some vegetable constituents determined using *in vitro* reporter gene assay // *Biol. Pharm. Bull.* 2003. N 26. P. 532–539.
8. *Durak I., Cimen M. Y., Omeroglu E.* et al. **The effect of red wine on blood antioxidant potential** // *Curr. Med. Res. Opin.* 1999. N 15. P. 208–215.
9. *Duthie G. G., Pedersen M. W., Gardner P. T.* et al. **The effect of whisky and wine consumption on total phenol content and antioxidant capacity of plasma from healthy volunteers** // *Eur. J. Clin. Nutr.* 1998. N 52. P. 733–736.
10. *Goldberg D. M., Spooner R. J., Bergmeyer H. U.* Glutathione reductase // *Methods of Enzymatic Analysis, 3rd ed.* – Weinheim.: Verlag Chemie. 1983. Vol. III. P. 258–265.
11. *Haddad J. J.* Antioxidant and prooxidant mechanisms in the regulation of redox(y)-sensitive transcription factors // *Cell Signal.* 2002. N 14. P. 879–897.
12. *Klahr S.* Oxygen radicals and renal diseases // *Miner. Electrolyte Metab.* 1997. N 23. P. 140–143.
13. *Moon S. K., Cho G. O., Jung S. Y.* et al. Quercetin exerts multiple inhibitory effects on vascular smooth muscle cells: role of ERK1/2, cell-cycle regulation, and matrix metalloproteinase-9 // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003. N 301. P. 1069–1078.
14. *Nijveldt R. J., Van Nood E., VanHoorn D. E. C., Boelens P. G.* Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications // *Am. J. Clin. Nutr.* 2001. Vol. 74. N 4. P. 418–425.

15. *Rodrigo R., Bosco C.* Oxidative stress and protective effects of polyphenols: Comparative studies in human and rodent kidney. A review // *Comp. Biochem. and Physiol.* 2006. N 142. P. 317–327.
16. *Rodrigo R., Miranda A. and Vergara L.* Modulation of endogenous antioxidant system by wine polyphenols in human disease // *Clinica Chimica Acta.* 2011. Vol. 412. N 5–6. P. 410–424.
17. *Santosh K. Katiyar, F. Afaq, A. Peres* Green tea polyphenol (-) epigallocatechin-3-gallate treatment of human skin inhibit ultraviolet radiation-induced oxidative stress // *Cancerogenesis.* 2001. Vol. 22. N 2. P. 287–294.
18. *Scalbert A., Williamson G.* Dietary intake and bioavailability of polyphenols // *J. Nutr.* 2000. Vol. 130. N 8. P. 2073–2085.

*Стаття: надійшла до редакції 14.09.12*

*доопрацьована 19.10.12*

*прийнята до друку 22.10.12*

## **CORRECTIVE EFFECT OF NATURAL GRAPE POLYPHENOL COMPLEX UNDER RADIOINDUCED OXIDATIVE STRESS IN KIDNEY TISSUE**

**U. Staranko, L. Datsyuk, M. Sabadashka, N. Sybirna**

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

It was studied the effect of natural grape polyphenol complex consumption by rats on kidney tissue under the condition of the influence of exposure to low level ionizing radiation. It was established the corrective effects of polyphenol compounds on the kidney tissue.

*Keywords:* low level ionizing radiation, grape polyphenol compounds, oxidative stress, kidney.

## **КОРРИГИРУЮЩЕЕ ВЛИЯНИЕ ПРИРОДНОГО ПОЛИФЕНОЛЬНОГО КОМПЛЕКСА ВИНОГРАДА ПРИ РАДИОИНДУЦИРОВАННОМ ОКСИДАТИВНОМ СТРЕССЕ В ТКАНИ ПОЧКИ**

**У. Старанко, Л. Дацюк, М. Сабадашка, Н. Сибірна**

*Львовский национальный университет имени Ивана Франко  
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина  
e-mail:starankoulyana@gmail.com*

Изучено влияние препарата природного полифенольного комплекса винограда на активность антиоксидантных ферментов и содержание продуктов перекисного окисления липидов в корковом слое почки при действии низкоинтенсивного ионизирующего излучения. **Выявлены корригирующие свойства полифенольных соединений винограда на антиоксидантный статус ткани почки и их способность предотвращать изменения, характеризующие оксидативный стресс.**

*Ключевые слова:* низкоинтенсивное рентгеновское излучение, полифенольные соединения винограда, оксидативный стресс, почка.

## СТАН АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ ЗАХИСТУ У ЩУРІВ З ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИМИ ПАТОЛОГІЯМИ ПРИ ВВЕДЕННІ ДО СКЛАДУ РАЦІОНУ ПРЕПАРАТІВ З ПРОБІОТИЧНИМИ МІКРООРГАНІЗМАМИ

А. Данилова\*, А. Запорожченко

*Одеський національний університет імені І.І.Мечникова  
Шампанський пров., 2, Одеса 65058, Україна  
e-mail: olgaivdan@mail.ru*

Вивчено стан антиоксидантної системи захисту у щурів з алоксановим цукровим діабетом і гепатитом. З'ясовано, що введення до складу раціону пробіотичних мікроорганізмів, іммобілізованих на високовуглеводних препаратах, дозволяє стабілізувати стан антиоксидантної системи захисту, вміст малонового діальдегіду, активність амінотрансфераз, основні біохімічні показники крові з наближенням їх до норми. У обміні ліпідів відбуваються зміни, які характеризуються зниженням концентрації  $\beta$ -ліпопротеїнів і холестерину в крові та підвищенням концентрації тригліцеридів як у крові, так і в гомогенатах печінки.

*Ключові слова:* антиоксидантна система, алоксановий діабет, гепатит.

Антиоксидантна система (АОС) організму захищає його системи і клітини від ушкодження вільними радикалами, які безперервно утворюються в живому організмі, а також сприяє відновленню працездатності всіх систем, що відповідають за обмінні процеси. Відомо, що інтенсифікація вільнорадикальних процесів, перекисного окислення поліненасичених жирних кислот спостерігається при розвитку загального неспецифічного адаптаційного синдрому (стресу) [2, 5, 7]. Це відбувається практично при більшості гострих захворювань і станів, коли загострюються хронічні захворювання, виникають інтоксикації, травми тощо. В основі біологічної доцільності цієї інтенсифікації лежить посилення в екстремальних умовах синтезу ейкозаноїдів, оновлення мембран, що сприяють здійсненню детоксикаційних процесів, стабілізують стан організму. Одним із показників стану організму може бути стан антиоксидантної системи (АОС), оксидантної системи (ООС) та зміна активності основних ферментів циклу Кребса [2, 12].

Первинні продукти перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) – гідроперекиси ліпідів – є речовинами нестійкими, досить швидко руйнуються з утворенням вторинних продуктів перекисного окислення ліпідів. Серед них найбільш відомий малоновий діальдегід (МДА), накопиченням якого в організмі пояснюється формування синдрому інтоксикації, що супроводжує багато захворювань внутрішніх органів. Накопичення продуктів ПОЛ відбувається при будь-яких видах патологій [6, 9]. Отже, одним із несприятливих наслідків перекисного окислення ліпідів вважають утворення малонового діальдегіду (МДА), в результаті обумовленого вільними радикалами розриву поліненасичених жирних кислот. Норма його в сироватці крові повинна бути нижча за 1 мкмоль/л [2].

Метою роботи було вивчення впливу високовуглеводних препаратів з пробіотичними мікроорганізмами на стан антиоксидантної системи, ліпідного і вуглеводного обміну у щурів з індукованим алоксаном цукровим діабетом і експериментальним гепатитом.

### Матеріали та методи

В експерименті задіяні препарати із введенням пробіотичних мікроорганізмів (лактобактерій і лакто+біфідобактерій), іммобілізованих на високовуглеводних препаратах –

харчових волокнах бурякового жому (ХВБурЖ) [10]. Тварин в експерименті, у кількості 12 груп, утримували на раціоні віварію, БАД додавали у кількості 20% від маси раціону. Група I була на загальноіварійному раціоні, Ia – здорові тварини, Ib з алоксановим діабетом, Iv з діабетом і гепатитом, група II була на раціоні з додаванням препарату з лактобактеріями, іммобілізованими на харчових волокнах бурякового жому (ХВБурЖ+Л), Pa – здорові тварини, Pb з алоксановим діабетом, Iv з діабетом і гепатитом, тварини групи III отримували раціон із лакто- і біфідобактеріями, іммобілізованими на ХВБурЖ (ХВБурЖ+Л+Б), Pаа – здорові тварини, Pаb з алоксановим діабетом, Pаv з діабетом і гепатитом; для контролю використовували тварин з гепатитом: група Ig – на загальноіварійному раціоні з гепатитом, Pгг – на раціоні із додаванням ХВБурЖ+Л з гепатитом, Pггг – на раціоні з додаванням ХВБурЖ+Л+Б з гепатитом. Кожна група тварин отримувала відповідний раціон упродовж 30 днів до введення алоксану.

Алоксановий діабет викликали шляхом внутрішньочеревного введення 5% розчину алоксангідрату фірми «Хемапол» у кількості 20 мг/100 г ваги тварини, що узгоджується із загальноприйнятими методиками індукування важкої форми діабету.

Гепатит викликали у тварин введенням внутрішньочеревно розчину  $CCl_4$  у дозі 2,5 мл/кг тварини у вигляді 25% масляного розчину.

У сироватці крові біохімічним методом за допомогою набору реактивів фірми «Ольвекс Діагностикум» (Росія) визначали вміст загального холестерину (ХС), тригліцеридів (ТГ), ХС ліпопротеїдів низької, дуже низької та високої щільності (ЛПНЩ, ЛПДНЩ і ЛПВЩ). Сумарну фракцію (ХС ЛПНЩ і ЛДНЩ) обчислювали з різниці концентрацій загального ХС і ХС ЛПВЩ. Показники перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) оцінювали, вимірюючи вміст малонового діальдегіду [8]. Вміст МДА визначали за допомогою кольорової реакції малонового діальдегіду з тіобарбітуровою кислотою і розраховували концентрацію ТБК-активних продуктів [3].

Для дослідження стану антиоксидантної системи ферментних систем тварин декапітували. Готували гомогенати органів і здійснювали визначення загальної антиоксидантної активності (ЗАА) та загальної оксидантної активності (ЗОА) за [3].

Робота виконана з дотриманням усіх правил і міжнародних рекомендацій Європейської конвенції із захисту хребетних тварин, використовуваних в експериментальних роботах.

Експериментальні дані обробляли за допомогою пакету програм Excel 97. Для оцінки значущості відмінностей при нормальному розподілі кількісних ознак використовували критерій Стюдента.

Концентрація МДА в сироватці крові відбиває активність процесів перекисного окислення ліпідів в організмі та служить маркером ступеня ендогенної інтоксикації. Як правило, високий вміст МДА відповідає важкому ступеню ендогенної інтоксикації, що було виявлено при індуванні у піддослідних тварин діабету і гепатиту. Зміни АОА вивчали за впливом на кінетику накопичення МДА в гомогенатах різних органів лабораторних шурів.

### Результати і їхнє обговорення

Проведені дослідження показали, що препарати пробіотичних мікроорганізмів, іммобілізованих на високовуглеводних носіях, здатні знижувати рівень загального холестерину, тригліцеридів і ліпопротеїдів низької щільності, збільшувати вміст ліпопротеїдів високої щільності у сироватці крові при гіперхолестеринемії та гіперліпідемії, нормалізувати процеси перекисного окислення, а також ефективно запобігати розвитку експериментальних діабету і гепатиту.

При моделюванні гепатиту в алоксандіабетичних тварин летальність у піддослідних групах тварин істотно варіювала: в контролі з алоксановим діабетом і гепатитом (група

Ів) вона становила 70%, у групах Пв і Шв – 15–20%. Отже, терапія препаратами з пробіотичними мікроорганізмами дає змогу уникнути летальності білих нелінійних щурів на тлі алоксанового діабету з гепатитом. На 3–5 добу після введення чотирихлористого вуглецю у тварин розвився виражений токсичний гепатит, вага тварин груп Ів і Іг зменшилася на 25–33%, вага печінки збільшилася на 18–23% у групі Ів, і на 21–25% у групі Іг, відзначено надлишкове наповнення кров'ю та помітні зміни кольору і структури органа. Печінка тварин у групі на раціоні Пв збільшилася тільки на 4–8%, а у групі Шв на 3–4%, некротичні зміни відсутні.

Введення білим щурам на фоні алоксанового діабету чотирихлористого вуглецю викликало зростання концентрації загального холестерину на 165% щодо значень інтактної групи тварин (з  $4,26 \pm 0,05$  до  $11,15 \pm 0,09$  ммоль/л,  $p < 0,05$ ). При біохімічному аналізі сироватки крові виявлено збільшення параметрів практично усіх показників: загальний білірубін збільшився в 5 разів у групі тварин Ів і лише в 1,4 і 1,3 разу в групах Пв і Шв відповідно. Одночасно був зафіксований ріст концентрації  $\beta$ -ЛП і ТГ, що перевищила значення інтактної групи тварин на 21,6 і 335% відповідно (табл. 1). Ці зміни відбувалися на тлі зниження вмісту ХСЛПВЩ, який є основним чинником, що запобігає ушкодженню ендотелію судинної стінки атерогенними фракціями ліпопротеїдів в умовах окислювального стресу [1]. Рівень ЛПВЩ був нижчий в групі Пв – на 26%, Шв – на 28% за показники групи Ів, тобто для груп, що отримували препарати з пробіотичними мікроорганізмами, не виходив за межі норми.

Таблиця 1

Вплив БАД на ліпідний спектр плазми крові білих щурів на тлі поєднаних метаболічних порушень, М(м), n=15

Вид раціону	Показник			
	ХС, ммоль/л	$\beta$ -ЛП, од.	ТГ, ммоль/л	ХС ЛПВЩ, ммоль/л
Норма	3,4–7,2	52–54	2,1–3,1	0,9–2,4
Іа	$4,26 \pm 0,05$	$55,5 \pm 0,6$	$2,54 \pm 0,03$	$1,72 \pm 0,15$
Ів	$11,15 \pm 0,35$	$67,5 \pm 0,81$	$11,05 \pm 0,34$	$3,01 \pm 0,04$
Пв	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,05$
	$6,47 \pm 0,12$	$56,70 \pm 0,27$	$3,55 \pm 0,12$	$2,23 \pm 0,04$
	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,001$
Шв	$p_1 < 0,001$	$p_1 < 0,001$	$p_1 < 0,001$	$p_1 < 0,001$
	$5,80 \pm 0,16$	$56,02 \pm 0,14$	$3,31 \pm 0,11$	$2,17 \pm 0,12$
	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,001$
	$p_1 < 0,001$	$p_1 < 0,001$	$p_1 < 0,001$	$p_1 < 0,001$

**Примітка:** p – достовірність відмінності розрахована щодо даних інтактної групи;  $p_1$  – щодо даних контрольної серії (алоксан + гепатит).

При моделюванні гепатиту у тварин групи Іг збільшувався вміст загального холестерину на 77–79% ( $7,59 \pm 0,05$  ммоль/л), ТГ – на 380% ( $12,19 \pm 0,05$  ммоль/л), у 2 рази підвищувалася кількість  $\beta$ -ліпопротеїдів ( $\beta$ -ЛП) ( $112,12 \pm 0,05$  од). Крім того, в печінці збільшувалася активність маркерів цитолітичного синдрому: АЛТ – на 62–63%, АСТ – на 23–25%, вміст МДА в печінці – на 250%.

Під впливом препаратів відбувалося достовірне зменшення вмісту продуктів ПОЛ у тканині печінки піддослідних тварин. Так, через 7 днів рівень дієнових кон'югатів (ДК) у крові тварин з гепатитом був на 31% більшим порівняно з інтактною групою і становив у групи Іг  $21,00 \pm 1,47$  мкмоль/г білка, а при використанні препаратів знижувався на 20,48–28,57% порівняно з групою з гепатитом і становив у групи Іг  $15,17 \pm 0,87$  мкмоль/г білка,

а у групи ІІІг  $15,0 \pm 0,95$  мкмоль/г білка, тобто знижувався до значень інтактної групи ( $16,03 \pm 1,26$ ).

У щурів контрольної групи, у яких були діабет і гепатит, у сироватці крові статистично значущо збільшувався вміст ТГ і ХС порівняно з показниками у інтактних тварин. У щурів, які отримували препарати з пробіотичними мікроорганізмами, рівень загального ХС у сироватці крові знижувався, що призводило до збільшення відносного вмісту ліпопротеїдів високої щільності (табл. 2).

Таблиця 2

Результати дослідження впливу засобів на деякі біохімічні показники щурів, ( $p < 0,05$ )

Показники	Вид раціону											
	здорові тварини			тварини з діабетом			тварини з діабетом і гепатитом			тварини з гепатитом		
	Ia	IIa	IIIa	Ib	IIb	IIIb	Iv	Iv	IIIv	Ig	IIg	IIIg
Кров												
Холестерин, ммоль/л	3,56	2,35	1,45	4,65	2,58	1,60	8,13	3,50	3,02	7,59	3,15	2,75
Білірубін, мкмоль/л	7,4	5,5	5,4	7,0	6,6	6,5	13,5	6,7	6,6	12,3	6,8	6,6
Загальний білок, г/л	76,4	78,5	75,2	69,5	87,1	86,7	61,3	73,65	73,95	91,5	81,1	82,7
АЛТ, мкмоль /л/хв	8,59	8,15	8,35	9,75	9,73	13,15	39,86	21,92	19,50	52,32	27,91	26,45
АСТ, мкмоль /л/хв	11,42	10,35	10,86	17,07	12,85	16,04	25,91	23,67	21,84	36,72	27,35	26,71
Коефіцієнт де Рітиса	1,33	1,27	1,30	1,75	1,32	1,22	0,65	1,08	1,12	0,70	0,98	1,01
GSH, мкмоль/г	19,72	20,15	22,42	18,55	19,14	22,19	15,11	18,44	18,97	16,20	18,53	19,21
ЛФ, нмоль /л/с	334,1	348,2	330,5	460,2	385,1	378,3	493,5	485,2	367,4	457,9	380,6	358,7
МДА, нмоль/см <sup>3</sup>	3,6	3,4	3,5	5,46	4,36	4,20	6,39	4,19	4,08	8,3	4,8	3,6
Печінка												
МДА, нмоль/мг білку	2,61	2,06	2,14	4,51	4,36	4,21	7,70	4,45	4,40	6,38	4,19	4,09
Коефіцієнт де Рітиса	1,32	1,22	1,31	0,90	1,15	1,19	0,65	1,08	1,12	0,95	1,27	1,28

При визначенні проміжних продуктів перекисного окислення ліпідів у крові тварин, у яких були діабет і гепатит, статистично значущо збільшувався вміст МДА. У тварин із діабетом і гепатитом групи Ів він був на 78% вищий, а у Іб – на 51% вищий порівняно з інтактними тваринами. У групи з гепатитом Іг в 2,3 рази вищий, ніж у інтактних тварин, а у групи ІІг на 33% більший, ніж у інтактних тварин. З'ясовано, що препарати з пробіотичними мікроорганізмами, іммобілізованими на високовуглеводних носіях, знижують рівень проміжних продуктів перекисного окислення ліпідів, причому активність їх збільшувалася в ряду ХВБурЖ (носій) < ХВБурЖ+Л < ХВБурЖ+Л+Б. Використання цих препаратів сприяло зниженню вмісту МДА в товстому, тонкому кишечнику, 12-палій кишці, нирках, печінці, підшлунковій залозі та крові.

Вміст лужної фосфатази (ЛФ) зростає в усіх органах у групі тварин Ів, а в групах тварин, що отримували у складі раціонів препарати з пробіотичними мікроорганізмами, зменшується, і в нирках, печінці, підшлунковій залозі близький до рівня у інтактних тварин.

Гепатопротекторна дія препаратів має комплексний характер і виражається у зниженні ліпідемії у тварин, що отримували їх у складі раціонів, зменшенні ступеня втрати маси тіла тварин із гепатитом, активації антиокислювального захисту (АОЗ). На фоні токсичного гепатиту, викликаного у тварин СС<sub>1</sub>, в групах на раціонах з додаванням ХВБурЖ, ХВБурЖ+Л, ХВБурЖ+Л+Б виявлені неоднозначні зміни вивчених показників, при цьому всі досліджені препарати позитивно впливають на фізіолого-біохімічні показники стану експериментальних тварин (табл. 3).

Введення до складу раціонів препаратів з пробіотичними мікроорганізмами сприяло достовірному зниженню рівня загального ХС на 46%, 48% у групах ІІв, ІІІв відповідно

порівняно з групою тварин з експериментальною моделлю Ів. У групах Пв, Шв перевищення рівня загального ХС порівняно з інтактними тваринами групи Іа було на 51% і 36% відповідно, при цьому значення не переходили верхню межу норми. Рівень  $\beta$ -ЛП на тлі введення препаратів знижувався на 16%, 17% у групах Пв, Шв відповідно і перевищував показники норми на 2–3%. Що стосується вмісту ТГ, він зменшувався на 57–70% залежно від виду раціону, відповідно порівняно з групою Ів, перевищуючи норму в разі використання препаратів з пробіотичними мікроорганізмами на 7–14,5%. Рівень ХСЛПВЩ у цих експериментальних групах зріс на 75% щодо контрольного рівня, тобто всі основні показники ліпідного обміну істотно і достовірно відрізнялися від початкових значень.

Таблиця 3

Значення ЗАА в різних органах тварин із діабетом і гепатитом

Орган	Вид раціону		
	Ів	Пв	Шв
Товстий кишечник	789,07±16,87	886,92±16,92	939,65±17,33
Тонкий кишечник	854,91±24,86	1024,37±23,17	1029,97±22,19
12-пала кишка	837,13±24,67	951,26±19,54	957,36±22,17
Нирки	423,23±11,45	568,22±12,34	421,38±11,86
Печінка	511,09±26,441	534,30±22,44	683,29±21,36
Підшлункова залоза	266,00±16,48	528,69±15,11	370,74±14,92
Кров	15,87±2,11	16,37±1,44	16,78±1,38

Аналіз отриманих в експерименті результатів показав, що препарати з пробіотичними мікроорганізмами мають певний гіпохолестеринемічний ефект. Це можна пояснити, з одного боку, як ефект введення до складу раціону носія – ХВБурЖ, оскільки у препараті зберігаються пектинові речовини та внаслідок обробки звільняються сорбційні центри, які здатні виводити метаболіти з організму, особливо це стосується достатньо низькомолекулярних сполук, тобто ЛПНЩ і ЛПДНЩ. А з іншого боку, завдяки поєднанню у складі введеного до раціону препарату ХВБурЖ з пробіотичними мікроорганізмами (лакто- і біфідобактерії), які мають імуностимулюючий і проєктивний ефект [7], в умовах поєднаних метаболічних порушень алоксанового діабету і гепатиту, відбувалося достовірне зниження рівня загального ХС більш ніж на 60% порівняно з даними групи Ів, причому в обох групах корекція вмісту загального холестерину досягла верхніх значень інтактної групи тварин Іа.

Через тиждень спостережень, завдяки порівнянню основних показників з показниками інтактної групи Іа, з'ясовано, що при введенні препаратів з пробіотичними мікроорганізмами (групи Пв, Шв) досягаються значення верхнього рівня ТГ для інтактної групи тварин, які стали  $2,95 \pm 0,07$  ммоль/л і  $2,88 \pm 0,07$  ммоль/л відповідно. Вміст ЛПНЩ і ЛПДНЩ в цих експериментальних групах також достовірно знижувався.

Під дією препаратів відбувалася нормалізація білоксинтетичної функції печінки – рівень загального білка у сироватці крові щурів зростав на 18,48–20,65% порівняно з групою Ів ( $61,3 \pm 0,03$  г/л), повертаючись таким чином до норми. У групах тварин Пв, Шв він становив  $73,65 \pm 0,04$  г/л,  $73,95 \pm 0,05$  г/л відповідно.

У тварин із гепатитом на фоні алоксанового діабету збільшувалася кількість тригліцеридів на 335%,  $\beta$ -ліпопротеїдів на 21%, що трохи менше, ніж у групи з гепатитом без діабету ( $12,19 \pm 0,05$  ммоль/л і  $112,12 \pm 0,05$  од відповідно). Вміст загального холестерину збільшився на 61%, а ХСЛПВЩ – на 75%.

Кількість загального білірубіну в сироватці крові збільшилася майже удвічі в групі Ів і стала  $13,5 \pm 0,45$  мкмоль/л, у групах, що отримували препарати з пробіотичними мікроорганізмами, його значення були менші:  $6,7 \pm 0,45$  мкмоль/л,  $6,6 \pm 0,45$  мкмоль/л відповідно у

групах тварин Пв, Шв. Це пов'язано з глибоким порушенням функції печінки, і в результаті зі зменшенням утворення білірубину при цьому відбувається збільшення виведення білірубину зі сироватки крові з сечею. Відомо, що білірубін в організмі відіграє роль природного антиоксиданта: він є акцептором активних форм кисню, тому здатний запобігати загибелі клітин, викликаній активацією перекисного окислення ліпідів при багатьох патологічних станах, у тому числі при холестатичних ураженнях печінки [4, 11]. Отже, виявлена нами динаміка зміни вмісту загального білірубину в сироватці крові, хоча і має зворотне співвідношення з мірою загибелі гепатоцитів, але не може свідчити про тісний зв'язок цих двох процесів.

У крові тварин групи Ів активність АЛТ зросла в 4 рази, АСТ у 2,27 разу, а в печінці активність АЛТ збільшилася в 5,56 разу і АСТ у 3,53 разу, що призвело до значного дисбалансу і зміни значень коефіцієнта де Рітиса в печінці групи тварин Ів, який становив 0,65. У групи тварин із гепатитом без діабету це значення було 0,70. У тварин, що отримували в складі раціонів препарати з пробіотичними мікроорганізмами, активність амінотрансфераз також зросла: АЛТ в 4,92, 5,19 разу, АСТ у 2,91, 3,03 разу в групах тварин Пв, Шв відповідно, але при цьому коефіцієнти де Рітиса мало відрізнялися від норми. Таким чином, виявлений мембранопротекторний ефект у молелі алоксан-гепатитової інтоксикації в групах тварин, що отримували БАД.

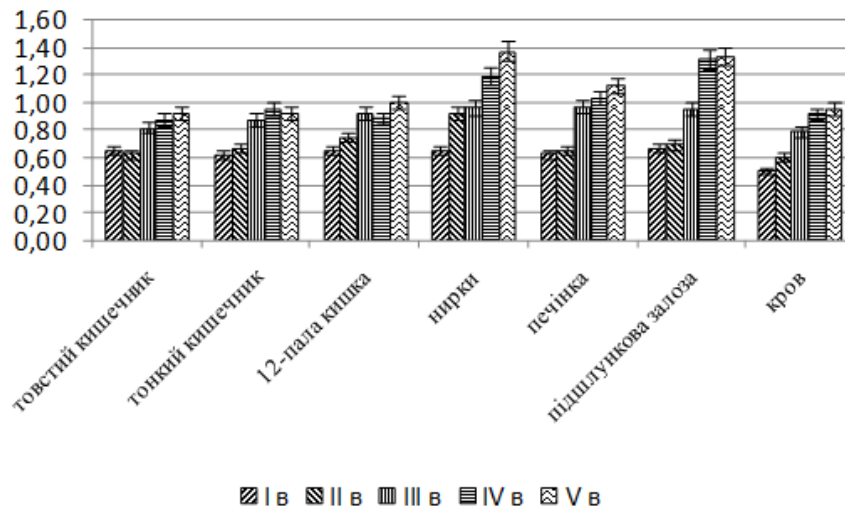


Рис. 1. Антиоксидантний індекс у різних органах і крові експериментальних тварин з діабетом і гепатитом.

На 3–5 добу у тварин розвився виражений токсичний гепатит, вага тварин зменшилася на 25–33%, вага печінки збільшилася на 18–23% у групах Ів і Іг, відзначене надлишкове наповнення кров'ю та помітні зміни кольору і структури органа. Печінка тварин у групах Пв, Пг, Шв, Шг збільшилася на 4–8% і 3–4% відповідно. Активність АЛТ у групі Іг підвищилася у 2,5–4 рази, порушилося співвідношення вмісту АСТ/АЛТ – коефіцієнт де Рітиса.

У результаті проведених досліджень з'ясовано, що всі досліджені препарати запобігають гіперліпідемії та гіпербілірубінемії, зменшується активність АСТ і АЛТ, у результаті досягається стабілізація коефіцієнта де Рітиса, а також зменшується активність лужної фосфатази.



Завдяки проведеним дослідженням з'ясовано, що всі препарати з пробіотичними мікроорганізмами при використанні перорально у складі раціонів харчування до або під час їжі здатні виявляти гепатопротекторні властивості, можуть бути використані для поліпшення ліпідного обміну. Відомо [7], що харчові волокна (ХВ) здатні зв'язувати холестерин і жовчні кислоти, відповідальні за транспорт жирів із кишкового тракту в кров. Зв'язування жовчних кислот призводить до стимуляції їх утворення в печінці за рахунок деградації холестерину, який надходить сюди у вигляді атерогенних ліпопротеїдів. У свою чергу, зниження рівня загального холестерину і ліпопротеїдів низької щільності в крові сприяє появі в ній холестерину з тканин. Гіпохолестеринемічний ефект БАД може бути також обумовлений здатністю полісахаридів зв'язувати гідрофільні жовчні кислоти, сприяючи збільшенню в плазмі відносного вмісту гідрофобних жовчних кислот.

Необхідно відзначити, що у групах тварин, які отримували препарати з пробіотичними мікроорганізмами, токсична дія як алоксану, так і чотирихлористого вуглецю виявилася значно менше.

Таким чином, результати дослідження показують, що високовуглеводні препарати з іммобілізованими пробіотичними мікроорганізмами мають унікальну багатоконпонентну біологічну активність, обумовлену поєднанням вуглеводної компоненти і комплексом властивостей лакто- й біфідобактерій. Встановлені в результаті досліджень гіполіподемичні, гіпоглікемічні й антиоксидантні властивості роблять перспективним використання цих препаратів для нормалізації ліпідного та вуглеводного обміну.

Таким чином, препарати пробіотичних мікроорганізмів, іммобілізованих на високовуглеводних носіях, при введенні їх до складу раціонів стабілізують ліпідний спектр крові, вміст холестерину, білірубину в сироватці крові щурів з алоксановим діабетом і гепатитом. Тварини, що отримували препарати з пробіотичними мікроорганізмами, мають різні значення активності ферментних систем, зокрема амінотрансфераз, і відрізняються станом оксидантної та антиоксидантної систем, при цьому досліджені препарати сприяють відновленню антиоксидантного статусу. На підставі проведених досліджень можна стверджувати, що препарати пробіотичних мікроорганізмів, іммобілізованих на високовуглеводних носіях, можна використовувати при лікуванні та профілактиці таких патологічних станів, як гепатит і діабет для корекції вуглеводного та ліпідного обміну.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Балаболкин М. И. *Диабетология*. М.: Медицина, 2000. 671 с.
2. Бобырев В. Н., Почернява В. Ф., Стародубцев С. Г. и др. Специфичность систем антиоксидантной защиты органов и тканей – основа дифференцированной фармакотерапии антиоксидантами // *Эксперим. и клин. фармакология*. 1994. Т. 57(1). С. 47–54.
3. Горячковский А. И. *Клиническая биохимия в лабораторной диагностике*. Одесса: Экология, 2005. 616 с.
4. Дудник Л. Б. Антиоксидантное и антиапоптотическое действие билирубина при патологии печени и желчевыводящих путей: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М., 2004. 44 с.
5. Казмирко В. К., Мальцев В. И., Бутылин В. Ю., Горбеев Н. И. *Свободнорадикальное окисление и антиоксидантная терапия*. К.: Морион, 2004. 160 с.
6. Камышников В. С. *Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике*. Минск: Беларусь, 2002. Т. 1. 495 с. С. 546–447.

7. Капрельянц Л. В., Иоргачова К. Г. Функциональные продукты. Одеса: Друк, 2003. 333 с.
8. Майстровский К. В., Запорожец Т. С., Федянина Л. Н. и др. Влияние иммуномодулятора фукоидана из бурых водорослей *Fucus evanescens* на показатели антиоксидантной системы, липидного и углеводного обмена у мышей // Тихоокеанский мед. журн. 2009. № 3. С. 103–105. [Текст] Режим доступа: <http://www.medn.ru/statyi/malonovyjdialde.html>
9. Селютин С. Н., Селютин А. Ю., Паль А. И. Модификация определения концентрации ТБК-активных продуктов сыворотки крови // Клин. лаб. диагностика. 2000. № 1. С. 14–18.
10. Пат. 68589 Україна МПК G09B 23/28 Спосіб профілактики і лікування цукрового діабету в експерименті / Л.В.Капрельянц, М.І.Гоцуленко, А.О.Данилова та ін. заявник і патентовласник ОНАХТ і ОНУ № u201113887; заявл. 25.11.2011; опубл. 26.03.2012, Бюл. № 6.
11. Granato A., Gores G., Vilei M. T. et al. Bilirubin inhibits bile acid induced apoptosis in rat hepatocytes // Gut. 2003. Vol. 52. P. 1774–1778.
12. Mark-Herbert C. Development and marketing strategies for functional foods // Agbioforum. 2003. Vol. 6. P. 75–78.

Стаття: надійшла до редакції 31.08.12

доопрацьована 19.09.12

прийнята до друку 21.09.12

## THE STATE OF THE ANTIOXIDANT SYSTEM OF DEFENCE FOR THE RATS OF EXPERIMENTAL PATHOLOGY WHEN USING IN THE DIETS PROBIOTIC MICRO-ORGANISMS, WHICH ARE IMMOBILIZED ON A HIGH CARBOHYDRATE MEDIA

A. Danilova, A. Zaporozhenko

*Mechnikov National University of Odessa  
Shampansky Lane, 2, Odessa 65058, Ukraine  
e-mail: olgaivdan@mail.ru*

The state of the antioxidant system of defence for the rats of an alloxanic diabetes mellitus and hepatitis is studied. It is found out that introduction in the complement of ration of probiotic microorganisms, immobilized on high-carbohydrate additions, the state of the antioxidant system of defence, maintenance of littenew dialdehyde, allows to stabilize activity of aminotransferase, basic biochemical indexes of blood with approaching their to the norm. In lipid metabolism occur changes that are characterized by a decrease of  $\beta$ -lipoproteins and cholesterol concentration in blood and increase the concentration of triglycerides both in blood and liver homogenates.

*Keywords:* antioxidant system, diabetes, hepatitis.

**СОСТОЯНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ ЗАЩИТЫ У КРЫС С  
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМИ ПАТОЛОГИЯМИ ПРИ ВВЕДЕНИИ В СОСТАВ  
РАЦИОНА ПРЕПАРАТОВ С ПРОБИОТИЧЕСКИМИ МИКРООРГАНИЗМАМИ****А. Данилова, А. Запорожченко**

*Одесский национальный университет имени И.И.Мечникова  
Шампанский пер., 2, Одесса 65058, Украина  
e-mail: olgaivdan@mail.ru*

Изучено состояние антиоксидантной системы защиты у крыс с аллоксановым сахарным диабетом и гепатитом. Выяснено, что введение в состав рациона пробиотических микроорганизмов, иммобилизованных на высокоуглеводных носителях, позволяет стабилизировать состояние антиоксидантной системы защиты, содержание малонового диальдегида, активность аминотрансфераз, основные биохимические показатели крови с приближением их к норме. В обмене липидов происходят изменения, которые характеризуются понижением концентрации  $\beta$ -липопротеинов и холестерина в крови и повышением концентрации триглицеридов как в крови, так и в гомогенатах печени.

*Ключевые слова:* антиоксидантная система, диабет, гепатит.

## ГЛУТАТИОНОВА СИСТЕМА ЕРИТРОЦИТІВ ЩУРІВ, ІНТОКСИКОВАНИХ ХЛОРПІРИФОСОМ

**Ю.Салига, В. Росаловський, Р. Федяков**

*Інститут біології тварин НААН  
вул. Стуса, 38, Львів 79034, Україна  
e-mail: yursalyha@yahoo.com*

Вивчали вплив хлорпірифосу – токсичної фосфорорганічної сполуки на зміни показників глутатионової системи еритроцитів щурів через різні періоди після його введення тваринам. Встановлено динаміку змін вмісту відновленого глутатіону, активностей глутатіонредуктази, глутатіонпероксидази і глутатіон-S-трансферази в еритроцитах через 1, 3, 6 і 10 діб після надходження досліджуваного ксенобіотика в організм. Виявлені зміни вказаних вище показників свідчать про активну участь глутатионової системи у процесах детоксикації організму після отруєння хлорпірифосом, яке супроводжується оксидативним стресом.

*Ключові слова:* хлорпірифос, антиоксидантна система, глутатіон відновлений, глутатіонпероксидаза, глутатіонредуктаза, глутатіон-S-трансфераза, еритроцити, токсичність.

Хлорпірифос відомий перш за все як діюча речовина багатьох розповсюджених інсектицидів широкого спектру дії. За своєю хімічною будовою це фосфорорганічна сполука – О,О-діетил-О-3,5,6-трихлор-2-піридилфосфотіоат ( $C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$ ). Хлорпірифос інгібує холінестеразні ензими, спричиняючи, зокрема, розлади синаптичної передачі, що до недавнього часу вважалося ключовим і практично єдиним механізмом його токсичності. Останніми роками у світі інтенсифікувалися роботи з вивчення біологічної безпеки застосування низки пестицидів з антихолінестеразними властивостями, зокрема фосфорорганічних. Завдяки цьому були виявлені нові шляхи і способи їх дії на живий організм. Так було встановлено, що хлорпірифос спричиняє виникнення оксидативного стресу, який сам по собі є вагомим фактором токсичності.

Варто наголосити, що у медичній токсикології проблема вискоєфективного лікування отруєнь фосфорорганічними сполуками (ФОС) є далека від вирішення. Крім того, протягом останнього десятиліття вчені з'ясували, що ризики і небезпека для здоров'я людей від застосування ФОС, у тому числі хлорпірифосу, є значно більшими, ніж вважалося раніше [7]. Отже, вивчення впливу цієї речовини на різні біохімічні процеси організму є перспективним і актуальним. Система глутатіону пов'язує всі ланки біохімічних механізмів детоксикації ліпофільних і гідрофільних ксенобіотиків, які функціонують як єдине ціле. Участь глутатіону і зв'язаних з ним систем у процесах біотрансформації та детоксикації ксенобіотиків можна розглядати як один із елементів загальних механізмів, що визначають стійкість організму до токсичної дії ксенобіотиків. Аналіз даних літератури свідчить про те, що рівень GSH, активності ГПО, ГР, Г-S-T – ензимів синтезу і катаболізму GSH можуть використовуватись як критерії оцінки токсичної дії ксенобіотиків різної хімічної природи [1, 2, 8]. Метою даної роботи було дослідити у часовій динаміці стан окремих параметрів глутатионової системи (вміст відновленого глутатіону (GSH), активність глутатіонпероксидази (ГПО), глутатіонредуктази (ГР) і глутатіон-S-трансферази (Г-S-T)) в еритроцитах щурів за умов їх токсичного ураження, викликаного хлорпірифосом.

### Матеріали та методи

Дослідження були проведені на 40 самцях білих нелінійних лабораторних дорослих щурів масою від 180 до 240 г, яких утримували в умовах віварію на стандартному раціоні з необмеженим доступом до питної води. Формування груп тварин проводили за принципом аналогів з урахуванням їх віку і маси. З метою вивчення токсичних властивостей хлорпірифосу тваринам дослідної групи одноразово внутрішньоочеревино вводили цей препарат у розрахунку 30 мг/кг маси тіла. Контрольним тваринам замість хлорпірифосу вводили аналогічний об'єм фізіологічного розчину. Забій тварин проводили методом декапітації під легким ефірним наркозом через 1, 3, 6 і 10 діб після введення токсину. Під час проведення досліджень на тваринах дотримувалися принципів біоетики, законодавчих норм і вимог згідно з положенням «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та наукових цілей» (Страсбург, 1986) і «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001).

Зразки гепаринізованої крові центрифугували при 3000 об/хв упродовж 15 хв на центрифугі MLW T23D (Німеччина). Після відділення плазми еритроцити тричі промивали 0,9% розчином NaCl. Гемолізати отримували шляхом трикратного заморожування-відтавання водних суспензій еритроцитів з подальшим їх центрифугуванням при 8000 об/хв протягом 15 хв на центрифугі MLW T23D (Німеччина).

Вміст відновленого глутатіону (GSH) визначали за рівнем утворення тіонітрофенільного аніону в результаті взаємодії SH-груп глутатіону з 5,5-дитіобіс-2-нітробензойною кислотою [6]. Активність глутатіонпероксидази (КФ 1.11.1.9) визначали за швидкістю окислення відновленого глутатіону до і після інкубації з гідропероксидом третинного бутилу за допомогою кольорової реакції з 5,5-дитіобіс-2-нітробензойною кислотою (ДТНБК), внаслідок чого утворюється забарвлений продукт – тіонітрофенільний аніон [4]. Активність глутатіонредуктази (КФ 1.6.4.2) визначали за зниженням вмісту NADPH при 37°C протягом 1 хв, вимірюючи оптичну проникність за допомогою спектрофотометра СФ-26 при довжині хвилі 340 нм [3]. Активність глутатіон-S-трансферази (КФ 2.5.1.18) визначали за швидкістю утворення кон'югату в реакції з 1-хлор-2,4-динітробензолом, який характеризується максимумом поглинання при довжині хвилі 340 нм [5].

Одержані результати обробляли статистично за допомогою комп'ютерної програми OriginPro 8 з використанням t-критерію Стьюдента. Вірогідно різними вважалися результати при  $P < 0,05$ .

### Результати і їхнє обговорення

Проведені нами дослідження дали змогу простежити основну динаміку змін показників глутатіонової антиоксидантної системи в еритроцитах через 1, 3, 6 і 10 діб після введення дослідним тваринам хлорпірифосу. Як видно з представлених на рис. 1 даних, за дії хлорпірифосу спостерігається значне (майже втричі) зниження вмісту відновленого глутатіону в еритроцитах щурів дослідної групи вже на першу добу експерименту. На 3-тю добу дослідного періоду вміст трипептиду в еритроцитах тварин, яким вводили вказаний токсикант, залишався і надалі, на низькому рівні і становив 41,2% від контрольного значення. Поступове зниження вмісту GSH в еритроцитах свідчить, очевидно, про його інтенсивне споживання у реакціях детоксикації. Варто зазначити, що відновлений глутатіон є основним антиоксидантом еритроцитів; він відіграє роль коферменту при відновленні метгемоглобіну у функціонально активний гемоглобін. Крім того, за його участю здійснюється детоксикація цілої низки токсичних сполук, ксенобіотиків, а також  $H_2O_2$  і

гідроперекисів ліпідів, які утворюються у реакціях взаємодії активних форм Оксигену з ненасиченими жирними кислотами мембрани еритроцитів [1]. Таким чином відновлений глутатіон відіграє важливу роль у збереженні функціональних характеристик мембран еритроцитів. Зниження вмісту GSH у еритроцитах, встановлене у ході наших досліджень, можна пояснити його кон'югацією з продуктами метаболізму хлорпірифосу, а також використанням у процесах біохімічних перетворень активних форм Оксигену (АФО), які, як свідчать дані наукової літератури, індукуються за умов токсичної дії хлорпірифосу на біологічні системи [8]. Ще однією причиною зниження вмісту відновленого глутатіону в гемолізатах еритроцитів тварин дослідної групи може бути дестабілізаційний вплив досліджуваного нами токсиканта на ензими, які беруть участь у підтриманні його фізіологічного рівня.

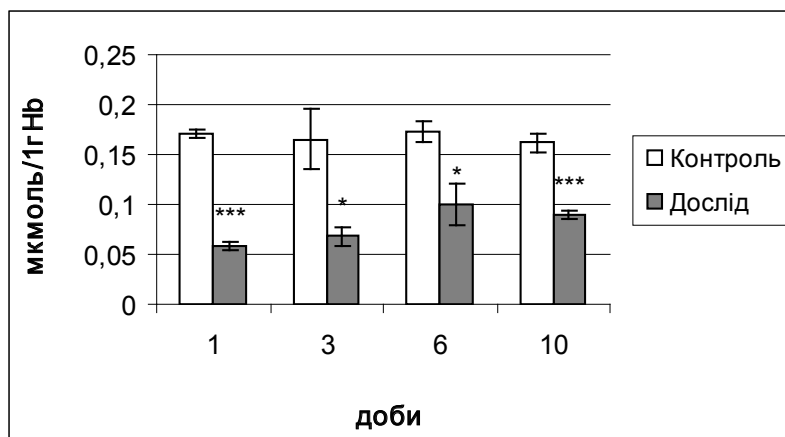


Рис. 1. Вміст відновленого глутатіону в еритроцитах щурів за дії хлорпірифосу. На рис. 1–4: \* – вірогідність відмінностей у значеннях показників між контрольною та дослідними групами тварин (\* – \*\*\*  $p < 0,05$ - $p < 0,001$ ;  $p < 0,05$ - \*,  $p < 0,01$  - \*\*,  $p < 0,001$  - \*\*\*).

Глутатіонредуктаза (ГР) відновлює дисульфідний зв'язок окисленого глутатіону (GSSG) до його сульфгідрильної форми (GSH) [1]. Результати наших досліджень свідчать, що поряд зі зниженням концентрації GSH, за умов інтоксикації хлорпірифосом, спостерігаються зміни в активності ГР (рис. 2). Зокрема, аналіз динаміки цього ензиму за умов токсичного ураження організму тварин, викликаного досліджуваним препаратом, показує, що активність ГР знижувалась на початковому етапі експерименту (1-ша і 3-тя доба), а до значень, притаманних тваринам контрольної групи, наближалась на 6-ту – 10-ту доби експерименту. Відомо, що ГР є ензимом, залежним від NADPH, активність якого пригнічується у разі накопичення окисленої форми нуклеотиду (NADP). Тому причиною раннього зниження глутатіонредуктазної активності еритроцитів за дії хлорпірифосу може бути зниження вмісту NADH і NADPH. Нормальне функціонування у клітині NADPH-залежної глутатіонредуктази є дуже важливим для запобігання окисному ушкодженню мітохондрій, які неспроможні синтезувати GSH *de novo* і тому залежать від інтенсивності відновлення глутатіонредуктазою окисненого глутатіону та його надходження з цитозолу крізь зовнішню мітохондріальну мембрану. У той самий час виявлене через 6–10 діб після введення хлорпірифосу підвищення активності ГР і уповільнення падіння рівня GSH у еритроцитах можна розглядати як компенсаторні зміни, спрямовані на відновлення функціонування антиоксидантної системи глутатіону в клітинах.

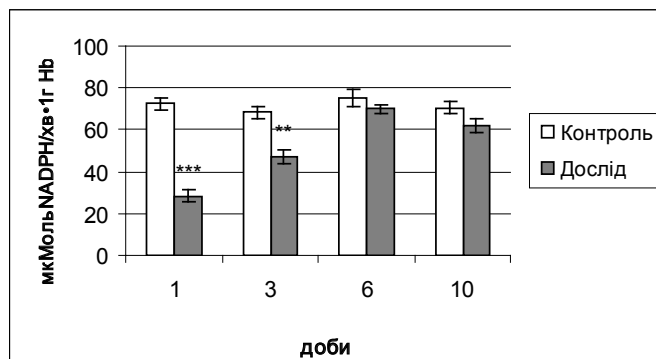


Рис. 2. Активність глутатіонредуктази в еритроцитах щурів за дії хлорпірифосу.

Не менш важливим ферментом глутатіонової системи є глутатіонпероксидаза, що є гомотетрамерним селенопротеїном, який каталізує відновлення  $H_2O_2$ , або органічних гідроперексидів і внаслідок цього захищає клітини від дії реактивних форм Оксигену. Результати проведених досліджень показали (рис. 3), що активність ГПО в еритроцитах щурів після введення досліджуваного токсиканта, починаючи з 1-ї доби, була нижчою у тварин дослідної групи порівняно з тваринами контрольної групи. На 3-тю добу після введення хлорпірифосу ці різниці були найбільш суттєвими. Не виключено, що поступове зниження глутатіонпероксидазної активності в еритроцитах у період з 1 до 3 доби зумовлене вичерпанням доступного пулу GSH та накопиченням продуктів ліпопероксидації. Таке припущення підтверджується даними, представленими на рис. 3, згідно з якими активність глутатіонредуктази – ензиму, відповідального за поповнення внутрішньоклітинного пулу відновленого глутатіону, – є зниженою на 1-шу та 3-тю доби після дії хлорпірифосу (рис. 2). Це узгоджується з думкою про те, що тривала активація ГПО можлива лише за умови підтримання достатньо високого рівня внутрішньоклітинного GSH, який виконує роль не лише субстрату реакцій, але й фактора, необхідного для постійного відновлення розміщених у каталітичному центрі ензиму селенольних груп, що окислюються у процесі глутатіонпероксидазної реакції [2]. Починаючи з 6-ї доби, активність ГПО у тварин дослідної групи почала зростати, і на 10-ту добу різниці між контролем і дослідом практично не було.

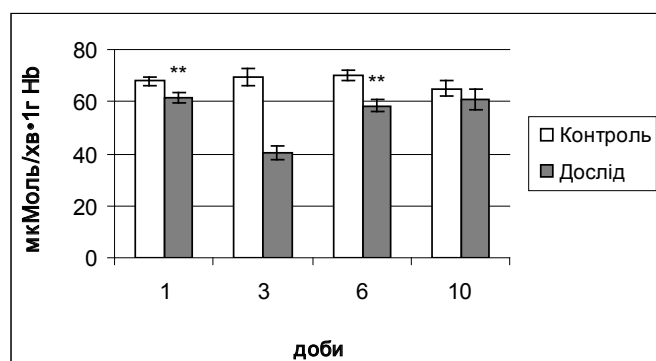


Рис. 3. Активність глутатіонпероксидази в еритроцитах щурів за дії хлорпірифосу.

Що стосується глутатіон-S-трансферази (ГТ), то слід відзначити, що це ензим, який каталізує реакцію кон'югації глутатіону з цілою низкою ксенобіотиків і токсинів, зокрема

багатьох пестицидів. Ксенобіотик, пов'язаний із ГТ, поступово інактивується і виводиться, не пошкоджуючи клітини. Принципово важливою є наявність ГТ в еритроцитах. Це відкриває можливість детоксикації екзогенних гідрофільних сполук уже на перших етапах їх проникнення в організм. Як показали результати наших досліджень (рис. 4), на початкових етапах дослідного періоду спостерігається достовірне зростання активності цього ферменту, а на 6-ту добу у тварин дослідної групи ГТ інгібується на 53%. Це можна пояснити збільшенням навантаження, при якому індукується цитохром *P* 450 і ГТ. Це супроводжується зниженням рівня GSH, який інтенсивно використовується як агент кон'югації.

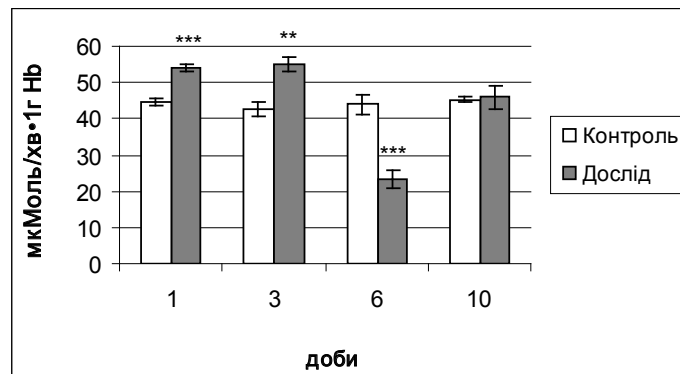


Рис. 4. Активність глутатіон-S-трансферази в еритроцитах щурів за дії хлорпірифосу.

Таким чином, у результаті роботи були отримані дані з динаміки змін основних параметрів глутатіонової системи в еритроцитах протягом перших десяти діб постінтоксикаційного періоду отруєних хлорпірифосом щурів, яка свідчить про активну участь глутатіонової системи у процесах детоксикації.

Виявлено дефіцит ресурсів глутатіонової системи антиоксидантного захисту внаслідок її виснаження протягом 10 діб після інтоксикації організму хлорпірифосом.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Барабой В. А.* Биоантиоксиданты. К.: Книга плюс, 2006. 462 с.
2. *Кулинский В. И., Колесниченко Л. С.* Структура, свойства, биологическая роль и регуляция глутатионпероксидазы // Успехи совр. биологии. 1993. Т. 113. Вып. 1. С. 107–121.
3. Лабораторні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині / В.В. Влізла, Р.С. Федорук, І.Б. Ратич та ін.; за ред. В. В. Влізла. Львів: Сполом, 2012. 762 с.
4. *Моун В. М.* Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах // Лаб. дело. 1986. Т. 12. С. 724–727.
5. *Habig W. H., Pabst M. J., Jacoby W. B.* Glutathin-S-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation // J. Biol. Chem. 1974. Vol. 249. N 22. P. 7130–7139.
6. *Hissin P. J., Hilf R. A.* A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues // Analyt. Biochem. 1976. Vol. 74. P. 214–226.
7. *Needham L. L.* Assessing exposure to organophosphorus pesticides by biomonitoring in epidemiologic studies of birth outcomes // Environ. Health Persp. 2005. Vol. 113. N 4. P. 494–498.
8. *Salyha Y.* Biological effects assessment of chlorpyrifos and some aspects of its neurotoxicity // Visnyk of Lviv University. Biology series. Is. 54. Lviv. 2010. P. 3–14.



9. Carlberg I., Mannervik B. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver // J. Biol. Chem. 1975. Vol. 250. P. 5475–5480.

Стаття: надійшла до редакції 31.08.12

доопрацьована 17.10.12

прийнята до друку 23.10.12

## GLUTATHIONE SYSTEM IN ERYTHROCYTES OF RATS INTOXICATED BY CHLORPYRIFOS

**Yu. Salyha, V. Rosalovsky, R. Fedyakov**

*Institute of Animal Biology NAAS  
38, Stus St., Lviv 79034, Ukraine  
e-mail: yursalyha@yahoo.com*

We studied the influence of chlorpyrifos – toxic organophosphorus compound on changes of the glutathione system in erythrocytes of rats through different periods after the introduction of animals. Dynamics in changes of reduced glutathione content, activities of glutathione reductase, glutathione peroxidase and glutathione-S-transferase in erythrocytes after 1, 3, 6 and 10 days after receipt of the xenobiotic was analysed. Revealed changes in above parameters indicate an active role of glutathione system in detoxification processes after the chlorpyrifos poisoning, accompanied with an oxidative stress.

*Keywords:* chlorpyrifos, antioxidant system, glutathione peroxidase, glutathione reductase, glutathione-S-transferase, erythrocytes, toxicity.

## ГЛУТАТИОНОВАЯ СИСТЕМА ЭРИТРОЦИТОВ КРЫС, ИНТОКСИЦИРОВАННЫХ ХЛОРПИРИФОСОМ

**Ю.Салыга, В. Росаловский, Р. Федяков**

*Институт биологии животных НААН  
ул. Стуса, 38, Львов 79034, Украина  
e-mail: yursalyha@yahoo.com*

Изучали влияние хлорпирифоса – токсического фосфорорганического соединения – на изменения показателей глутатионовой системы эритроцитов крыс через различные периоды после его введения животным. Установлена динамика изменений содержания восстановленного глутатиона, активностей глутатионредуктазы, глутатионпероксидазы и глутатион-S-трансферазы в эритроцитах через 1, 3, 6 и 10 суток после введения исследуемого ксенобиотика в организм. Выявленные изменения указанных выше показателей свидетельствуют об активном участии глутатионовой системы в процессах детоксикации организма после отравления хлорпирифосом, которое сопровождается окислительным стрессом.

*Ключевые слова:* хлорпирифос, антиоксидантная система, глутатион восстановленный, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза, глутатион-S-трансфераза, эритроциты, токсичность.

## ДЕТАЛІЗАЦІЯ ВЕРХ-СПЕКТРІВ ВІЛЬНИХ ОЛІГОСАХАРИДІВ ПЛАЗМИ КРОВІ ЗДОРОВИХ ДОНОРІВ

### І. Письменецька

*Дніпропетровська державна медична академія  
вул. Дзержинського, 9, Дніпропетровськ 49044, Україна  
e-mail: pirina2004@list.ru*

Вільні олігосахариди (ВО) плазми крові здорових волонтерів розподіляли на фракції незаряджених (нейтральних) і заряджених (кислих) гліканів шляхом іонообмінної хроматографії на ЧАЕ-сефадексі. Глікани фракцій аналізували нормальнофазовою вискоєфективною рідинною хроматографією. Показано, що більша частина вільних олігосахаридів – це незаряджені глікани, які концентрувались у трьох головних піках ВЕРХ-спектра та склалися з 5–7 моносахаридних залишків. Спектр заряджених олігосахаридів характеризувався єдиним головним піком гліканів із 8–9 моносахаридних залишків і великою кількістю різноманітних за складом, але з низькою концентрацією, олігосахаридних структур, які включали від 5 до 12 моносахаридних залишків.

*Ключові слова:* вільні олігосахариди, плазма крові людини, ВЕРХ-спектри.

Глікозилювання, процес приєднання до біомолекул залишків вуглеводів (гліканів), є найпоширенішою модифікацією білків і ліпідів. Більш ніж 50% усіх білків ссавців – це глікопротеїни, у модифікації яких бере участь майже 600 ферментів і мембранних транспортерів [18]. У багатоступеневих і різноманітних процесах глікозилювання, наприклад, тільки білків задіяно більш ніж 1% усіх генів людини [13, 17], що свідчить про надзвичайну важливість цього процесу посттрансляційної модифікації.

Глікани глікокон'югатів виконують різноманітні функції, які не завжди можливо диференціювати від функції самого білка чи ліпиду. Але відомо, що саме залишки вуглеводів сприяють підвищенню розчинності глікопротеїнів, їхньому захисту від протеолізу, належному фолдингу, внутрішньоклітинному транспорту і секреції, а також взаємодії молекул між собою. Вони беруть участь у будові глікокаліксу, забезпечуючи специфічні взаємодії з лігандами, міжклітинні взаємодії та передачу сигналів усередину клітин. Глікани глікокон'югатів задіяні у формуванні імунної відповіді, зсіданні крові. Саме ці макромолекули забезпечують індивідуальність організмів і їхню пластичність [10, 17].

Глікокон'югати існують у вигляді багатьох глікоформ. Співвідношення та структура гліканів у їхньому складі в організмі людини суттєво змінюються в процесі розвитку, старіння чи при патологічних станах. Тому глікокон'югати інтенсивно вивчаються для встановлення закономірностей змін в організмі з метою покращення діагностики, моніторингу терапевтичних заходів, для пошуку мішеней застосування ліків і для розробки лікарських засобів [7, 14, 19].

Залежно від способу приєднання до білка чи ліпиду, глікани розподіляють на 6 класів: 1) N-глікани, що приєднуються через нітроген аспарагіну; 2) O-глікани, які зв'язуються через гідроксильну групу серину, треоніну, тирозину, гідроксипроліну чи гідроксилізіну; 3) C-глікани, які приєднуються до карбону триптофану; 4) фосфоглікани, які зв'язуються через фосфатний залишок фосфосерину; 5) глікани глікозилфосфотидилінозитольних якорів; 6) глікани глікозаміногліканів [11].

Вільні олігосахариди (ВО) – це не зв'язані з глікокон'югатами N- і O-глікани, продукти їх поетапного синтезу та розщеплення. Відомі три джерела утворення ВО у клітинах: 1) початкові етапи N-глікозилювання – формування глікана-попередника [9], 2) розщеплення глікопротеїнів із порушеною конформацією – асоційована з ендоплазматичним ретикулулом деградація [5, 6, 8, 12], 3) лізосомальний гідроліз нативних глікокон'югатів [20]. Цікавою особливістю цих молекул є те, що частина з них (із першого та другого джерела) з'являються раніше, ніж зрілі глікокон'югати. Завдяки існуванню у клітинах механізмів контролю якості третинної та четвертинної структури протеїнів і розщепленню молекул зі зміненою структурою поява аберантних ВО передуює появі аберантних глікокон'югатів у зоні їх функціональної дії.

Вільні олігосахариди інтенсивно вивчають усередині клітин, але мало що відомо про ВО біологічних рідин. Джерела та механізми проникнення їх у кров чи сечу невідомі, але була показана їхня автентичність внутрішньоклітинним олігосахаридам [4]. Виявлення таких структур і їх аналіз можуть надати цінну інформацію стосовно якомога ранішого початку порушення глікозилювання. Таким чином, серед ВО можуть бути ранні маркери захворювань і прогностичні маркери перебігу лікування.

Пошук змін ВО при патологічних станах потребує перш за все наявності інформації щодо їхньої структурної будови та співвідношення різних фракцій у нормі. У наших попередніх дослідженнях були отримані ВЕРХ-спектри загального пулу вільних олігосахаридів плазми крові здорових донорів [3]. Метою даної роботи було проаналізувати ВЕРХ-спектри вільних олігосахаридів плазми крові здорових волонтерів за умов додаткового фракціонування гліканів на незаряджені (нейтральні) та заряджені (кислі).

#### Матеріали та методи

Плазма крові (n=10) здорових волонтерів (Британський Національний банк крові) була надана доктором Джоан Міллер з Інституту глікобіології Оксфордського університету. Для нормальнофазової ВЕРХ використовували реактиви фірми VWR International і Sigma-Aldrich.

Вільні олігосахариди аналізували шляхом нормальнофазової ВЕРХ після маркування флуоресцентним барвником – 2-амінобензойною (антраніловою) кислотою (2-AA) на хроматографі фірми Waters (Велика Британія) з колонкою 4.6x250-mm TSK gel-Amide 80 (Anachem, Luton, Beds, Велика Британія) згідно з методикою, наведеною у роботах Neville D.C.A. et al. [15, 16]. Підготовку зразків плазми для хроматографічного аналізу проводили згідно з наведеними раніше методиками [1–3]. Депротейнізацію нативної плазми проводили шляхом осадження білків 10% трихлороцтовою кислотою (ТХО) з подальшим центрифугуванням упродовж 10 хв при 3000 об/хв. Залишки білків із плазми вилучали шляхом фільтрації за допомогою фільтра з гідрофільною поліфлуороетиленовою (PTFE) мембраною (Millex-LN, 0.45  $\mu\text{m}$ , Millipore Corp., США). Для вилучення глюкози з біологічної рідини застосовували адсорбційну хроматографію на пористому графіті з використанням колонки PGC (Thermo Electron Corp., Runcorn, UK) на 1мл (25мг/мл) згідно з методикою [4]. Марковані антраніловою кислотою глікани поділяли на нейтральні та заряджені іонообмінною хроматографією на ЧАЕ-сефадексі (Q25-120) після нанесення їх на колонку та промивки Milli-Q™ H<sub>2</sub>O шляхом елюції нейтральних гліканів оцтовою кислотою, а заряджених – амоній ацетатом згідно з Neville D.C.A. et al. [16]. Хроматографічні піки характеризували у глюкозних одиницях (ГО) шляхом порівняння із глюкозними олігомерами частково гідролізованого декстрану як зовнішнього стандарту згідно з Neville D.C.A. et al.

[15]. Частково гідролізований декстран утворює хроматографічний спектр, у якому кожен наступний пік має на 1 залишок глюкози більше ніж попередній, і тому дає змогу охарактеризувати кожен пік хроматограми, що аналізується, у глюкозних одиницях (ГО) згідно з приблизною кількістю мономерних залишків у його складі. Для збору й обробки даних застосовували комп'ютерні програми Waters Millennium чи Waters Empower, Peak Time та Microsoft Office Excel 2003.

### Результати і їхнє обговорення

Досліджували олігосахариди, що мали у своєму складі 4 та більше моносахаридних залишків, тому аналізували ВЕРХ-спектри у відрізку часу від 25 до 45 хв.

В усіх проаналізованих зразках у складі загальної фракції було ідентифіковано 4 головних піки, що мали такі характеристики: I –  $27,33 \pm 0,01$  хв ( $5,670 \pm 0,003$  ГО), II –  $30,81 \pm 0,01$  хв ( $6,640 \pm 0,004$  ГО), III –  $33,66 \pm 0,01$  хв ( $7,550 \pm 0,004$  ГО) та IV –  $36,89 \pm 0,01$  хв ( $8,710 \pm 0,004$  ГО). Результат розподілу загальних ВО на фракції залежно від заряду наведений на рис. 1.

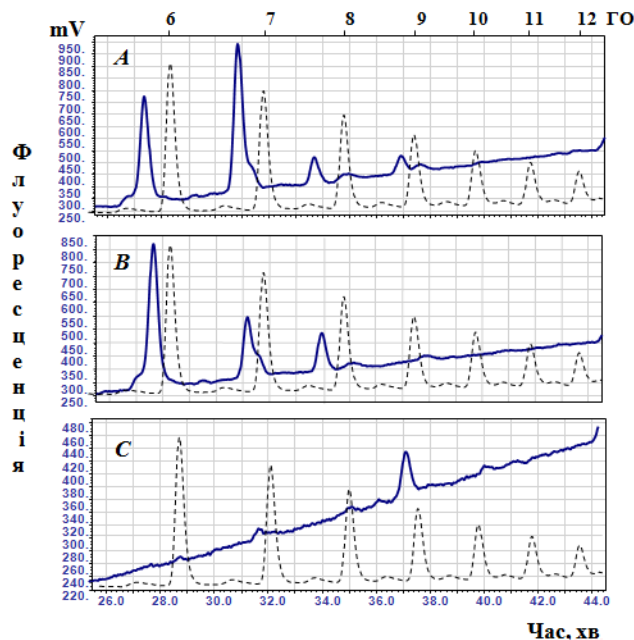


Рис. 1. ВЕРХ-спектри вільних олігосахаридів плазми крові здорових донорів: *A* – загальний спектр; *B* – спектр незаряджених гліканів; *C* – спектр заряджених гліканів. Пунктиром показано спектр частково гідролізованого декстрину (зовнішній стандарт).

У фракції нейтральних ВО (рис. 1, *B*) було ідентифіковано і проаналізовано три головних піки –  $5,670 \pm 0,003$  ГО,  $6,640 \pm 0,004$  ГО та  $7,550 \pm 0,004$  ГО, які відповідали I, II та III головним пікам загальної фракції (рис. 1, *A*). Фракція заряджених гліканів формувала тільки один головний пік (рис. 1, *C*), який відповідав IV піку ( $8,710 \pm 0,004$  ГО) загальної фракції. Спектри заряджених ВО, крім головного піку, мали велику кількість малих піків на обраному відрізку хроматограми. Відомо, що заряд гліканів може обумовлюватися наявністю в їхньому складі залишків органічних (сіалових) чи неорганічних (фосфатної, сульфатної) кислот. Потенційно джерелами сіалованих ВО плазми крові є: внутрішньоклітинні глікани (при розщепленні зрілих глікокон'югатів у лізосомах, а також при гіпотетично

можливій деградації глікокон'югатів, що синтезуються в апараті Гольджі) та позаклітинні глікокон'югати (при відщепленні гліканів від глікопротеїнів чи гліколіпідів на поверхні клітин чи сіалоолігосахаридів у плазмі глікозидазами крові). Для фосфорильованих ВО існує специфічне джерело – початкові стадії N-глікозилювання.

Як і у випадку спектрів загальних ВО, спектри нейтральних і заряджених гліканів у різних зразках мали схожі профілі з відмінностями у мінорних компонентах. Результати хроматографічного розподілу кислих ВО у різних зразках наведені на рис. 2.

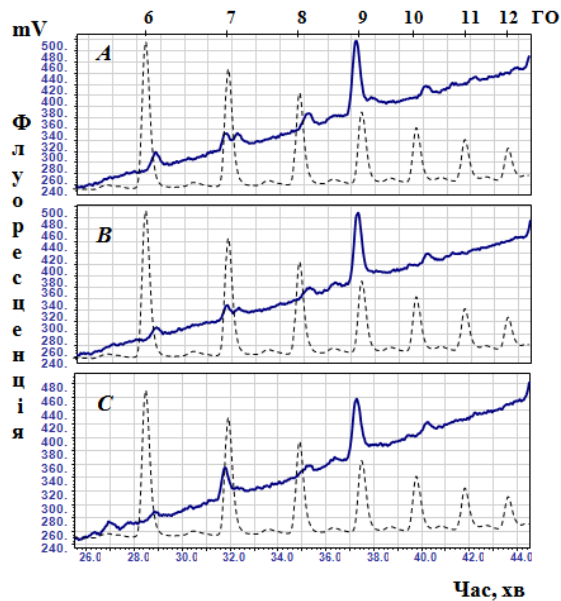


Рис. 2. ВЕРХ-спектри заряджених вільних олігосахаридів плазми крові здорових донорів: А, В, С – різні зразки. Пунктиром показано спектр частково гідролізованого декстрану (зовнішній стандарт).

Розподіл загального пулу ВО на фракції незаряджених і заряджених гліканів показав, що більша частина олігосахаридів плазми крові здорових волонтерів – це незаряджені глікани, що складаються переважно з 5–7 моносахаридних залишків. Лише незначна частина гліканів цієї фракції має більше моносахаридних залишків у своєму складі. Єдиний головний пік фракції заряджених гліканів – це олігосахариди, які містили 8–9 моносахаридних залишків. У спектрі були присутні також кислі олігосахариди з низькою концентрацією, які містили від 5 до 12 моносахаридних залишків. Фракціонування вільних олігосахаридів на кислі та нейтральні підтверджує значну стабільність ВЕРХ-спектрів ВО плазми крові здорових донорів.

Експериментальну роботу було виконано при фінансовій підтримці міжнародного гранту International Union Against Cancer ICREET (ICR/09/044) та Інституту глікобіології Оксфордського університету (м. Оксфорд, Велика Британія) у лабораторії доктора Террі Д. Баттерса (Terry D. Butters).

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Письменецька І. Ю., Баттерс Т. Д. Хроматографічний аналіз іммобілізованих на паперових носіях модельних олігосахаридів // Ученые записки Таврич. гос. ун-та. Сер. биол., хим. 2011. Т. 24 (63). № 4. С. 183–191.

2. Письменецька І. Ю. Вплив іммобілізації та депротейнізації плазми крові на спектр вільних олігосахаридів // Вісн. Київ. ун-ту. Сер. біол. 2012. № 60. С. 27–29.
3. Письменецька І. Ю. Хроматографічні спектри вільних олігосахаридів плазми крові здорових донорів // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2012. Вип. 58. С. 74–79.
4. Alonzi D. S., Neville D. C., Lachmann R. H. et al. Glucosylated free oligosaccharides are biomarkers of endoplasmic reticulum alpha-glucosidase inhibition // *Biochem. J.* 2008. Vol. 409. P. 571–680.
5. Anelli T., Sitia R. Protein quality control in the early secretory pathway // *The EMBO J.* 2008. Vol. 27. P. 315–327.
6. Apaja P. M., Xu H., Lukacs G. L. Quality control for unfolded proteins at the plasma membrane // *J. Cell Biol.* 2010. Vol. 191. N 3. P. 553–570.
7. Arnold J. N., Saldova R., Hamid U. M. et al. Evaluation of the serum N-linked glycome for the diagnosis of cancer and chronic inflammation // *Proteomics.* 2008. Vol. 8. N 16. P. 3284–3293.
8. Braakman I., Bulleid N. J. Protein folding and modification in the mammalian endoplasmic reticulum // *Annu. Rev. Biochem.* 2011. Vol. 80. P. 71–99.
9. Chantret I., Moore S. E. H. Free oligosaccharide regulation during mammalian protein N-glycosylation // *Glycobiology.* 2008. Vol. 18. N 3. P. 210–224.
10. Drickamer K., Taylor M. E. *Introduction to Glycobiology* (2nd ed.). Oxford University Press, USA, 2006. P. 97–111.
11. *Glycosciences. Status and Perspectives.* Edited by H.-J. Gabius, S. Gabius. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA Weinheim. 2002. P. 25–26.
12. Hoseki J., Ushioda R., Nagata K. Mechanism and components of endoplasmic reticulum associated degradation // *J. Biochem.* 2010. Vol. 147. N 1. P. 19–25.
13. Lowe J. B., Marth J. D. A genetic approach to mammalian glycan function // *Annu. Rev. Biochem.* 2003. Vol. 72. P. 643–691.
14. Narimatsu H., Sawaki H., Kuno A. et al. A strategy for discovery of cancer glyco-biomarkers in serum using newly developed technologies for glycoproteomics // *FEBS J.* 2010. Vol. 277. N 1. P. 95–105.
15. Neville D. C., Coquard V., Priestman D. A. et al. Analysis of fluorescently labelled glycosphingolipid-derived oligosaccharides following ceramide glycanase digestion and anthranilic acid labelling // *Anal Biochem.* 2004. Vol. 331. P. 275–282.
16. Neville D. C., Dwek R. A., Butters T. D. Development of a single column method for the separation of lipid- and protein-derived oligosaccharides // *J. Proteome Res.* 2009. Vol. 8. P. 681–687.
17. Ohtsubo K., Marth J. D. Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease // *Cell* 2006. Vol. 126. P. 855–867.
18. Rudd P. M., Telford J., Byrne J. C. et al. Glycans as biomarkers of disease // Abstracts of EMBO NICE Meeting 2012, EuroGlycoScience Forum “Protein glycosylation in human disease” 22 September 2012. P. 53.
19. Saldova R., Huffman J. E., Adamczyk B. et al. Association of medication with the human plasma N-glycome // *J. Proteome Res.* 2012. Vol. 11. N 3. P. 1821–1831.
20. Winchester B. Lysosomal metabolism of glycoproteins // *Glycobiology.* 2005. Vol. 15. N 6. P. 1R–15R.

Стаття: надійшла до редакції 02.04.12

доопрацьована 29.10.12

прийнята до друку 05.11.12

## SPECTRA DETALIZATION OF BLOOD PLASMA FREE OLIGOSACCHARIDES OF HEALTHY VOLUNTEERS

I. Pismenetska

*Dnipropetrovsk State Medical Academy  
9, Dzerzhynskiy St., Dnipropetrovsk 49089, Ukraine  
e-mail: pirina2004@list.ru*

Free oligosaccharides of blood plasma of healthy volunteers were separated into fractions of uncharged (neutral) and charged (acidic) glycans with ion-exchange chromatography on QAE-Sephadex. Glycans of the fractions were analyzed by normal-phase high performance liquid chromatography (HPLC). It has been shown that most of the free oligosaccharides are uncharged glycans concentrated in three main peaks of the HPLC-profiles and consisted of 5–7 monosaccharide residues. The spectrum of charged oligosaccharides has been characterized by one main peak of glycans with 8–9 monosaccharide residues and by the structures included from 5 to 12 monosaccharide residues, more diverse in composition, but with a low concentration.

*Keywords:* free oligosaccharides, human blood plasma, HPLC profiles.

## ДЕТАЛИЗАЦИЯ ВЭЖХ-СПЕКТРОВ СВОБОДНЫХ ОЛИГОСАХАРИДОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ

И. Письменецкая

*Днепропетровская государственная медицинская академия  
ул. Дзержинского, 9, Днепропетровск 49089, Украина  
e-mail: pirina2004@list.ru*

Свободные олигосахариды плазмы крови здоровых волонтеров разделяли на фракции незаряженных (нейтральных) и заряженных (кислых) гликанов методом ионообменной хроматографии на КАЕ-сефадексе. Гликаны фракций анализировали нормальнофазовой высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ). Было показано, что большая часть свободных олигосахаридов – это незаряженные гликаны, которые концентрировались в трех главных пиках ВЭЖХ-спектра и состояли из 5–7 моносахаридных остатков. Спектр заряженных олигосахаридов характеризовался одним главным пиком гликанов из 8–9 моносахаридных остатков и большим количеством разнообразных по составу, но с низкой концентрацией, структур, которые включали от 5 до 12 моносахаридных остатков.

*Ключевые слова:* свободные олигосахариды, плазма крови человека, ВЭЖХ-спектры.

## ВПЛИВ ПОЄДНАНОЇ ДІЇ ІОНІЗУЮЧОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ ТА ХІМІОПРЕПАРАТІВ НА ВМІСТ ПРОАПОПТОЗНОГО ЛІПІДУ ЦЕРАМІДУ В КАРЦИНОМІ ГЕРЕНА

Т. Сегеда\*, Н. Мітряєва, Т. Бакай, Л. Гребіник

*Державна установа «Інститут медичної радіології  
імені С.П. Григор'єва НАМН України»  
вул. Пушкінська, 82, Харків 61024, Україна  
e-mail: tatyana.segeda@mail.ru*

Досліджували вплив поєднаної дії різних видів іонізуючого випромінювання та хіміопрепаратів (таксотер, цисплатин) на вміст проапоптозних ліпідів цераміду і сфінгомеліну в карциномі Герена щурів. Встановлено, що поєднана дія опромінення та хіміопрепаратів є індуктором накопичення у тканині пухлини Герена активатора апоптозу ракових клітин цераміду, що може підвищувати радіочутливість. Показано, що поєднана дія опромінення й таксотеру підвищує рівень вмісту цераміду за рахунок активації синтезу *de novo*, тоді як цисплатин активує сфінгомеліновий шлях накопичення цераміду в пухлинних клітинах.

*Ключові слова:* іонізуюче випромінювання, хіміопрепарати, церамід, сфінгомелін, апоптоз.

Відомо, що однією з важливих причин радіорезистентності пухлинних клітин є порушення сигнальних шляхів, які ведуть до апоптозу. Показано, що критичним компонентом сигналіngu в опромінених клітинах є метаболіт сфінголіпідів – церамід (ЦМ), який відіграє центральну роль у сигнальній трансдукції, в регуляції диференціювання клітин, арешті клітинного циклу та бере участь в апоптозі [3, 6, 7]. Доведено, що генерація ЦМ є важливим етапом в індукції загибелі пухлинних клітин під дією іонізуючої радіації (ІР) [5, 10, 11]. Саме з порушенням у пухлинних клітинах різних ланцюгів обміну зі зниженням вмісту проапоптозного ліпідів ЦМ пов'язують явище радіорезистентності. Так, експериментальними дослідженнями показано, що клітинні лінії, резистентні до гамма-опромінення та доксирубіцину, і не продукують ЦМ [2, 8]. Одним із перспективних напрямів підвищення ефективності променевої терапії вважають використання радіомодифікаторів, дія яких спрямована на посилену продукцію ЦМ у клітинах пухлини. Протипухлинні препарати таксотер і цисплатин використовують як радіосенсибілізатори. Цитотоксичний ефект цих препаратів пов'язаний з активацією апоптозу через ЦМ-опосередковані шляхи. Однак механізми накопичення, обміну сфінголіпідів при поєднаній дії різних видів ІР та хіміопрепаратів у пухлині залишаються маловивченими. Метою даної роботи було вивчення поєднаного впливу рентгенівського або високоенергетичного фотонного випромінювання та хіміопрепаратів (таксотер, цисплатин) на вміст сфінголіпідів – ЦМ і сфінгомеліну (СФМ) у клітинах карциноми Герена щурів.

### Матеріали та методи

Дослідження виконане з використанням піддослідних 81 щура-самиці лінії Вістар масою 160–180 г. Усі дослідження на тваринах виконували з дотриманням Міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей (Страсбург, 1985 р.) і Національних загальних



етичних принципів експериментів на тваринах (Україна, 2001 р.). Експеримент починали на 10–12 добу після перещеплення пухлини, коли розміри пухлинного вузла досягали у діаметрі 1,5–2,0 см.

У першій серії експерименту опромінення пухлини проводили на апараті РУМ-17 (рентгенівське випромінювання) за стандартних технічних умов: напруга – 190 кВ, сила струму – 10 мА, фільтри: 0,5 мм Cu плюс 1 мм Al, коефіцієнт розподілу поглинутої дози у повітрі – 0,981 Гр/хв, фокусна відстань 30 см. Опряміювали фракційно при поглинутій дозі на фракцію 5 Гр, час опромінення – 4 хв 39 с, з інтервалом між сеансами 24 год, сумарна поглинута доза на зону росту пухлини становила 10 Гр. У другій серії експерименту опромінення пухлини проводили на лінійному прискорювачі Clinac 600 C (високоенергетичне фотонне випромінювання). Clinac 600 C – енергія фотонів 5 МеВ, потужність дози 4 Гр/хв, розмір поля 5×5 см<sup>2</sup>, глибина 1 см. Розрахункова кількість моніторних одиниць для опромінення пухлини Герена в дозі 5 Гр дорівнювала 515. Опряміювали двома фракціями по 5 Гр, з інтервалом між сеансами 24 год. Хіміопрепарати вводили внутрічеревинно за 24 год до першого сеансу опромінення в дозах: таксотер («Рор Пуленок Рорер») – 8 мг/кг маси тіла, цисплатин («Эбеве») 6,0 мг/кг маси тіла. Знеживлення тварин здійснювали через 24 год після опромінення або введення хіміопрепарату.

Екстракцію ліпідів з гомогенату тканини проводили за методом Фолча [4]. ЦМ і СФМ розділяли за допомогою хроматографії в тонкому шарі силікагелю на комерційних пластинках Sorbfil (АО «Сорбполимер», Россия). Екстракти ліпідів, які застосовували для аналізу сфінголіпідів, випарювали у вакуумі й інкубували 60 хв при 37°C у середовищі: хлороформ-метанол (1:1, v/v), у яке додавали NaOH (0,1 моль) для гідролізу ацилгліцеринів. Ліпіди знову екстрагували і використовували для розподілу на класи (СФМ і ЦМ) у системі розчинників: хлороформ-етилацетат-ізопропіловий спирт-метанол – 0,25% KCl (25:25:25:10:9). Ліпіди (СФМ, ЦМ) проявляли в парах йоду, порівнюючи зі стандартами. Для ідентифікації ліпідів використовували стандарти ЦМ і СФМ (Sigma). Білок визначали за методом Лоурі [8].

Статистичний аналіз даних проводили за допомогою статистичних програм для ПК «Statistica, version 5» при використанні непараметричних методів для малих вибірок і критерію Вілкоксона-Манна-Вітні.

### Результати і їхнє обговорення

Проведені дослідження показали, що у щурів із перещепленою карциномою Герена, під впливом як рентгенівського, так і високоенергетичного фотонного опромінення достовірно не змінюється вміст ЦМ у пухлинній тканині, порівняно з контрольною групою (див. таблицю). Відсутність активації накопичення ЦМ у пухлині щурів при опроміненні може бути однією з причин радіорезистентності карциноми Герена. Оскільки пухлина резистентна до дії вибраних режимів фракціонованого опромінення, вона може бути використана як модель для вивчення механізмів впливу радіосенсибілізації протипухлинними препаратами на індукцію накопичення проапоптозного ліпиду – ЦМ.

Введення піддослідним тваринам таксотеру або цисплатину або їхнього поєднання з дією ІР супроводжувалося підвищенням у тканині пухлини вмісту ЦМ порівняно з контролем. Зокрема, під впливом таксотеру вміст ЦМ у пухлинній тканині підвищувався в 2,9, а під впливом цисплатину – в 2,3 рази. Поєднана дія рентгенівського опромінення й таксотеру або цисплатину супроводжувалося підвищенням вмісту в пухлині проапоптозного ліпиду ЦМ в 5,6 і в 4,2 рази відповідно. За умов поєднаної дії високоенергетичного фотонного опромінення та хіміопрепаратів вміст ЦМ у пухлинній тканині також підвищувався в 6,3 рази при дії таксотеру і в 4,9 рази – при дії цисплатину. Показано, що за умов

поєднаної дії опромінення та хіміопрепаратів зростав рівень вмісту ЦМ порівняно з опроміненням, що здійснювалося окремо (див. таблицю). Відомо, що під впливом іонізуючого випромінювання вміст ЦМ може підвищуватися в пухлинних клітинах двома шляхами: активацією ферменту сфінгомелінази, і, таким чином, індукцією перетворення СФМ в ЦМ або посиленням синтезу ліпідів *de novo* [10, 11].

Вплив рентгенівського й високоенергетичного фотонного опромінення та хіміопрепаратів на вміст кераміду і сфінгомеліну в карциномі Герена, нмоль/мг білка, ( $\bar{X} \pm S\bar{x}$ )

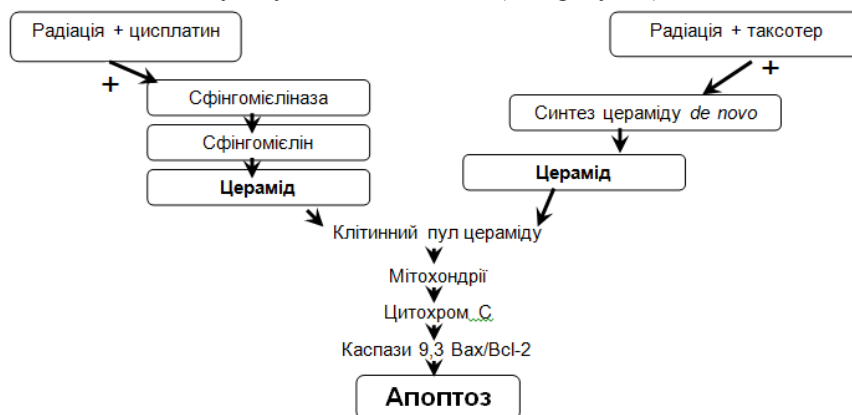
Група піддослідних тварин	n	Церамід	Сфінгомелінін
Контроль (пухлина)	9	3,24±0,31	44,11±3,05
Опромінення (РУМ)	9	4,28±0,87	34,80±3,84
Опромінення (Clinac 600 С)	9	4,48±0,92	31,63±2,96
Таксотер	9	9,56±1,12*	41,13±3,09
Цисплатин	9	8,29±1,41*	25,22±1,92*
Опромінення (РУМ) + таксотер	9	18,23±2,71*/#	42,74±4,37
Опромінення (РУМ) + цисплатин	9	13,47±2,72*/#	18,06±2,64*/#
Опромінення (Clinac 600 С) + таксотер	9	20,32±2,61*/#	42,43±3,84
Опромінення (Clinac 600 С) + цисплатин	9	15,79±3,38*/#	17,41±2,53*/#

**Примітка.** \* – вірогідність різниці щодо контрольної групи,  $P < 0,05$ ; # – вірогідність різниці щодо опромінення,  $P < 0,05$ .

Для вивчення механізмів активації накопичення ЦМ у пухлині досліджували вплив опромінення та хіміопрепаратів на зміну вмісту СФМ у клітинах, який, як було показано вище, є субстратом сфінгомелінази, що каталізує процес перетворення СФМ в ЦМ. Як видно з представлених у таблиці даних, при введенні таксотеру або при його поєднанні з дією рентгенівського чи високоенергетичного фотонного випромінювань не спостерігалось змін вмісту СФМ порівняно з контролем. Результати дають змогу припустити, що накопичення ЦМ, індуковане таксотером, не пов'язане з активацією сфінгомеліназ і перетворенням СФМ у ЦМ. Враховуючи, що таксотер не змінює вміст СФМ – субстрату сфінгомелінази у тканині пухлини, можна виключити активацію цього ферменту в даних умовах досліджу. Водночас доведено, що таксотер активує основний фермент синтезу ЦМ *de novo* – серинпальмітоїлтрансферазу і, таким чином, посилює синтез ліпиду та підвищує його вміст у пухлинних клітинах [12]. З'ясування цих питань присвячені інші наші дослідження.

При використанні цисплатину або його поєднаної дії з рентгенівським і високоенергетичним фотонним випромінюванням встановлено, що підвищення вмісту ЦМ відбувається на фоні зниження рівня СФМ у пухлині Герена. Зокрема, при введенні цисплатину вміст СФМ знижується в 1,7 разу, при поєднаній дії рентгенівського або високоенергетичного фотонного випромінювання та цисплатину – в 2,4 та в 2,5 разу відповідно. Це свідчить про те, що генерація ЦМ здійснюється шляхом деградації СФМ. У зв'язку з цим можна припустити, що таксотер і цисплатин шляхом активації різними механізмами синтезу проапоптозного ліпиду ЦМ, а саме: таксотер індукує зростання вмісту ЦМ у пухлині переважно шляхом активації його синтезу *de novo*, тоді як цисплатин стимулює утворення ЦМ за рахунок ферментативного гідролізу СФМ сфінгомеліназою, при опроміненні підвищують радіочутливість карциноми Герена. На користь такого припущення свідчать дані досліджень, проведених на клітинах раку легень, щодо суттєвого посилення ефекту ІР шляхом активації апоптозу пухлинних клітин при введенні екзогенного ЦМ [1]. Проте поєднана дія рентгенівського або високоенергетичного фотонного випромінювання та протипухлинних препаратів (таксотер і цисплатин) є потужним активатором накопичення у тканині пухлини відомого індуктора апоптозу ракових клітин – ЦМ.

Зважаючи на отримані результати проведених досліджень, а також на дані літератури, пропонуємо схему поєднаного впливу опромінення та хіміопрепаратів на індукцію ЦМ-опосередкованого апоптозу в пухлинних клітинах (див. рисунок)



Вплив поєднаної дії опромінення та хіміопрепаратів на вміст цераміду й індукцію церамід-опосередкованого апоптозу пухлинних клітин.

Отже, в роботі проведені дослідження впливу рентгенівського та високоенергетичного фотонного опромінення, хіміопрепаратів таксотеру і цисплатину та їх поєднаної дії на вміст ЦМ і СФМ у тканині пухлини Герена. Виявлена резистентність тканини карциноми до дії застосованих при цьому режимів опромінення. Доведено, що поєднана дія іонізуючого випромінювання та протипухлинних препаратів є індуктором накопичення проапоптозного ліпиду ЦМ у карциномі Герена і здатна посилювати радіочутливість пухлини. Поєднана дія опромінення й таксотеру підвищує вміст ЦМ за рахунок активації синтезу *de novo*, тоді як цисплатин активує сфінгомієліновий шлях накопичення ЦМ у пухлинних клітинах.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Bartke N., Hannun Y. A. Bioactive sphingolipids: metabolism and function // *J. Lipid Research*. 2009. Vol. 50. P. 591–596.
2. Bionda C., Hadchity E., Alphonse G. et al. Radioresistance of human carcinoma cells is correlated to a defect in raft membrane clustering // *Free Radic. Biol. Med.* 2007. Vol. 43. P. 681–694.
3. Carpinteiro A., Dumitru C., Schenck M., Gulbins E. Ceramide-induced cell death in malignant cells // *Cancer Letters*. 2008. Vol. 264. N 1. P. 1–10.
4. Folch J., Lees M., Stanley G. A simple method for the isolation and purification of total lipid from animal tissues // *J. Biol. Chem.* 1957. Vol. 226. P. 497-509.
5. Gulbins E., P. Li. Physiological and pathophysiological aspects of ceramide // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2006. Vol. 290. P. 11-26.
6. Hannun Y. A., Obeid L. M. Principles of bioactive lipid signaling: Lessons from sphingolipids // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2008. Vol. 9. N 2. P. 139–150.
7. Kolesnick R., Fuks Z. Radiation and ceramide-induced apoptosis // *Oncogene*. 2003. Vol. 22. P. 5897–5906.
8. Lowry O., Rosebrough N., Farr A. Protein measurement with the folin phenol reagent // *Ibid.* 1951. Vol. 193. P. 265-275.

9. *Medler T., Petrusca D., Lee P.* et al. Apoptotic sphingolipid signaling by ceramides in lung endothelial cells // *Am. J. Res. Cell Mol. Biol.* 2008. Vol. 38. N 6. P. 639–646.
10. *Ogretmen B., Hannum Y. A.* Biological active sphingolipid in cancer pathogenesis treatment // *Nat. Rev. Cancer.* 2004. Vol. 4. P. 604–616.
11. *Reynolds C. P., Maurer B. J., Kolesnik R. N.* Ceramide synthesis and metabolism as a target for cancer therapy // *Cancer Lett.* 2004. Vol. 206. P. 169–180.
12. *Swanton C., Merani M.* Regulators of mitotic arrest and ceramide metabolism are determinants of sensitivity to paclitaxel and other chemotherapy eutic drugs // *Cancer Cell.* 2007. Vol. 7. N 10. P. 498–512.

*Стаття: надійшла до редакції 13.07.12*

*доопрацьована 30.10.12*

*прийнята до друку 31.10.12*

## **INFLUENCE OF IONIZING RADIATION AND CHEMOTHERAPEUTIC DRUGS ON PROAPOPTOTIC CERAMIDE LEVEL IN GUERIN'S CARCINOMA**

**T. Segeda, N. Mitryaeva, T. Bakai, I. Grebenik**

*State Institution "S.P. Grigoriev Medical Radiology Institute  
Academy of Medical Science of Ukraine"  
82, Pushkinska St., Kharkiv 61024, Ukraine  
e-mail: tatyana.segeda@mail.ru*

It was investigated the influence of action of different kinds of radiation and chemotherapeutic drugs (taxothere and cisplatin) on the proapoptotic lipids (ceramide and sphingomyeline) in Guerin's carcinoma of rats. It was established that combined action of irradiation and chemotherapeutic drugs on tumor of rats leads to accumulation of ceramide, which produces apoptosis and enhances the radiation sensitivity. It has been shown that simultaneous action of irradiation and taxothere initiates the ceramide generation by de novo synthesis whereas cisplatin activates ceramide accumulation via enzymatic hydrolysis of sphingomyelyn.

*Keywords:* ionizing radiation, chemotherapeutic drags, ceramide, sphingomyeline, apoptosis.

## **ВЛИЯНИЕ СОЧЕТАННОГО ДЕЙСТВИЯ ИОНИЗИРУЮЩЕЙ РАДИАЦИИ И ХИМИОПРЕПАРАТОВ НА СОДЕРЖАНИЕ ПРОАПОПТОЗНОГО ЛИПИДА ЦЕРАМИДА В КАРЦИНОМЕ ГЕРЕНА**

**T. Segeda\*, N. Mitryaeva, T. Bakai, I. Grebenik**

*Государственное учреждение «Институт медицинской радиологии имени  
С.П. Григорьева АМН Украины»  
ул. Пушкинская, 82, Харьков 61024, Украина  
e-mail: tatyana.segeda@mail.ru*

Изучено влияние сочетанного действия разных видов ионизирующего излучения и химиопрепаратов (таксотер, цисплатин) на содержание проапоптотических

липидов (церамид, сфингомиелин) в карциноме Герена крыс. Установлено, що сочетанное действие облучения и химиопрепаратов является индуктором накопления в ткани опухоли Герена активатора апоптоза раковых клеток – церамида, повышающего радиочувствительность. Показано, что сочетанное действие облучения и таксотера увеличивает содержание церамида за счёт активации синтеза *de novo*, тогда как цисплатин активирует сфингомиелиновый путь накопления церамида в опухолевых клетках.

*Ключевые слова:* ионизирующая радиация, химиопрепараты, церамид, сфингомиелин, апоптоз.

## ВПЛИВ ГАЛЕГИ ЛІКАРСЬКОЇ НА АПОПТОЗ ЛЕЙКОЦИТІВ ЩУРІВ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ 1-ГО ТИПУ

М. Хохла, Г. Клевата, Я. Чайка, М. Скибіцька, Н. Сибірна

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

У статті наведені дані про вплив екстракту галеги лікарської на апоптоз лейкоцитів щурів у нормі та за умов експериментального цукрового діабету (ЕЦД). Імуноцитохімічним методом за патологічних умов показано кількісний перерозподіл лейкоцитів, які містять білки-регулятори апоптозу – p53 і Bcl-2. Це супроводжується посиленням фрагментації ДНК. Застосування екстракту галеги лікарської за умов ЕЦД нормалізує співвідношення лейкоцитів, які містять білки p53 і Bcl-2, та гальмує фрагментацію ДНК, що свідчить про пригнічувальний вплив даного екстракту на генетично запрограмовану загибель клітин. Встановлений коригуючий ефект досліджуваного екстракту на процеси апоптозу можна пов'язати з антиоксидантною дією біологічно активних речовин, наявних у складі галеги лікарської.

*Ключові слова:* галега лікарська, цукровий діабет, апоптоз, лейкоцити.

Цукровий діабет 1 типу (ЦД) – органоспецифічне аутоімунне захворювання, що розвивається внаслідок селективного руйнування  $\beta$ -клітин підшлункової залози цитотоксичними лімфоцитами, Т-хелперами і аутоантитілами [10]. У результаті поступової деструкції  $\beta$ -клітин виникає інсулінова недостатність, що призводить до порушення гомеостазу глюкози та виникнення ЦД.

Ключовим моментом в ініціації ЦД є резистентність аутореактивних Т-лімфоцитів до апоптозу. Аутореактивні лімфоцити, які є стійкими до апоптозу, мігрують із кров'яного русла до органа-мішені – підшлункової залози, де утворюють запальні інфільтрати – інсуліти. Імунокомпетентні клітини, які інфільтрують острівкову тканину, продукують прозапальні цитокіни (ФНП- $\alpha$ , ІФН $\gamma$ ), оксид азоту, активні форми кисню, цитотоксичні ферменти (перфорин і гранзим В) та інші сполуки, що викликають загибель  $\beta$ -клітин за механізмом апоптозу [5].

У сучасній літературі відомо понад 150 видів лікарських рослин, які застосовують для лікування ЦД. З огляду на поліфункціональну фізіологічну дію, особливої уваги заслуговує галега лікарська (*Galega officinalis* L.) [1, 6, 12, 20, 22]. Використання фітопрепаратів при ЦД спрямоване на нормалізацію обміну вуглеводів, реологічних властивостей крові, пригнічення апоптозу і стимуляцію регенерації  $\beta$ -клітин, а також мінімізацію побічних ефектів фармако-терапії. У літературі наведені дані про те, що пролонговане використання галеги лікарської сприяє регенерації  $\beta$ -клітин острівців Лангерганса [21]. Не виключено, що такий ефект може бути обумовлений пригніченням апоптотичної загибелі клітин, зокрема за умов ЦД.

Метою роботи було з'ясувати вплив біологічно активних речовин, які містяться в екстракті галеги лікарської, на процеси апоптотичної загибелі імунокомпетентних клітин периферичної крові щурів у нормі та за умов ЕЦД.

### Матеріали та методи

Досліди проведено на білих безпородних щурах з масою тіла 100–150 г, яких утримували у стандартних умовах віварію з дотриманням етичних норм проведення експериментальних досліджень згідно із „Загальними принципами роботи на тваринах”, затвер-

дженими I Національним конгресом з біоетики (Київ, Україна, 2001) та Законом України „Про захист тварин від жорстокого поводження” від 26.02.2006 р.

ЕЦД 1-го типу індукували внутрішньочеревним введенням стрептозотоцину, який є нітрозопохідним глюкозаміну (“Sigma”, США) з розрахунку 5,5 мг на 100 г маси тіла. Для експерименту використовували тварин із рівнем глюкози вище  $14,09 \pm 1,44$  ммоль/л (після 18-годинного голодування). Концентрацію глюкози у крові визначали глюкозооксидазним методом (набір реактивів “Діаглюк” для визначення концентрації глюкози люб’язно надано проф. М. В. Гончаром (Інститут біології клітини НАН України, м. Львів). Через два тижні після індукції ЦД тваринам *per os* вводили екстракт галеги лікарської впродовж 14 діб.

Отримання екстракту галеги лікарської та розділення його на алкалоїдовмісну і безалкалоїдну фракції було проведено згідно з протоколом, який описано нами раніше [11]. Для дослідження використовували хлороформу (безалкалоїдну) фракцію етанольного екстракту галеги лікарської (у вигляді густої непрозорої маси темно-зеленого кольору). Одержаний екстракт вводили у вигляді водної суспензії, у дозі 0,6 г на 1 кг маси тіла тварини, в об’ємі 1 мл.

Для первинної характеристики одержаного екстракту галеги лікарської нами було проведено низку якісних реакцій, за допомогою яких ми підтвердили відсутність алкалоїдів та наявність флавоноїдів і сапонінів у його складі. Зокрема, використавши загальноосадові реакції (із застосуванням реактивів Майєра, Драгендорфа, Бушарда, Зоненштейна) [4], ми підтвердили відсутність алкалоїдів в одержаному екстракті. Для підтвердження наявності флавоноїдів у складі ЕГЛ було проведено реакцію з ацетатом свинцю (утворення жовтого кольору) та реакцію з борною кислотою у присутності цитратної кислоти (утворення осаду яскраво-жовтого кольору) [4]. Якісна реакція піноутворення з гідроксидом натрію та хлоридною кислотою свідчить про наявність сапонінів у складі отриманого екстракту.

Лейкоцити виділяли з гепаринізованої крові у градієнті густини філол-тріомбразу ( $\rho = 1,076 - 1,078$  г·см<sup>-3</sup>) шляхом центрифугування при 1000 об/хв (35 хв) [7]. Отримані клітини двічі відмивали у забуференому фізіологічному розчині (ЗФР) (рН=7,4) впродовж 5 хв при 1500 об/хв.

*Біохімічна детекція апоптозу за визначенням вмісту фрагментованої ДНК* [8]. Лізис клітин (5 млн клітин у 50 мкл) проводили впродовж 30 хв на льодяній бані лізуючим буфером такого складу: 5 мМ трис-НСІ, 20 мМ EDTA (рН 8), 0,5% тритон X-100. Аліквоту кожної проби центрифугували (15 хв при 12000 об/хв), відділяючи інтактний хроматин (в осаді) від фрагментованої ДНК (у супернатанті). Далі кожну фракцію ресуспендували в 500 мкл ТЕ-буферу (10 мМ трис-НСІ, 1 мМ EDTA, рН 8,0) і додавали по 600 мкл 1н НСІО<sub>4</sub>, зразки охолоджували при -4°C (20 хв). Одержані суспензії центрифугували (10 хв при 6700 об/хв). Супернатант відкидали. У пробірці з осадом додають по 300 мкл 1н НСІО<sub>4</sub> і проводять гідроліз на водяній бані при 70°C протягом 20 хв. Потім обережно відбирають супернатант. Після охолодження в пробірці з супернатантом додавали дифеніламіновий реагент в об’ємному співвідношенні 1:2. Зразки поміщали у темне місце на 17 годин. Проби спектрофотометрували при довжині хвилі 570 нм. Ступінь пошкодження ДНК обчислювали у відсотках як відношення її кількості в супернатанті до сумарного вмісту в осаді та супернатанті.

*Імуноцитохімічна детекція вмісту проапоптичного білка p53 і антиапоптичного білка Bcl-2.* Для виявлення та візуалізації внутрішньоклітинних білків Bcl-2 і p53 використовували непрямий імунопероксидазний метод [2]. Лейкоцити, нанесені на предметне скло, фіксували у розчині метанолу при температурі -4°C впродовж 20 хв та кілька секунд в охолодженому ацетоні. Фіксовані клітини пермеабілізували 0,1% тритоном X-100 у ЗФР. Для бло-

кування ендогенної клітинної пероксидази препарати інкубували в 0,3% розчині  $H_2O_2$  (5 хв). Блокування вільних центрів зв'язування проводили шляхом інкубації з 1% розчином бичачого сироваткового альбуміну (БСА) (Sigma, США) та негативним контролем "Negative control reagent" (ДАКО, США) для блокування імуноглобулінподібних молекул. Для детекції білків p53 та Bcl-2 клітини інкубували з моноклональними антитілами до p53 (ДАКО, США; клон DO-7, ізотип  $IgG_{2b}$ ) та моноклональними антитілами до Bcl-2 (ДАКО, США; клон 124, ізотип  $IgG_1$ ) у ЗФР (1:25), що містив 1% БСА впродовж 2 годин при 4°C. Зразки відмивали у ЗФР з 0,05% тритоном X-100 та інкубували з другими біотинільованими антитілами "LSAB<sup>®</sup>2 Biotinylated Link for Streptavidin HRP/AP", (ДАКО, США) у ЗФР (1:10), що містить 1% БСА впродовж 1 год при кімнатній температурі. Інкубацію з антитілами проводили у вологій камері. Після відмивання у ЗФР, що містив 0,05% тритон X-100 та ЗФР зразки інкубували впродовж 30 хв із авідин-біотин-пероксидазним комплексом "ExtrAvidin Peroxidase" (Sigma, США) у розведенні 1:125. Кольорову реакцію для детекції позитивних сигналів проводили за допомогою 3-амінобензидину "Liquid DAB Substrate Chromogen system" (ДАКО, США).

Аналіз вмісту білків p53 у ядрі та Bcl-2 на зовнішній мембрані мітохондрій і в ендоплазматичному ретикулумі лейкоцитів периферичної крові щурів здійснювали методом світлової мікроскопії з використанням х40 акропланового об'єктива мікроскопа MICROmed XS-5520 та відеокамери для мікроскопа (DCM310) з програмним забезпеченням (ScorePhoto). За інтенсивністю забарвлення досліджувані клітини були поділені на 3 групи: з негативною реакцією (p53<sup>-</sup> та Bcl-2<sup>-</sup>), позитивною (p53<sup>+</sup> та Bcl-2<sup>+</sup>) та різко позитивною (p53<sup>++</sup> та Bcl-2<sup>++</sup>) реакцією. Негативними контролями специфічності зв'язування слугували клітини без використання як перших, так і других антитіл. На препараті підраховували 500 досліджуваних клітин за вищезазначеною схемою. Статистичну обробку результатів здійснювали, використовуючи t-критерій Стьюдента.

#### Результати і їхнє обговорення

Аналіз отриманих результатів показав, що за умов ЕЦД підвищується кількість p53<sup>+</sup> (на 18%) та p53<sup>++</sup> клітин на (269%), порівняно з контролем, водночас знижується чисельність p53<sup>-</sup> клітин (на 21%) (табл. 1). Ці дані вказують на інтенсифікацію апоптозу й узгоджуються з дослідженнями інших авторів, щодо участі білка p53 в патогенезі діабетичних ускладнень. На мишах лінії Nod було показано, що гіперглікемія призводить до p53-опосередкованого апоптозу [18], а у хворих на ЦД 1 типу в сироватці крові виявляються анти-p53-аутоантитіла та збільшується інтенсивність p53-індукованого апоптозу [17].

Вміст p53 різко підвищується за впливу різних стресових чинників. Білок p53 не тільки здатний активувати гени, які задіяні в індукції апоптозу, а й бере безпосередню участь в індукції мітохондріального шляху клітинної смерті. Після активації p53 здатний надходити з цитоплазми в мітохондрії, оминаючи ядро. У мітохондріях даний білок піддається швидкому ферментативному деубіквітинуванию, перетворюється в активну форму та вступає у взаємодію з BH4-доменом антиапоптичних білків Bcl-XL і Bcl-2 [13]. Зв'язування з антиапоптичними білками індукує вивільнення і активацію проапоптичних протеїнів Bax та Bid. Такі взаємодії зумовлюють вихід цитохрому c та індукцію апоптозу навіть без транскрипційної активації проапоптичних генів мішеней p53. Пряма індукція апоптозу під дією p53, мабуть, є першою і дуже швидкою реакцією на масивні ушкодження. Друга хвиля індукції апоптозу відбувається тільки через 6–7 годин і пов'язана з транскрипційною активністю p53 в ядрі [15, 16]. Таким чином, діючи відразу на кількох рівнях і за різними механізмами, p53 як здійснює швидкі реакції-відповіді на сильні стреси, так і реалізує сповільнену, але дуже ефективну програму апоптозу пошкоджених клітин.



Введення екстракту галеги лікарської тваринам з ЕЦД, викликало зниження кількості p53<sup>+</sup>- в середньому на 24% (9–14-та доби) та p53<sup>++</sup>-клітин на 74% (6–14-та доби) та підвищення кількості p53<sup>-</sup>-клітин на 36% (9–14-та доби). При цьому слід зазначити, що у здорових тварин даний екстракт виявляв подібний вплив лише на окремих етапах експерименту (9-та доба) (табл. 1, рис. 1).

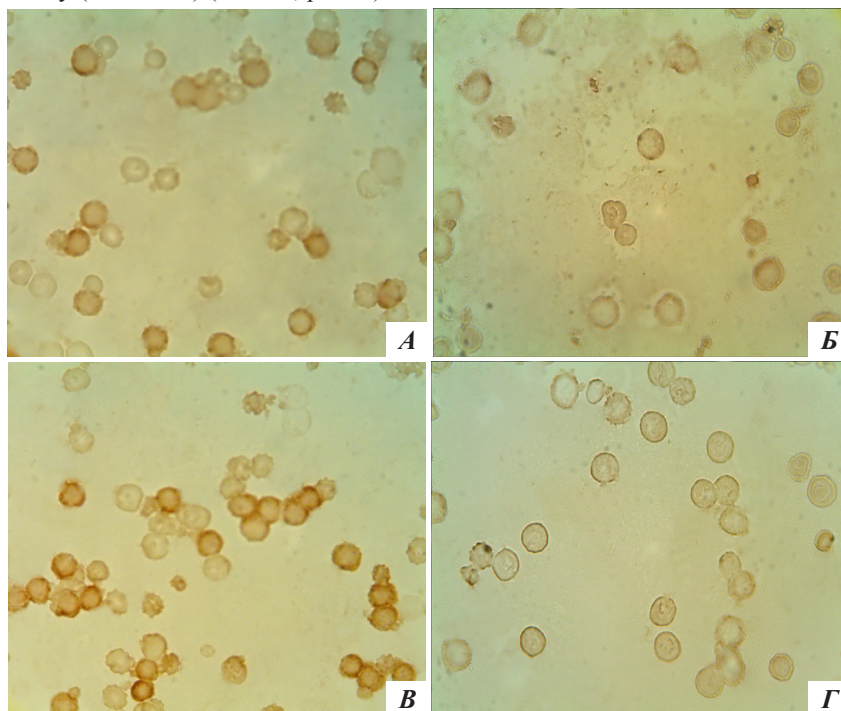


Рис. 1. Імуноцитохімічний аналіз лейкоцитів периферичної крові щурів на вміст білка p53 у здорових тварин, тварин з ЕЦД та за умов введення екстракту галеги лікарської (M±m, n=5–8): А – контроль; Б – введення екстракту галеги лікарської здоровим тваринам; В – ЕЦД; Г – введення екстракту галеги лікарської тваринам з ЕЦД.

Для з'ясування біохімічних механізмів розвитку апоптозу принципове значення має дослідження дії факторів, які здатні запобігати включенню програми загибелі. Значний інтерес у цьому плані становить продукт онкогену bcl-2. Білок Bcl-2 є важливим репресором апоптозу. Відомо, що Bcl-2 інгібує p53-залежний і незалежний шляхи апоптозу. При цьому він сприяє утворенню у мітохондріях іонних каналів, стабілізуючи таким чином мітохондріальну цитохром с-оксидазу і зв'язує білки, які задіяні в апоптозі. Цитохром с-оксидаза здатна ініціювати активацію каскаду каспаз і, як наслідок, деградацію ДНК і апоптоз [3].

Привертає увагу одночасне збільшення кількості клітин, що містять білки-регулятори апоптозу з протилежними функціями – проапоптичного білка p53 і антиапоптичного Bcl-2. Так, у разі стрептозотоцинового діабету на фоні зростання кількості лейкоцитів із підвищеним вмістом проапоптичного білка p53, нами визначено зростання кількості Bcl-2<sup>+</sup> - та Bcl-2<sup>++</sup>-клітин відповідно на 23 та на 143% і зниження Bcl-2<sup>-</sup>-клітин на 16%. Отримані результати вказують на синергізм дії білків p53 і Bcl-2 у регуляції запрограмованої клітинної смерті за умов цукрового діабету й узгоджуються з літературними даними. Зокрема, у роботі І. В. Гриневич показано односпрямовану тенденцію щодо збільшення кількості p53<sup>+</sup>- и Bcl-2<sup>+</sup>-клітин у лімфоїдних фолікулах селезінки при ЕЦД [3].

Таблиця 1

Співвідношення лейкоцитів периферичної крові щурів, які містять білок p53, у здорових тварин, тварин з ЕЦД та за умов введення екстракту галеги лікарської (M±m, n=5–8)

Умови експерименту	Співвідношення клітин із різним вмістом білка p53, %		
	p53 <sup>-</sup>	p53 <sup>+</sup>	p53 <sup>++</sup>
Контроль	56,03±2,98	42,50±3,09	1,47±0,12
Введення екстракту галеги лікарської здоровим тваринам			
3 доба	59,11±1,46	39,31±1,76	1,59±0,30
6 доба	56,61±3,50	41,59±3,46	1,80±0,23
9 доба	61,82±2,41	36,87±2,28	1,31±0,08
12 доба	56,65±3,00	41,58±2,86	1,50±0,09
14 доба	58,12±1,52	40,99±1,60	1,89±0,10
Діабет	44,35±2,39 *	50,22±2,83 *	5,42±0,36 *
Введення екстракту галеги лікарської тваринам з ЕЦД			
3 доба	49,75±1,84 *	46,58±1,47	3,67±0,43 *#
6 доба	47,83±3,11 *	50,53±4,91	1,66±0,40 #
9 доба	60,17±3,95 #	38,28±4,28 #	1,55±0,16 #
12 доба	61,11±0,80 #	37,91±1,03 #	0,98±0,07 #
14 доба	59,79±2,03 #	38,79±2,33 #	1,42±0,22 #

**Примітка.** \* – різниця вірогідна, порівняно з контролем, P<0,05; # – різниця вірогідна, порівняно з ЕЦД, P<0,05.

На фоні зниження кількості лейкоцитів, що містять білок p53, у тварин із цукровим діабетом, яким вводили екстракт галеги лікарської, показано зростання Vcl-2<sup>+</sup>-клітин лише на початковому етапі експерименту – на 3–6-ту доби (на 8%). Вірогідне підвищення Vcl-2<sup>+</sup>-клітин у здорових тварин, яким вводили екстракт, відзначено на більш пізньому етапі – на 12-14-ту доби (на 17%). Водночас чисельність Vcl-2<sup>++</sup>-клітин знижувалася впродовж експерименту як у здорових, так і у діабетичних тварин (табл. 2, рис. 2).

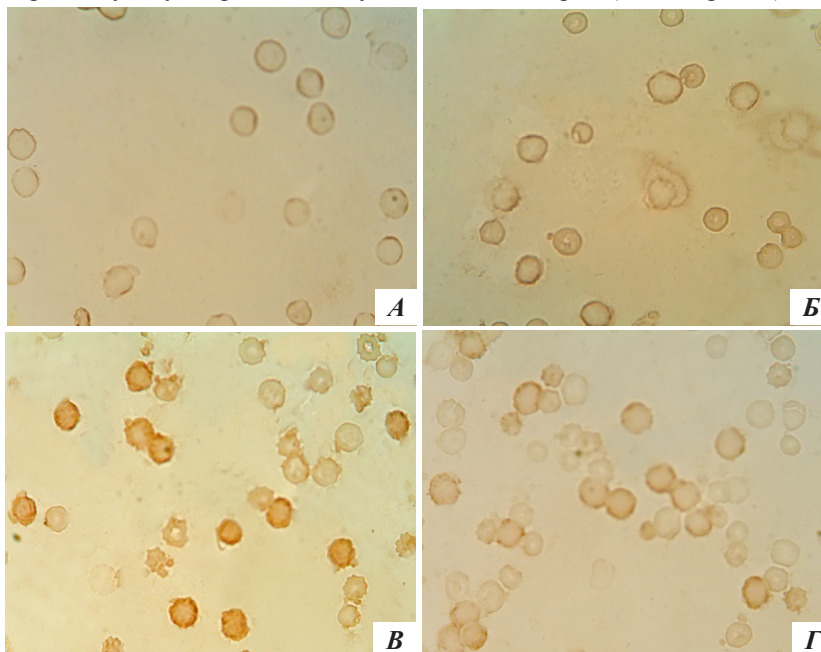


Рис. 2. Імуноцитохімічний аналіз лейкоцитів периферичної крові щурів на вміст білка Vcl-2 у здорових тварин, тварин з ЕЦД та за умов введення екстракту галеги лікарської (M±m, n=5–8): А – контроль; Б – введення екстракту галеги лікарської здоровим тваринам; В – ЕЦД; Г – введення екстракту галеги лікарської тваринам з ЕЦД.

Таблиця 2

Співвідношення лейкоцитів периферичної крові щурів, які містять білок Bcl-2, у здорових тварин, тварин з ЕЦД та за умов введення екстракту галеги лікарської (M±m, n=5–8)

Умови експерименту	Співвідношення клітин, із різним вмістом білка Bcl-2, %		
	Bcl-2 <sup>-</sup>	Bcl-2 <sup>+</sup>	Bcl-2 <sup>++</sup>
Контроль	62,66±2,39	35,90±2,19	1,45±0,13
Введення екстракту галеги лікарської здоровим тваринам			
3 доба	59,86±1,18	39,07±1,38	1,07±0,17
6 доба	57,91±2,95	40,30±3,14	1,80±0,16
9 доба	59,26±2,36	39,73±2,23	1,01±0,19
12 доба	55,23±3,50 *	43,00±3,40 *	1,78±0,12
14 доба	58,06±2,87	41,11±2,86 *	0,83±0,07 *
Діабет	52,38±2,59 *	44,11±2,34 *	3,52±0,36 *
Введення екстракту галеги лікарської тваринам з ЕЦД			
3 доба	51,79±0,30 *	46,13±0,36 *	2,08±0,24 #
6 доба	49,22±3,26 *	49,34±2,14 *	1,45±0,22 #
9 доба	58,91±0,92	39,32±1,47	1,77±0,16 #
12 доба	62,08±3,77 #	36,87±3,89 #	1,05±0,27 #
14 доба	60,15±1,01 #	38,94±1,64 #	1,46±0,09 #

**Примітка:** \* – різниця вірогідна, порівняно з контролем, P<0,05; # – різниця вірогідна, порівняно з ЕЦД, P<0,05.

Одним із низки біохімічних проявів апоптозу є фрагментація ДНК. З метою загальної оцінки інтенсивності фрагментації ДНК було проведено кількісне спектрофотометричне визначення вмісту низькомолекулярних фрагментів ДНК.

За умов цукрового діабету підвищувався вміст фрагментованої ДНК у лейкоцитах щурів у 2,4 разу, щодо контролю. Дія екстракту галеги лікарської (14-денний курс) гальмувала фрагментацію ДНК у діабетичних тварин у середньому на 29%, тоді як у контрольних тварин вміст даного показника незначно підвищувався (на 16%) (рис. 3).

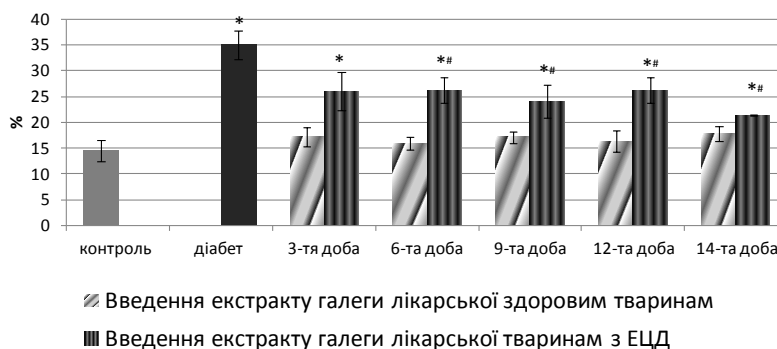


Рис. 3. Динаміка змін вмісту фрагментованої ДНК у лейкоцитах периферичної крові щурів за умов введення екстракту галеги лікарської здоровим і діабетичним тваринам. **Примітка.** \* – різниця вірогідна, порівняно з контролем, P<0,05; # – різниця вірогідна, порівняно з ЕЦД, P<0,05.

Таким чином, отримані результати вказують на посилення апоптотичних процесів у лейкоцитах периферичної крові щурів за умов ЕЦД, що виявляється у порушенні кількісного співвідношення лейкоцитів, які відрізняються за вмістом білків регуляторів апоптозу, а також у підвищенні інтенсивності фрагментації ДНК. Дія галеги лікарської за умов цукрового діабету спрямована на нормалізацію співвідношення лейкоцитів, що містять про- (p53) і антиапоптотичний (Bcl-2) білки, а також зниження ступеня фрагментації

ДНК, що свідчить про пригнічувальний вплив досліджуваного екстракту на генетично запрограмовану загибель клітин. Відомо, що хронічна гіперглікемія за умов ЦД призводить до неферментативного глікозилювання білків і розвитку оксидативного стресу, в ході якого утворюються продукти, що виявляють потужну проапоптотичну дію [9]. Встановлений біологічний ефект галеги лікарської ми пов'язуємо з антиоксидантними властивостями, які виявляє дана рослина, оскільки численними дослідженнями показано захисний ефект антиоксидантів у процесі апоптозу [1, 14, 19].

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Ажунова Т. А., Маркизов П. В. Антидиабетическая активность Галеги лекарственной (*Galega officinalis* L.) // Хим.-фарм. журнал. 1994. Т. 28. №6. С. 35–36.
2. Беркало Л. В., Бобович О. В., Боброва Н. О. та ін. Методи клінічних та експериментальних досліджень в медицині. Полтава: Полімет, 2003. 320 с.
3. Гриневич И. В., Камышный А. М. Влияние экспериментального сахарного диабета на экспрессию белков-регуляторов апоптоза p53 и Bcl2 в лимфоидных фолликулах селезенки // Морфология. 2010. Т. 4. № 4. С. 19–23.
4. Ковальов В. М., Павлій О. І., Ісакова Т. І. Фармакогнозія з основами біохімії рослин. Харків: Прапор, 2000. 704 с.
5. Колесник Ю. М., Орловский М. А. Современные представления об анатомо-физиологических особенностях островков Лангерганса и механизмах их деструкции при сахарном диабете I типа // Запорож. мед. журнал. 2000. № 3. С. 3–11.
6. Лапынина Л. А. Выделение и изучение физиологически активных соединений галеги лекарственной как сырья для получения сахароснижающего препарата: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Харьков, 1972. 15 с.
7. Лаповець Л., Луцик Б. Лабораторна імунологія. К.: Арал, 2004. 173 с.
8. Орлова Е. А., Комаревцев В. Н. Определение фрагментации ДНК в клетках почечной ткани // Актуальные проблемы акушерства и гинекологии, клинической иммунологии и медицинской генетики. 2001. Т. 6. С. 206–209.
9. Пащковська Н. В. Динаміка показників інтенсивності апоптозу у хворих на діабетичну енцефалопатію на тлі застосування цитиколіну // Укр. невролог. журнал. 2009. № 2. С. 43–48.
10. Хаитов Р. М., Игнатъева Г. Л., Сидорович И. Г. Иммунология. М.: Медицина, 2000. 432 с.
11. Хохла М. Р., Клевета Г. Я., Чайка Я. П. та ін. Цитологічна та біохімічна характеристика периферичної крові щурів за умов експериментального цукрового діабету 1-го типу та введення галеги лікарської // Біологічні студії / *Studia Biologica*. 2012. 6(1). С. 37–46.
12. Якимова Т. В., Булкова В. Н., Ухова Т. М. Влияние галеги лекарственной на течение экспериментального сахарного диабета // Бюлл. сибирской медицины. 2006. С. 146–147.
13. Braithwaite A., Royds J., Jackson P. The p53 story: layers of complexity // *Carcinogenesis*. 2005. Vol. 26. P. 1161–1169.
14. Briehl M. M., Cotgreave I. A., Powis G. Downregulation of the antioxidant defence during glucocorticoid-mediated apoptosis // *Cell Death Differ.* 1995. Vol. 2. P. 41–46.
15. Erster S., Mihara M., Kim R. In vivo mitochondrial p53 translocation triggers a rapid first wave of cell death in response to DNA damage that can precede p53 target gene activation // *Mol. Cell Biol.* 2004. Vol. 24. P. 6728–6741.
16. Janicke R. U., Sohn D., Schulze-Osthoff K. The dark side of a tumor suppressor: anti-apoptotic p53 // *Cell Death and Differentiation*. 2008. Vol. 15. P. 959–976.

17. Jazayeri L., Callaghan M., Grogan R. et al. Diabetes increases p53-mediated apoptosis following ischemia // *Plastic and Reconstructive Surgery*. 2008. Vol. 121. P. 1135–1143.
18. Keim A., Chi M., Moley K. Hyperglycemia-induced apoptotic cell death in the mouse blastocyst is dependent on expression of p53 // *Molecular Reproduction and Development*. 2001. Vol. 60. P. 214–224.
19. Kiselova Y., Ivanova D., Galunska B. et al. Polyphenol content and in vitro antioxidant activity of aqueous-alcoholic extracts from Bulgarian herbs // *Bulletin of the Medical Institute After Mehrabyan*. 2006. Vol. 1. P. 78–83.
20. Lemus I., Garcí'a R., Delvillar E., Knop G. Hypoglycaemic Activity of Four Plants Used in Chilean Popular Medicine // *Phytotherapy Research*. 1999. Vol. 13. P. 91–94
21. Sendrail M., Vincent D., Sendrail-Pesque M., Mahoux M. Experimental study of the action of plant drugs with a glycogenic effect on the cytological structure of the insular pancreas // *Sem Hop*. 1961. Vol. 2. N 37. P. 389–398.
22. Witters L. A. The blooming of the French lilac // *J. Clin. Invest*. 2001. Vol. 108. P. 1105–1107.

Стаття: надійшла до редакції 09.07.12

доопрацьована 29.10.12

прийнята до друку 30.10.12

## THE INFLUENCE OF GALEGA OFFICINALIS ON RATS LEUKOCYTES APOPTOSIS UNDER THE EXPERIMENTAL DIABETES MELLITUS TYPE 1

M. Khokhla, G. Kleveta, Ya. Chajka, M. Skybitska, N. Sybirna

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

The article contains data on the influence of Galega officinalis extract on rats leukocytes apoptosis in normal and under experimental diabetes mellitus (EDM). Immunohistochemistry method shows the quantitative redistribution of white blood cells that contain proteins, regulators of apoptosis – p53 and Bcl-2 under these pathological conditions. This is accompanied by increased DNA fragmentation. Application Galega officinalis extract under EDM normalizes ratio of leukocytes containing proteins p53 and Bcl-2 and inhibits DNA fragmentation, indicating the depressant effect of the extract on genetically programmed cell death. Corrective effect of the studied extract on the apoptosis processes can be associated with antioxidant action of Galega officinalis biologically active substances.

*Keywords:* Galega officinalis, diabetes mellitus, apoptosis, leukocytes.

## **ВЛИЯНИЕ ГАЛЕГИ ЛЕКАРСТВЕННОЙ НА АПОПТОЗ ЛЕЙКОЦИТОВ КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 1-ГО ТИПА**

**М. Хохла, Г. Клевета, Я. Чайка, М. Скибицкая, Н. Сибирная**

*Львовский национальный университет имени Ивана Франко  
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина  
e-mail: khmarija@gmail.com*

В статье приведены данные о влиянии экстракта галеги лекарственной на апоптоз лейкоцитов крыс в норме и в условиях экспериментального сахарного диабета (ЭСД). Иммуноцитохимическим методом при патологических условиях показано количественное перераспределение лейкоцитов, содержащих белки-регуляторы апоптоза – p53 и Bcl-2. Это сопровождается усилением фрагментации ДНК. Применение экстракта галеги лекарственной в условиях ЭСД нормализует соотношение лейкоцитов, которые содержат белки p53 и Bcl-2 и тормозит фрагментацию ДНК, что свидетельствует об угнетающем влиянии данного экстракта на генетически запрограммированную гибель клеток. Установленный корректирующий эффект исследуемого экстракта на процессы апоптоза можно связать с антиоксидантным действием биологически активных веществ, присутствующих в составе галеги лекарственной.

*Ключевые слова:* галега лекарственная, сахарный диабет, апоптоз, лейкоциты.

УДК 576.326;591.431

**РОЛЬ ПОХІДНИХ ПІРОЛОПРИМІДИНДІОНІВ У РЕГУЛЯЦІЇ ФІЗИКО-ХІМІЧНИХ ХАРАКТЕРИСТИК ГЕМОГЛОБІНУ Й АКТИВНОСТІ ОКРЕМИХ ФЕРМЕНТІВ АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ КРОВІ ЛЮДЕЙ *IN VITRO***

\*К. Дудок<sup>1</sup>, Л. Старикович<sup>1</sup>, О. Речицький<sup>2</sup>, А. Шкаволяк,<sup>3</sup> Н. Сибірня<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Львівський національний університет імені Івана Франка  
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна

<sup>2</sup>Херсонський державний університет  
вул. 40 років Жовтня, 27, Херсон 73002, Україна

<sup>3</sup>Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького  
вул. Пекарська, 69, Львів 79010, Україна

Вивчали вплив спірокарбону та піролопохідних піримідиндіонів (речовини № 1, № 2, № 3) на стабільність еритроцитарних мембран, спорідненість гемоглобіну до кисню, каталазну активність, активність сумарної, індукційної та ендотеліальної NO-синтази (NOS), вміст нітритів і нітратів у гемолізатах еритроцитів крові здорових донорів *in vitro*. Встановлено, що після одно- і 24-годинної інкубації еритроцитів з розчинами речовин № 1, № 2 і № 3 підвищується стійкість еритроцитів до кислотного гемолітика. Тривалість максимального і тотального гемолізу достовірно зростає. Показано, що спірокарбон і похідні піримідиндіонів підвищують спорідненість гемоглобіну до кисню, про що свідчить зниження параметра  $P_{50}$ . За умов експерименту виявлено зниження каталазної активності у гемолізатах еритроцитів. Інкубація еритроцитів із речовиною № 3 призводить до зростання активності індукційної NOS, а речовиною № 2 – до зниження активності сумарної NOS і підвищення вмісту нітратів. Вміст нітритів знижується за інкубації з речовиною № 1. Обговорюються механізми дії похідних піролопиримідиндіонів на структуру мембран еритроцитів, активність ферментів антиоксидантного захисту і спорідненість гемоглобіну до кисню.

*Ключові слова:* спірокарбон, похідні піролопиримідиндіонів, еритроцити, гемоглобін, оксигенація, каталаза, NOS, нітрити, нітрати.

Відомо, що патології різного типу, зокрема, гостра алкогольна інтоксикація, діабет, променева хвороба, онкологічні захворювання тощо, характеризуються токсичним і гіпоксичним генезом, метаболічним ацидозом, тому їхня терапія потребує застосування препаратів, які здатні запобігати дії токсичних метаболітів, підтримувати стабільність і функціональний стан внутрішнього середовища організму та сприяти профілактиці ускладнень [4, 13–15]. З огляду на це, пошуки сполук, які відповідають зазначеним вимогам, є важливою проблемою сучасної медицини і біології.

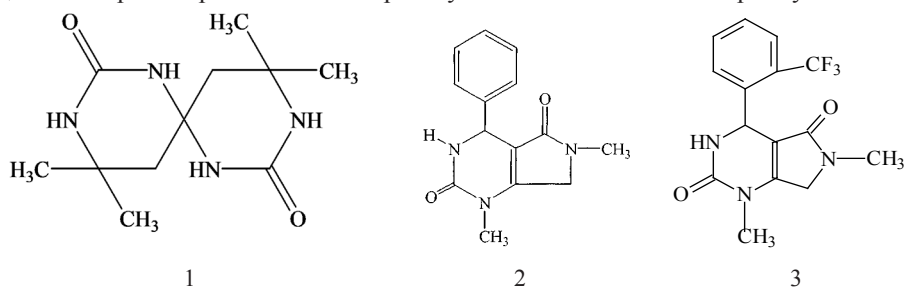
Останнім часом у медичній практиці дедалі ширше застосовуються низькомолекулярні синтетичні сполуки та речовини природного походження, які виконують функції біорегуляторів. Особливість дії цих сполук полягає у тому, що вони, в силу своєї хімічної структури, здатні взаємодіяти з біологічними макромолекулами або безпосередньо з метаболітами, нормалізуючи перебіг метаболічних процесів у тканинах організму.

Перспективними у цьому плані можуть бути спіросполуки (продукти конденсації сечовини) та похідні піролопиримідиндіонів, висока біологічна активність яких була раніше виявлена [10–12]. Однак у літературі інформація щодо обґрунтування молекулярних механізмів дії цих препаратів як медіаторів чи модифікаторів біохімічних процесів недостатня.

Речовини, які були використані у наших дослідженнях, належать до групи похідних піролопіримідиндіонів, синтезовані на кафедрі органічної та біологічної хімії Херсонського державного університету [4, 13].

Спірокарбон, формула 1 (речовина № 1) – конденсована гетероциклічна сполука, що містить у кожній із циклічних структур по два атоми Нітрогену та чотири атоми Карбону, один з яких є спільним. За своїми фізичними властивостями ця сполука є водорозчинною, температура плавлення становить  $+306\dots307^{\circ}\text{C}$  [4, 12, 13].

Цикли у складі цієї речовини перебувають у *транс*-конфігурації щодо спільного атома Карбону у зв'язку зі стеричними перешкодами та взаємним відштовхуванням неподілених пар електронів атомів Нітрогену біля спільного атома Карбону:



Речовина № 2 (формула 2) – 1,6-диметил-4-феніл-1,2,3,4,5,7-гексагідропіроло-[3,4-е]-піримідиндіон-2,5(1H), розчинна у гарячій воді, етанолі, ацетоні, хлороформі. Температура плавлення становить  $+212\dots213^{\circ}\text{C}$ . Молекулярна маса цієї сполуки дорівнює 257. [4, 12].

Речовина № 3 (формула 3) – 1,6-диметил-4-(трифлорофеніл)-1,2,3,4,5,7-гексагідропіроло-[3,4-е]-піримідиндіон-2,5(1H) також є безбарвною кристалічною сполукою з температурою плавлення  $+222\dots224^{\circ}\text{C}$ , розчиняється у гарячій воді, етанолі, метанолі, хлороформі. Молекулярна маса – 325 [4, 12].

Розглядаючи хімічну структуру описаних сполук, можна зробити висновок, що вони здатні взаємодіяти з білками як зі зарядженими кластерами молекул, так і з їхніми гідрофобними ядрами, а також з іншими біополімерами та надмолекулярними комплексами.

Раніше було з'ясовано, що деякі похідні піролопіримідиндіонів володіють протимікробною, протитуберкульозною активністю і впливають на систему зсідання крові [4]. Зокрема, спірокарбон впливає на гіпоталамо-гіпофізарну нейроендокринну систему шурів, на ріст, розвиток і продуктивність курей та рослин [10, 13].

З огляду на те, що периферична кров є тією системою, на якій позначаються наслідки впливу тих чи інших захворювань, факторів довкілля, фармакологічних препаратів, актуальним є вивчення структурних особливостей і функції компонентів периферичної крові за дії на них досліджуваних чинників. Унікальними у цьому плані є еритроцити та їхній основний білок – гемоглобін, а також ферменти антиоксидантної системи.

Еритроцити як об'єкт дослідження цікаві тим, що вони відіграють важливу роль у транспорті  $\text{O}_2$ ,  $\text{CO}_2$  та продуктів перетворення  $\text{NO}^{\cdot}$ . Універсальність структури мембран усіх клітин організму дає підстави розглядати плазматичні мембрани еритроцитів певною мірою як модель, що відображає зміни, які відбуваються у мембранах інших типів клітин за дії тих чи інших факторів [2].

Метою нашого дослідження було вивчити вплив синтезованої сполуки гетероциклічного ряду спірокарбону та двох похідних піролопіримідиндіонів на стійкість еритроцитарної мембрани до дії кислотного гемолітика, спорідненість гемоглобіну до кисню, каталазну активність, активність  $\text{NO}$ -синтази (NOS), вміст нітратів і нітритів у гемолізатах крові.



### Матеріали та методи

У досліджах використовували цільну периферичну гепаринізовану кров практично здорових донорів, взяту з ліктьової вени загальноприйнятим методом.

Еритроцитарну масу відділяли від плазми шляхом центрифугування при 500 g, використовуючи ізотонічний розчин натрію хлориду (0,155 М). Відмиті еритроцити інкубували з розчинами сполук № 1, № 2 і № 3, приготованих на 0,155 М NaCl, концентрація яких становила відповідно: 1 мг·мл<sup>-1</sup> для № 1 та № 2, і 0,5 мг·мл<sup>-1</sup> для № 3. Інкубацію проводили у співвідношенні 1 : 3 (еритроцити : розчини речовин) протягом 1 год і 24 год. Стійкість мембран еритроцитів до кислотного гемолітика визначали за методикою Терскова та співавт. [17]. Спорідненість гемоглобіну до кисню вивчали спектрофотометричним методом у модифікації Іванова шляхом побудови кривих оксигенації [5]. Гемоліз еритроцитів для визначення спорідненості гемоглобіну до кисню проводили 3,3 мМ K<sub>2</sub>Na-фосфатним буфером рН 7,36.

Каталазну активність визначали за методом Королук та співавт. [9], активність NOS – за методом Сумбаєва та співав. [16], вміст нітратів і нітритів – з використанням модифікованого методу Гріса [8].

Отримані результати опрацьовували статистично, використовуючи *t*-критерій Стьюдента, за допомогою комп'ютерної програми MS Excel.

### Результати і їхнє обговорення

У літературі достатньо повно описано структурно-функціональні властивості еритроцитів і гемоглобіну в нормі та за деяких патологічних станів впливів [1, 2, 20, 22]. Однак постійне зростання кількості різноманітних факторів негативного впливу на організм людини і тварин, а також розширений діапазон синтетичних лікарських препаратів потребує більш детального аналізу реакції еритроцитів щодо дії цих факторів.

З огляду на ключову роль еритроцитів у системі крові важливе значення має стабільність фізико-хімічних характеристик їхніх мембран, а також динаміка змін структурно-функціонального стану основного білка червоних кров'яних клітин – гемоглобіну. Ці показники є визначальними при вивченні реакції органів і тканин на дію ендогенних та екзогенних чинників. Варто зауважити, що зі стабільністю мембран еритроцитів пов'язані гліколітичні реакції й ефективність роботи ферментів антиоксидантного захисту, а також киснетранспортної функції гемоглобіну.

Через еритроцитарну мембрану, подібно до мембран інших клітин, здійснюється транспорт білково-пептидних гормонів – шляхом інтерналізації гормонорецепторного комплексу, іонний транспорт тощо. Навіть незначні порушення стабільності мембрани можуть призвести до зростання пасивного транспорту іонів калію і натрію через неї, наслідком чого є зміна осмотичного балансу, окиснення фосфоліпідів, зміна активності мембранної АТФ-ази і зниження тривалості життя еритроцита [11]. Окрім того, склад ліпідного компонента еритроцита і ступінь його окисненості впливає на здатність до асоціації з позаклітинними медіаторами та внутрішніми еритроцитарними білками, у тому числі з гемоглобіном, ферментами гліколізу й антиоксидантної системи.

У попередніх наших дослідженнях, які стосувалися вивчення впливу спірокарбону на стабільність мембран еритроцитів щурів *in vitro*, було встановлено, що ця сполука сприяє стабілізації мембран досліджуваних клітин [3, 12, 15].

Як з'ясувалося, інкубація еритроцитів крові здорових донорів із розчинами спірокарбону та піролопіримідиндіонів призводить до зміни резистентності еритроцитів до кислотного гемолітика (рис. 1, табл. 1).

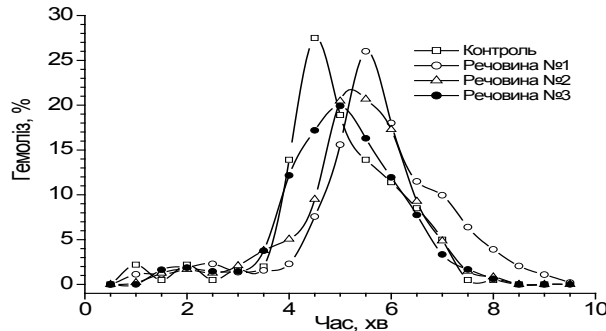


Рис 1. Типові усереднені еритрограми кислотного гемолізу еритроцитів крові здорових донорів до (контроль) та після одноденної інкубації з речовинами № 1, № 2, № 3.

Таблиця 1

Параметри еритрограм крові здорових донорів до (контроль) та після інкубації зі спірокарбонем (№ 1) та похідними піролопіримідиндіонів (№ 2, № 3),  $M \pm m$

Варіанти дослідів	n	Максимальний гемоліз,	Тотальний гемоліз,	Максимальний гемоліз,
		хв	хв	%
Контроль	14	4,6±0,10	6,3±0,56	27,5±4,0
Інкубація з № 1 (1 год)	4	5,5±0,46*	6,7±0,30	21,0±1,5
Інкубація з № 1 (24 год)	6	6,0±0,31*	10,5±0,54*	13,9±0,6*
Інкубація з № 2 (1 год)	5	4,8±0,29	7,2±0,75	20,0±3,0
Інкубація з № 2 (24 год)	6	6,5±0,25*	9,5±0,46*	16,3±0,7*
Інкубація з № 3 (1 год)	5	6,2±0,48*	7,8±0,15*	21,5±1,5
Інкубація з № 3 (24 год)	6	5,5±0,13*	9,5±0,42*	17,3±0,8*

\* – Різниця щодо контролю вірогідна,  $P \leq 0,05$ .

Результати свідчать, що інкубація еритроцитів упродовж 1 год у присутності речовини № 1 сприяє відтермінуванню часу гемолізу максимальної кількості еритроцитів з одночасним сповільненням тотального гемолізу порівняно з контролем. Інкубація з цією ж речовиною протягом 24 год посилює виявлені зміни, які характеризуються зростанням частки особливо резистентних до гемолітика еритроцитів. Подібні результати спостерігалися і при інкубації еритроцитів з речовинами № 2 і № 3.

Виявлені нами відмінності щодо різної стійкості еритроцитів крові до дії кислотного гемолітика можна пояснити, виходячи з властивостей структури мембрани еритроцита, тривалості життя еритроцита, змінами метаболічних процесів у цих клітинах, спільним і взаємним впливом ендогенних та екзогенних факторів.

Тривалість гемолізу еритроцитів залежить від часу, необхідного для подолання гемолітиком бар'єра мембранної непроникності, швидкості руйнування внутрішньоклітинних структур і часу, протягом якого механічна міцність мембран протистоїть наростаючому осмотичному тиску всередині клітини [11, 15].

Відомо, що механізм регулювання лабільності мембран еритроцитів є багатограним і залежить від багатьох факторів. Контроль за станом структури мембран і функціональним станом еритроцита реалізується через процеси фосфорильовання мембранних білків, що, у свою чергу, визначає форму клітин і їхню здатність до деформації. Значну роль у порушенні стабільності мембрани можуть відігравати не лише клітинні протеїнази й АТФ-ази, але й зміни метаболізму у цих клітинах узагалі. Значною мірою інтенсивність гемолізу еритроцитів також тісно пов'язана з перекисним окисненням ліпідів (ПОЛ) і здебільшого

прямо залежить від накопичення відповідних метаболітів, стану антиоксидантної системи та стабільності іонотранспортувальних систем. [2, 11, 14, 15].

Отже, отримані результати досліджень свідчать, що спірокарбон та похідні піролопіримідиндіонів, хоча суттєво відрізняються за структурою, однак унаслідок наявності гідрофобних угруповань здатні стабілізувати мембранні структури еритроцитів. Не виключено, що ці сполуки можуть блокувати (екранувати) заряджені групи на поверхні мембран еритроцитів або інтеркалюватися між гідрофобними хвостами жирних кислот мембранних ліпідів і впливати на конформаційний стан білково-ліпідних компонентів узагалі.

Оскільки основним білком еритроцитів є гемоглобін, який може асоціювати з еритроцитарною мембраною, важливо було у подальших експериментах вивчити насичення гемоглобіну киснем на цій же дослідній моделі.

На рис. 2 показані типові криві оксигенації гемоглобіну в умовах експерименту.

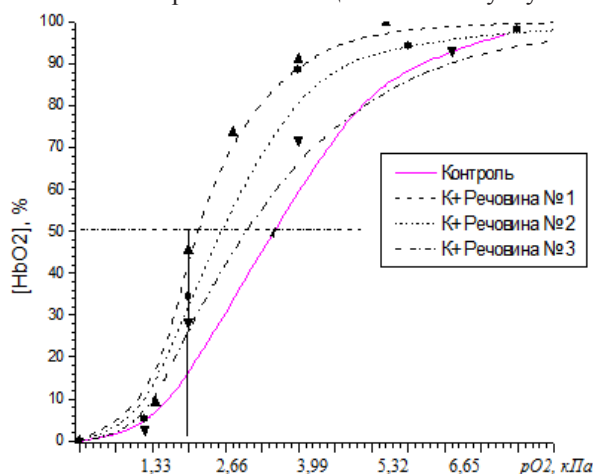


Рис. 2. Типові криві насичення киснем гемоглобіну крові здорових донорів у контролі та за дії досліджуваних речовин *in vitro*: Контроль (К) – гемолізати еритроцитів здорових донорів; К + Речовина № 1 – гемолізати еритроцитів здорових донорів після інкубації з речовиною № 1; К + Речовина № 2 – гемолізати еритроцитів здорових донорів після інкубації з речовиною № 2; К + Речовина № 3 – гемолізати еритроцитів здорових донорів після інкубації з речовиною № 3.

Результати досліджень показали, що після інкубації еритроцитів з речовинами № 1, № 2 та № 3 в усіх варіантах дослідження спорідненість гемоглобіну до кисню достовірно зростає порівняно з контролем відповідно на 30, 26 та 21% (табл. 2)

Таблиця 2

Показники значень парціального тиску кисню ( $pO_2$ , кПа) за різного ступеня насичення гемоглобіну киснем ( $[HbO_2]$ , %) в умовах дії спірокарбону та похідних піролопіримідиндіонів *in vitro* ( $M \pm m$ )

Варіанти досліджу	n	Ступінь насичення гемоглобіну киснем, %		
		50	75	90
Контроль	9	3,67±0,12	5,12±0,10	6,12±0,11
Речовина № 1	5	2,55±0,11*	3,06±0,07*	4,02±0,10*
Речовина № 2	5	2,72±0,07*	3,32±0,08*	4,65±0,04*
Речовина № 3	5	2,93±0,07*	4,26±0,09*	5,85±0,05

\* – Різниця щодо контролю вірогідна  $P \leq 0,05$ .

Відомо, що процес приєднання і віддачі гемоглобіном кисню є найважливішою фізіологічною функцією цього гемопротеїну. Особливим є те, що нормальне постачання органів і тканин киснем пов'язане з конформаційним станом молекули гемоглобіну.

У процесі оксигенації молекула гемоглобіну перебуває у рівновазі між двома конформаційними станами – розслабленим і напруженим ( $R \leftrightarrow T$ ), високою і низькою спорідненістю до кисню і, перш за все, залежить від природи ліганда та регулюється відповідними метаболітами [18, 22].

З'ясовано, що в еритроциті йде активний метаболізм глюкози. Особливість гліколізу еритроцитів людини полягає у специфічних реакціях (шунта Rapoport-Luebering), у процесі яких синтезується 2,3-дифосфогліцерат (2,3-ДФГ), який, разом з АТФ, відіграє функцію основного регулятора спорідненості гемоглобіну до кисню.

Водночас, порушення іонного транспорту, динамічної рівноваги зв'язаного з мембраною АТФ, зв'язування 2,3-ДФГ іонами металів і зниження зв'язування його з гемоглобіном може призвести до зростання спорідненості останнього до кисню.

Можливим є й інший механізм зміни спорідненості гемоглобіну до кисню, який безпосередньо пов'язаний зі структурними змінами еритроцитарної мембрани і стосується обмеженості білка смуги 3 брати участь у формуванні гліколітичного метаболону. Різні білки еритроцита, у тому числі дезоксиформа гемоглобіну, фосфофруктокіназа, альдолаза, гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа, є конкурентами за зв'язування з білком смуги 3. У разі зростання кількості дезоксиформи гемоглобіну він набуває переваги у конкуренції з фосфофруктокіназою за можливість виступати «кором», на якому збирається метаболон. Унаслідок цього інтенсивність гліколітичних процесів знижується, і, відповідно, зменшується кількість 2,3-ДФГ, що призводить до підвищення спорідненості гемоглобіну до кисню. Криві оксигенації у цьому випадку будуть зміщуватися вліво [1, 2, 18]. Такі міркування можуть бути аргументами при обґрунтуванні результатів, отриманих у наших дослідженнях.

Можна також припустити, що, проникаючи в еритроцит, досліджувані нами сполуки унаслідок власної гідрофобності можуть взаємодіяти з поверхневими гідрофобними кластерами  $\alpha$ -спіральных ділянок гемоглобіну, формуючи слабкі нековалентні (водневі, гідрофобні, Ван-дер-Ваальсові) зв'язки з білковою глобулою, впливаючи на його статично сформовану внутрішню гідрофобність, що може зсувати динамічну рівновагу у бік напруженої конформації. Таке припущення можна зробити, виходячи з даних літератури, де описано факти взаємодії сполук із двома конденсованими гідрофобними ядрами і трьома роз'єднаними у просторі, з імуноглобулінами та міоглобіном [1, 6, 7]. Не виключено, що у випадку гемоглобіну дія подібних за хімічною структурою сполук до тих, які використовували ми, може призвести до окисної модифікації гемоглобіну, зміни конформації цього гемопротеїну, здатності до транспорту кисню.

На процес переходу гемоглобіну з напруженого стану в розслаблений і навпаки впливають сполуки, які здатні взаємодіяти не лише з глобіновим компонентом, але й із простетичною групою цього гемопротеїну, що може бути зафіксовано спектроскопометрично [1, 18, 22]. Однак на ідентичних моделях дослідів, проведених нами раніше, які стосувалися спектроскопічних аналізів лігандних форм гемоглобіну, ми не виявили відмінностей у характеристичних спектрах поглинання світла у видимій ділянці [20].

Зниження парціального тиску кисню, при якому відбувається півнасичення та повне насичення гемоглобіну киснем (табл. 2), може непрямо свідчити про низький рівень ефективності антиоксидантної системи, тому в подальшому нами проведені дослідження

каталазної активності та ще одного важливого регуляторного білка – NOS у гемолізатах еритроцитів, виділених з використанням градисолу G [7].

Показано, що інкубування еритроцитів із досліджуваними речовинами призводить до достовірного зниження каталазної активності у системах з речовинами № 1 і № 2 (табл. 3).

Таблиця 3

Каталазна активність у гемолізатах еритроцитів людей у контролі та за дії досліджуваних речовин [нмоль·(хв·мг)<sup>-1</sup>, M±m]

Варіанти досліджу	n	Каталазна активність
Контроль	8	82,18±6,88
Речовина 1	8	51,61±5,50*
Речовина 2	5	51,72±5,32*
Речовина 3	4	67,21±7,32

\* – Різниця вірогідна щодо контролю  $P \leq 0,05$ .

Спостережуваний ефект можна пояснити тим, що сполуки № 1 і № 2 є більш гідрофобними порівняно з трифлуоропохідним (№ 3), і їхня взаємодія з мембранними структурами сприятиме посиленню гідрофобності останніх, що призведе до зміни конформаційного стану молекули каталази і, як наслідок, до зниження активності цього фермента. Таке зниження каталазної активності суттєво впливає на роботу антиоксидантної системи в цілому і може призводити до модифікаційних змін структури гемоглобіну в напрямку зростання спорідненості гемоглобіну до кисню.

Ефективність роботи антиоксидантної системи значною мірою залежить від сумарної активності NOS і співвідношення її окремих ізоформ. Тому в наших подальших дослідженнях оцінено вплив тестованих речовин на NO-синтазу активність у гемолізатах еритроцитів.

Інкубування еритроцитів із речовинами № 1 і № 3 статистично достовірних змін сумарної NOS порівняно з контролем не викликає, але виявлено зниження її активності за інкубації зі сполукою № 2 (табл. 4).

Таблиця 4

Активність NOS в еритроцитах людей у різних варіантах досліджу [нмоль·(хв·мг)<sup>-1</sup>, M±m]

Варіанти досліджу	Контроль, n=8	Речовина №1, n=6	Речовина №2, n=6	Речовина №3, n=4
Сумарна NOS	4,94±0,72	4,91±0,40	3,04±0,40*	4,59±0,81
Індуцибельна NOS	3,14±0,35	2,35±0,45	3,17±1,08	5,09±0,95, *
Ендотеліальна NOS	2,43±0,63	2,23±0,17	–	–

\* – Різниця вірогідна щодо контролю  $P \leq 0,05$ .

Вплив досліджуваних речовин на активність ізоформ NOS є неоднозначним. Виявлено, що спірокарбон не впливає не лише на сумарну активність досліджуваного ферменту, але й на співвідношення його окремих ізоформ. Відомо, що сумарна активність NOS у більшості клітин складається з активностей таких ізоформ: індуцибельної (незалежної від іонів кальцію у середовищі), нейрональної, ендотеліальної та мітохондріальної форм, які є кальційзалежними. В еритроцитах доведено існування двох ізоформ: індуцибельної та ендотеліальної [19, 21].

Ендотеліальна форма ферменту активується кальційзв'язувальним білком – кальмодуліном унаслідок взаємодії з гідрофобним доменом цього білка. Сформований потрібний комплекс кальцій – кальмодулін – фермент і реалізує специфічну ферментативну реакцію.

Після інкубації еритроцитів із похідними піролопіримідиндіонів активність індукцибельної форми практично дорівнює сумарній активності NOS і є незалежною від присутності іонів  $\text{Ca}^{2+}$ , оскільки у середовищі інкубації присутній EDTA. У цьому випадку і ендотеліальна форма як кальційзалежна не визначається (табл. 4).

Оскільки дослідження проводилися у модельній системі і вплив на процеси синтезу даного ферменту є виключений, варто припустити, що речовини № 2 та № 3 безпосередньо впливають на кальмодулін-зв'язувальний домен NOS, що робить цей фермент незалежним від присутності іонів металу в середовищі. Можна також припустити, що дія досліджуваних речовин може бути і опосередкованою – через вплив на гідрофобну ділянку кальційзв'язувального білка – кальмодуліну, що збільшує його спорідненість до ферменту і стабілізує активний комплекс, який не дисоціює за відсутності іонів  $\text{Ca}^{2+}$  у середовищі.

У зв'язку з тим, що утворення нітратів і нітритів тісно пов'язане з NO-синтазою активністю, нами проведено дослідження вмісту цих аніонів у гемолізатах крові (табл. 5).

Таблиця 5

Вміст нітратів і нітритів у гемолізатах еритроцитів  
за дії тестованих речовин [ $\text{нмоль} \cdot 10^{-2} \cdot (\text{мг білка})^{-1} \text{ M} \pm \text{m}$ , n=5]

Варіанти досліджу	Контроль	Речовина №1	Речовина №2	Речовина №3
Нітрати	8,32±1,91	13,90±4,53	16,79±3,25*	18,30±5,25
Нітрити	1,68±0,49	0,57±0,08*	0,92±0,18	1,36±0,42

\* – Різниця вірогідна щодо контролю  $P \leq 0,05$ .

Аналіз результатів свідчить, що за дії речовини № 2 спостерігається певна неузгодженість між вмістом нітратів і активністю NOS. Очевидно, зростання вмісту нітратів у цьому варіанті досліджу пов'язане не з генерацією  $\text{NO}^{\cdot}$  у процесі функціонування ферменту – NO-синтази, а унаслідок його вивільнення зі зв'язаної форми – нітрозопохідних і залізонітрозильних комплексів, у тому числі і з нітрозогемоглобіну.

Отримані результати дають підстави вважати, що спірокарбон із двома конденсованими ядрами та дві інші сполуки з конденсованими та роз'єднаними у просторі ядрами сприяють стабілізації еритроцитарних мембран, суттєво впливають на фізико-хімічні та функціональні властивості гемоглобіну, стан антиоксидантної системи, регулювання внутрішньоклітинних процесів через  $\text{NO}^{\cdot}$  та його деривати. Механізми взаємодії еритроцит – досліджувані синтезовані сполуки становлять інтерес і можуть бути розглянуті у подальших дослідженнях.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Артюхов В. Г. Гемопротеиды: закономерности фотохимических превращений в условиях различного микроокружения. Воронеж: ВГУ, 1995. 280 с.
2. Васильева Е. М. Биохимические особенности эритроцита. Влияние патологии // Биомедицинская химия. 2005. Т. 51. Вып. 2. С. 118–126.
3. Дудок К. П., Федорович А. М., Дудок Т. Г. та ін. Вплив спірокарбону та похідних піролопіримідиндіонів на фізико-хімічні характеристики лігандних форм гемоглобіну *in vitro* // Біологічні студії / *Studia Biologica*. 2009. Т. 3. № 2. С. 23–34.
4. Ересько В. А., Речицький А. Н., Бойко Р. Т. и др. Синтез и фармакологические свойства 1,6-замещенных-4-арил-2,3,4,5,6,7-гексагидро-(1H)пирроло-[3,4-d] пиримидинонов-2,5 // Физиологически активные вещества. 1995. Вып. 26. С. 27–30.
5. Иванов Ю. Г. Модификация спектрофотометрического метода определения кислородно-диссоциационных кривых гемоглобина // Бюл. эксп. биол. и медицины. 1975. № 11. С. 122–125.

6. *Ильина Л. В., Вережка С. В.* Лигандиндуцированное структурирование полиреактивных иммуноглобулинов // Укр. біохім. журнал. 2003. Т. 75. № 6. С. 56–61.
7. *Казакова В. В., Елкина Н. М.* Окислительная модификация и изменения внутримолекулярной гидрофобности гемоглобина А при инкубации эритроцитов человека в среде Фентона // Укр. біохім. журнал. 2007. Т. 79. № 4. С. 35–38.
8. *Киселик І. О., Луцик М. Д., Шевченко Л. Ю.* Особливості визначення нітратів та нітритів в периферичній крові у хворих на вірусні гепатити та при синдромі жовтяниці іншої етіології // Лаб. діагностика. 2001. № 3. С. 43–45.
9. *Королюк М. А., Иванова И. Г., Майорова И. Г.* и др. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. 1988. № 1. С. 16–18.
10. *Кошелева В. Д., Бойко Р. Т., Ересько В. А.* Влияние спирокарбона на гипоталамо-гипофизарную нейросекреторную систему (ГГНС) растущих животных // Материалы Всеукр. науч.-практ. конф. (Херсон, 1994). С. 103.
11. *Мороз О. М., Дудок К. П.* Іонотранспортні системи та структурно-функціональний стан еритроцита у хворих на хронічний алкоголізм // X з'їзд ВУЛТ. „Укр. мед. вісті” (Євпаторія, 2009). Т. 1–4. С. 192–193.
12. *Речицький О. Н., Ересько В. А., Дудок К. П., Сибірня Н. О.* Дослідження впливу „спірокарбону” на структурно-функціональний стан еритроцитарних мембран периферичної крові здорових людей та хворих на алкоголізм // Теорія і практика сучасного природознавства: матеріали III Всеукр. наук.-практ. конф. (Херсон, 2007). С. 47–52.
13. *Речицький О. Н., Пилипчик Л. Л., Косяк Т. А., Єзіков В. І.* Дослідження на рослинних об'єктах росту регулюючої активності спірокарбону та його похідних // Чорноморський бот. журнал. 2010. Т. 6. № 1. С. 89–94.
14. *Сибірня Н. О., Люта М. Я., Климишин Н. І.* Молекулярні механізми депонування оксиду азоту в еритроцитах // Біологічні студії / Studia Biologica. 2010. Т. 4. № 1. С. 143–160.
15. *Старикович Л. С., Дудок К. П., Сибірня Н. О.* та ін. Дослідження впливу спірокарбону на фізико-хімічні й біохімічні характеристики еритроцитів щурів у нормі та за алкогольної інтоксикації // Медична хімія. 2009. Т. 11. № 1. С. 58–62.
16. *Сумбаев В. В., Ясинская И. М.* Влияние ДДТ на активность синтазы оксида азота в печени, легких и головном мозге крыс // Совр. пробл. токсикологии. 2000. Т. 3. С. 3–5.
17. *Терсков И. А., Гительзон И. И.* Метод химических (кислотных) эритрограмм // Биофизика. 1954. Т. 11. Вып. 2. С. 259–266.
18. *Чувилін Ф. Т., Серебренникова Г. А., Евстигнеева Р. П.* Аллостерические регуляторы обратимой оксигенации гемоглобина // Биоорг. химия. 1990. 16 (9). С. 1157–1176.
19. *Bringold U., Ghafourifar P., Richter C.* Peroxynitrite formed by mitochondrial NO synthase promotes mitochondrial Ca<sup>2+</sup> release // Free Radic. Biol. Med. 2000. N 3–4. P. 343–348.
20. *Dudok K., Dudok T., Vlokh I.* et al. **Optical Spectra of Hemoglobin Taken from Alcohol Dependent Humans** // Ukr. J. Phys. Opt. 2005. Vol. 6. N 4. P. 142–145.
21. *Ghafourifa P., Cadenas E.* Mitochondrial nitric oxide synthase // Trends in Pharmacological Sciences. 2005. Vol. 26. Issue 4. P. 190–195.
22. *Perutz M. F.* Regulation of oxygen affinity of hemoglobin: influence of structure of the globin on the heme iron // Ann. Rev. Biochem. 1979. Vol. 48. P. 327–386.

Стаття: надійшла до редакції 31.08.12

доопрацьована 12.11.12

прийнята до друку 13.11.12

**ROLE OF PYRROLOPYRIMIDINEDIONS DERIVATIVES IN THE REGULATION OF HEMOGLOBIN PHYSICAL AND CHEMICAL CHARACTERISTICS AND HUMAN BLOOD ANTIOXIDANT ENZYMES ACTIVITY *IN VITRO***

**K. Dudok<sup>1</sup>, L. Starykovych<sup>1</sup>, A. Rechytskyi<sup>2</sup>, A. Shkavolyak<sup>3</sup>, N. Sybirna<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Ivan Franko National University of Lviv*

*4, Hrushevskiy St., Lviv 79005, Ukraine*

<sup>2</sup>*Kherson State University*

*27, 40 Years of October St., Kherson 73002, Ukraine*

<sup>3</sup>*Danylo Halytsky National Medical University*

*69, Pekarska St., Lviv 79010, Ukraine*

The effect of spirocarbon and pyrrolopyrimidinedione derivatives (substance № 1, 2, 3) on the stability of erythrocyte membrane, hemoglobin affinity for oxygen, catalase activity, activity of total, inducible and endothelial NOS, content of nitrites and nitrates in red blood cells hemolysate from healthy donors *in vitro* was examined. It was testified that that after one- and 24-hour incubation of erythrocytes with solutions of substances N 1 increased erythrocytes acid hemolytic resistance. Duration of maximum and total hemolysis significantly increases It was shown that spirocarbon and pyrrolopyrimidinedione derivatives increase hemoglobin affinity for oxygen, as evidenced by the reduction in P<sub>50</sub> parameter. In the experiment conditions showed a reduction in erythrocytes hemolysate catalase activity. Incubation of erythrocytes with substance №3 leads to increased inducible NOS activity, substance № 2 leads to reduced total NOS activity and increased total nitrates. Nitrite content decreased by incubation with substance № 1. Discusses mechanisms of pyrrolopyrimidinedione derivatives action on the structure of erythrocyte membranes, antioxidant enzyme activity and the hemoglobin affinity for oxygen.

*Keywords:* spirocarbon, pyrrolopyrimidinedione derivatives, erythrocytes, hemoglobin, oxygenation, catalase, NOS, nitrites, nitrates.

**РОЛЬ ПРОИЗВОДНЫХ ПИРРОЛОПИРИМИДИНДИОНОВ В РЕГУЛЯЦИИ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ГЕМОГЛОБИНА И АКТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ ФЕРМЕНТОВ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ КРОВИ ЛЮДЕЙ *IN VITRO***

**Е. Дудок<sup>1</sup>, Л. Старикович<sup>1</sup>, А. Речицкий<sup>2</sup>, А. Шкаволяк<sup>3</sup>, Н. Сибирная<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Львовский национальный университет имени Ивана Франко*

*ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина*

<sup>2</sup>*Херсонский государственный университет*

*ул. 40 лет Октября, 27, Херсон 73002, Украина*

<sup>3</sup>*Львовский национальный медицинский университет имени Данила Галицкого*

*ул. Пекарская, 69, Львов 79010, Украина*

Исследовали влияние спирокарбона и производных пирролопиримидиндионов (вещества № 1, № 2, № 3) на стабильность мембран эритроцитов, сродство гемоглобина к кислороду, каталазную активность, активность суммарной, индуцибельной и эндотелиальной NO-синтазы (NOS), содержание нитритов и нитратов в гемолизатах эритроцитов крови здоровых доноров *in vitro*. Установлено, что после одно- и 24-ча-



совой инкубации эритроцитов с растворами соединений № 1, № 2 и № 3 стойкость эритроцитов к кислотному гемолизу возрастает. Показано также, что исследуемые соединения влияют на сродство гемоглобина к кислороду, о чем свидетельствует снижение параметра  $P_{50}$ . В условиях эксперимента выявлено снижение каталазной активности в гемолизатах эритроцитов. Инкубация эритроцитов с соединением № 3 способствует повышению активности индуцибельной NOS, а с соединением № 2 – снижению активности суммарной NOS и **повышению содержания нитратов**. Содержание нитритов снижается после инкубации эритроцитов с соединением № 1.

*Ключевые слова:* спирокарбон, производные пирролопиримидинонов, эритроциты, гемоглобин, оксигенация, каталаза, NOS, нитриты, нитраты.

**CLINICAL SIGNIFICANCE OF USING METHOD OF FLUORESCENT PROBES AND  
METHOD OF WEDGE DEHYDRATION IN ASSESSING ALBUMIN PARAMETERS  
IN CANCER PATIENTS**

**N. Lukouskaya<sup>1</sup>, A. Shaforost<sup>1</sup>, A. Malenchenko<sup>1</sup>, V. Belyakovskiy<sup>2</sup>, D. Okuntsov<sup>2</sup>,  
T. Prigozhaya<sup>2</sup>, S. Stasenкова<sup>2</sup>, N. Krutilina<sup>2</sup>, L. Parkhomenko<sup>2</sup>**

*<sup>1</sup>Institute of Radiobiology of NAS of Belarus  
4, Fedunynskiy St., Gomel 246007, Belarus  
e-mail: irb@mail.gomel.by*

*<sup>2</sup>Gomel Regional Clinical Oncology Center  
2, Medical St., Gomel 246012, Belarus  
e-mail: ic@grcoc.gomel.by*

It is shown that the total albumin concentration in blood serum of healthy people and cancer patients is within normal range. A statistically significant change in parameters «effective albumin concentration» and «index of toxicity» that reflects the efficiency of radiation therapy, involving a process of destruction of tumor cells and an intake products of catabolism in the bloodstream. These results agree with data obtained by the method of wedge dehydration, which can be used to visualize the status of biological fluids and the impairment of their properties during pathological processes.

*Keywords:* albumin, cervical cancer, head and neck cancer, TAC, EAC, RAB, IT, method of wedge dehydration

**Introduction.** Most diseases and pathological conditions, including radiation damage of the body, develop against syndromes of exogenous or endogenous intoxication, accompanied by the accumulation of toxic compounds in excessive concentrations or forms that are not typical for normal metabolism. Major systems of the binding and transport of substances of different chemical nature in the body are immune antibodies, buffer system, blood cells, and plasma proteins. Dominant among these is the serum albumin.

Serum albumin is the main extracellular transport system, accounting for about 70% of plasma proteins. Molecule of albumin has a high affinity to many endogenous and exogenous physiologically active compounds, such as bilirubin, fatty acids, hemin, porphyrin derivatives, steroid hormones, heavy metals, etc., as well as a variety of xenobiotics – drug compounds and poisons. It should also be noted that the antioxidant activity of blood plasma to a large extent due to albumin. As a non-specific component of the antioxidant system serum albumin is highly effective in neutralizing free radicals. The antioxidant properties of serum albumin predetermine its properties under stress and pathological processes in the body [1].

Albumin, as a component of body fluid is present in all tissues and is an active member of the metabolic processes. About a third of its weight (120 g) is in the blood, the rest (300 g) is outside the bloodstream. Blood and tissue pools of albumin are exchanged and, therefore, blood albumin is an informative indicator of the metabolic processes of the body. Activity of such protein is determined by the conformational state of the molecule [4]. Under the influence of various physical and chemical factors in the complexation process there is a change of the spatial structure of the molecule, which is reflected in the functional activity of the protein, in the first place, the availability of binding sites [1, 4].

Institute of Physico-Chemical Medicine (Russian Federation) proposed fluorescence method for determining the state of binding sites of serum albumin, allowing to define such parameters as «total albumin concentration» and «effective albumin concentration» [1]. Based on published data [2–4, 6–8, 11, 13, 14], the definition of albumin parameters allows to estimate not only the number of molecules of serum albumin, but also their structural and functional changes in all phases of the diagnostic and therapeutic process in patients. However, in clinical practice, analysis of albumin parameters is not widely used.

V. N. Shabalina and S. N. Shatokhina developed a method of wedge dehydration, which allows to obtain information on the general status of various biological fluids using the morphological picture of a dried droplet (facies) [15, 16].

Biocolloids – serum of blood, is capable of spatial self-organization. The vast majority of protein molecules in the serum of blood are in the form of supramolecular complexes. Organized autowave structure of dehydrated drop reflects the state of these complexes. During the drying droplet of biological fluids occurs redistribution of organic and inorganic components of the drop followed by cracking of the surface: formed facies with radial and cellular structure. It has three clearly differentiated areas: central, peripheral and transitional. Formed static order is optically detected and gives information about the molecular organization bioliquid at the macroscopic level [12, 15, 16].

The purpose of this work – using the method of fluorescent probes and the method of wedge dehydration to study structural and functional state of human serum albumin of patients with cervical cancer, head and neck cancer during radiation therapy.

#### Materials and methods

We studied serum albumin of 47 people: 13 healthy (control); 11 patients with cervical cancer undergoing a split course of radiation therapy (first stage – 30 Gy, with a break of three weeks the second stage – 20 Gy); 4 patients with the same diagnosis, undergoing an unsplit radiotherapy (40 Gy); 19 patients with head and neck cancer undergoing an unsplit radiation therapy (70 Gy).

State of binding sites of serum albumin was estimated by the method of Y.A. Gryzunov et al. [1]:

- Total Albumin Concentration (TAC) – the number of albumin molecules;
- Effective Albumin Concentration (EAC) – the number of unoccupied binding sites of albumin;
- Reserve Albumin Binding (RAB=EAC/TAC·100%) – reflects the degree of structural modification of the protein;
- Index of Toxicity (IT=TAC/EAC-1) – characterizes the filling of albumin centers by toxic ligands.

For optimum accuracy of the analysis temperature of the samples during the measurements was  $+23\pm 2^{\circ}\text{C}$ .

This method is based on the specific binding of the fluorescent probe K-35 and albumin in serum of blood. Probe was synthesized by B. M. Krasovitskiy, L. I. Kormilovoy and I. G. Ermolenko (Harkov), contains a carboxyl group, which at pH 7.4 carries a negative charge [1, 7].

D. E. Dobretsov and Y. I. Miller [1, 7] shows that the molecules of probe – organic anion, has fluorescence maximum at in 515 nm. If serum of blood is divided on fractions, that the probe in the lipoprotein fraction fluoresces very weakly, as in the buffer solution without protein. Significant fluorescence is observed only in the albumin fraction. Adding globulin to albumin fraction does not affect the fluorescence. Thus, virtually all fluorescent signal of K-35 in the serum of

blood due to the molecules of probe bound to albumin. About 23% the molecules of K-35 in albumin associated with the centers, where the water can not access the probe. Centers of type 1 and 2 account for about 50% of the total fluorescence of the probe. Consequently, the fluorescence of K-35 is equally responsive to the presence in albumin metabolites, which fill both centers.

It should be noted there is a decrease of binding of the probe K-35 with albumin in the serum of patients, the reasons for this are:

- \* competition of dye and other low-molecular ligands, mostly hydrophobic, for binding sites in albumin;

- \* interaction albumin with high-molecular components of plasma and impairment of «adaptation» of centers of albumin to ligands.

To determine the total albumin concentration the research are carried out at pH=4.2 and in the presence of nonionic detergent bridge-35. The shift of pH to the acid side induces a conformational transition N-F of the molecule of albumin. In this case, there is a decrease and alignment (in value) of binding constants of various ligands to albumin, as well as «opening» of the binding sites of molecule by increasing its ellipticity. Thus, binding of interfering hydrophobic ligands to albumin is weak. Bridge-35 the following functions: its micelles serve as «buffer capacity» to probe K-35 and competitively fulfils (in relation to albumin) bind hydrophobic ligands; detergent solubilizes the high-molecular components of serum of blood, thus, preventing their interaction with albumin. As a result of these actions of both pH, and detergent the binding sites of albumin are mostly free, and the conformation of the protein – stabilized.

At physiological pH the fluorescence intensity of the probe K-35, upon interaction with serum albumin, depends not only on the concentration of the protein, but also on the physical and chemical state of its globules: the presence of ligands (metabolites, toxins), covalent and non-covalent modification of amino acid residues, the conformation – that is, factors, which vary depending on the condition of the body. This fluorescence intensity is expressed in units of concentration (g/l) and is called «effective albumin concentration».

Besides investigating using fluorescence method in the blood of examined patients was analyzed the state of the serum of blood by method of wedge dehydration. Initially, blood samples were centrifuged (3 min at 3000 rpm), and then 10 µl of serum was applied to a glass slide, skim alcohol. To verify the identity of paintings of dried droplets (facies) produced 2–3 reps. Drying was carried out for 24 hours at room temperature. Facies were studied using an optical microscope in transmitted and reflected light [15, 16].

Analysis of the data was performed using GraphPad Prizm 4.0. Statistical processing is made using t-test at a significance level  $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ . Data are presented as the mean  $\pm$  standard deviation ( $M \pm m$ ).

### Results and discussion

In the course of the study it was found that TAC in healthy people and patients with head and neck cancer, cervical cancer at admission to hospital was within the normal range (Table 1–2).

In the analysis of the EAC in healthy this index was 46.68 g/l and was significantly decreased to 29.24 g/l in patients with head and neck cancer; in patients with cervical cancer was 35.87 g/l (at admission to a split course of treatment) and 33.40 g/l (at admission to an unsplit course of treatment). Index of IT was 0.05 in healthy; in patients with head and neck cancer 0.68; in gynecological cancer patients – 0.48 (at admission to a split treatment) and 0.55 (at admission to an unsplit treatment).

In healthy people, mainly albumin binding sites are free from toxic ligands, so EAC is close to TAC. Consequently, IT is close to zero. At pathological processes of various origins EAC becomes lower TAC owing to filling centers of albumin by toxins and increases in the value of IT.

Value of RAB in healthy people is 95.06%; in patients – 61.34% in head and neck cancer and 71.02% in cervical cancer (at admission to a split treatment) and 64.80% (at admission to an unsplit treatment).

In the middle of a treatment course (40–50 Gy) in patients with head and neck cancer observed the 2nd stage of the radiation reactions and damage on a scale EORTC/RTOG evaluation of acute radiation reactions, and values of IT decreased on 14.7% as compared to patients at admission to treatment.

Upon completion of the treatment of patients with cervical cancer undergoing a split course of radiation therapy the values of parameters were as follows: TAC significantly increased to 55.48 g/l; the EAC has remained virtually unchanged and at the end of the 2nd stage was 34.39 g/l; IT=0.72 after the 1st stage of treatment, but after the 2nd increased from 0.56 to 0.66. In patients who undergoing an unsplit course of therapy: TAC had no significant difference before and after radiation therapy; EAC=33.25 g/l; IT has increased on 56.3% and become 0.86.

Perhaps change the values of IT (0.66 and 0.86) in patients with cervical cancer undergoing a course of radiotherapy in different modes, due to the fact that during a three-week break between the two stages of the split course the available toxins eliminated from the body. The latter follows from the data: IT=0.72 after the 1st stage of the split course and IT=0.56 at admission to the 2nd stage.

In patients with head and neck cancer at the end of radiation therapy the values of indexes were as follows: EAC=30.78 g/l; the values of TAC was not significantly different before and after treatment; RAB was 68.39%; IT down to 0.52.

Table 1

Indicators TAC, EAC, RAB and IT in the serum of blood of healthy people and patients with head and neck cancer undergoing the radiation therapy

Index	Healthy people (n=13)	Patients with head and neck cancer (n=19)		
		admission	middle course	hospital discharge
TAC, g/l	49.21±1.37	47.84±2.10	45.05±1.82	44.92±1.73
EAC, g/l	46.68±1.19	29.24±1.69**	29.36±1.75**	30.78±1.73**
RAB, %	95.06±1.27	61.34±2.61**	64.73±2.39**	68.39±3.24**
IT, rel. units	0.05±0.01	0.68±0.07**	0.58±0.05**	0.52±0.07**

**Comment.** The reliability of indices when compared to control: \* – P<0.05; \*\* – P<0.01

Table 2

Indicators TAC, EAC, RAB and IT in the serum of blood of healthy people and patients with cervical cancer undergoing radiation therapy

Index	Healthy people (n=13)	Gynecological cancer patients undergoing a split course of radiotherapy (n=11)				Gynecological cancer patients undergoing an unsplit course of radiotherapy (n=4)	
		admission to the 1st stage	hospital discharge	admission to the 2nd stage	hospital discharge	admission	hospital discharge
EAC, g/l	46.68±1.19	35.87±2.77**	30.44±3.00**	32.29±1.36**	34.39±1.97**	33.40±3.28**	33.25±8.14*
RAB, %	95.06±1.27	71.02±4.89**	60.91±4.03**	65.23±2.88**	62.84±3.98**	64.80±2.81**	58.10±9.62*
IT, rel. units	0.05±0.01	0.48±0.10**	0.72±0.13**	0.56±0.07**	0.66±0.14*	0.55±0.06**	0.86±0.29**

**Comment.** The reliability of indices when compared to control: \* – P<0.05; \*\* – P<0.01

Thus, from the obtained data the values of IT at the end of radiation therapy are controversial: an increase IT in patients with cervical cancer and lower IT in patients with head and neck cancer.

Perhaps the dynamic changes of IT after radiation therapy in patients with different tumor localization related to the complex influence of the following factors:

1. *Distinctive modes of radiation therapy*: 1st group of patients with cervical cancer undergoing a split course of radiation therapy (1st stage – 30 Gy, with an interval of 3 weeks, 2nd stage – 20 Gy), 2nd group of patients with cervical cancer undergoing an unsplit radiotherapy (40 Gy), 3rd group of patients with head and neck cancer undergoing unsplit course of radiotherapy (70 Gy).
2. *Individual radiosensitivity of patients to the action of the radiation factor (a course of radiation therapy)*: patients have different rate of occurrence of the metabolic processes and the destruction of tumor cells and their subsequent elimination.
3. *Radiotoxins action*: the concept of radiotoxins as substances are produced in the body by radiation, which are biologically active, and causing radiation effects in the irradiated organism, dated back to the early days of radiobiology. As radiotoxins may be: quinones, unsaturated fatty acids, organic and inorganic peroxides, protein decomposition products, choline, histamine, protein antigens, various metabolites and cytotoxic agents unexplored nature. It is known that at radiation therapy observed treatment effect will be due to cell death, which occurs under the influence of the direct action of high-energy particles on the unique cellular structure, and as a result of secondary processes, including the action occurring in the tumor tissue radiotoxins which will play a significant role in attacking the unique structure, preventing their repair [5, 9].

Primary importance in the transmission of the radiation influence is blood which in the irradiated organism acquires new biological properties: contains various radiotoxins. As mentioned above, the basic system of binding and transport of substances of different chemical nature, including radiotoxins is serum albumin. Thus, dynamic change of values of IT, characterizing the filling of albumin centers by toxic ligands, illustrates the individual characteristics of the transport system of serum albumin of cancer patients.

Structural and functional changes of albumin in cancer identified by fluorimetry, are consistent with data obtained by the method of wedge dehydration. It is known that facies of healthy people have a pronounced right radial structure of the cracks and the lack of any additional structures (Fig. 1) [10].

Figures 2 and 3 show the changes of the morphological picture of serum of blood of patients with cervical cancer at admission to treatment, and after a course of radiotherapy. In the initial stages of treatment there is a tendency to worsen morphological picture of serum albumin, resulting in a violation of the radial symmetry of facies and appearance of pathological formations. By the end of treatment the morphological picture of serum of blood has a broken radial symmetry. This fact can be explained by the presence in the blood of the decay products of tumor cells (radiotoxins) formed during the course of radiotherapy. This is confirmed by an increase of IT at the time of discharge of patients.

Study of the reaction of the organism to radiation during the full course of radiation therapy in patients with head and neck cancer revealed distorted morphology of facies from admission (Fig. 4) to the middle of the course (Fig. 5), which also can be associated with the arrival of the decay products of tumor cells to blood and the presence of formed radiotoxins. At the moment of discharge of patients there is an improvement of the morphological picture of facies (Fig. 6), manifested in the sequence and reconstruction of the radial structure.

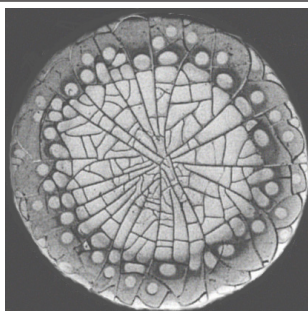


Fig. 1. Facies of serum of healthy human.

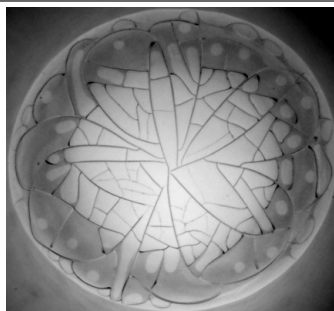


Fig. 2. Facies of serum of patient with cervical cancer at admission to treatment.



Fig. 3. Facies of serum of patient with cervical cancer after a course of radiotherapy.

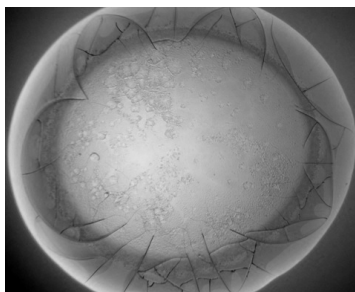


Fig. 4. Facies of serum of patient with cancer of the head and neck at admission to treatment.

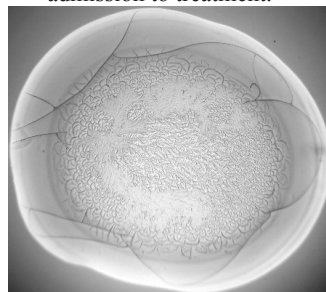


Fig. 5. Facies of serum of patient with cancer of the head and neck in the middle of the course of treatment.

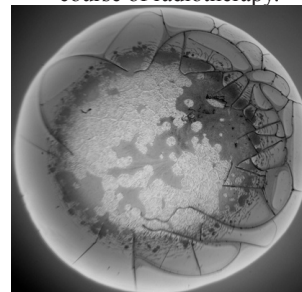


Fig. 6. Facies of serum of patient with cancer of the head and neck after a course of radiotherapy.

Morphological pictures of presented facies of serum of patients with cancer of the head and neck at the stage of admission and discharge are consistent with data of IT.

**Conclusions.** The total albumin concentration in healthy and cancer patients is within the normal range. Statistically significant change in the values of the effective albumin concentration, the reserve albumin binding and the index of toxicity during radiation therapy reflects the effectiveness of the use of low-cost method of fluorescent probes to quickly obtain information about the dynamics of the flow of the disease process. Wedge dehydration method can be used as an additional way to visualize the effect of external factors on the structural state of biological fluids.

#### LITERATURE

1. Serum albumin in clinical medicine / Ed. Y. A. Gryzunov, D. E. Dobretsov. M.: IRIUS, 1994. 226 p.
2. Afanasiyeva A. N., Yevtushenko V. A. The clinical significance of determining albumin indicators in cancer patients // *Anaesthesia and Intensive Care*. 2004. N 6. P. 64–67.
3. Gavrilov V. B., Bidula M. M., Furmanchik D. A. et al. Evaluation of intoxication of organism by imbalance between accumulation and binding of toxins in the blood plasma // *Clin. Lab. Diagnostics*. 1999. N 2. P. 13–17.
4. Gryzunov Y. A., Sachs I. O., Moroz V. V. et al. Serum albumin: properties, functions, and their evaluation at critical conditions // *Anaesthesia and Intensive Care*. 2004. N 6. P. 68–74.
5. Kuzin A. M., Kopylov V. A. Radiotoxins. M.: Science, 1983. 174 p.

6. *Lukouskaya N. D., Gromyko N. L., Baranovskaya E. I. et al. Clinical significance of determining the state of binding sites of human serum albumin during pregnancy // News of NAS of Belarus. Series of Med. Sci. 2008. N 3. P. 58–63.*
7. *Miller Y. I. Binding of xenobiotics by serum albumin // Clin. Lab. Diagnostics. 1993. N 1. P. 34–40.*
8. *Prokhorova V. I., Tsyryus T. P., Pasko L. I. et al. Structural and functional state of human serum albumin in the surgical treatment of esophageal cancer // Actual problems of Oncology and Medical Radiology: Collection of Scientific Papers: Minsk, 2000. P. 117–121.*
9. *Radiotoxins, their nature and role in the biological effects of high energy radiation / Ed. A. M. M. Kuzin. Atomizdat, 1966. 293 p.*
10. *Selivanenko V. T., Shatokhina S. N., Dudakov V. A. Diagnostic value of morphological picture of blood serum in patients with infective endocarditis // Cardiology and Cardiovascular Surgery. 2008. N 2. P. 80–84.*
11. *Sidorenko Y. S., Vladimirova L. Y., Frantsiyants E. M. Effect of chemotherapy on the structure and functional properties of blood serum albumin in patients with breast cancer // Quest. Oncol. 2001. Vol. 47. N 3. P. 303–306.*
12. *Sidorov P. I., Kirpitch I. A., Volchetskiy A. L. Crystallographic studies of blood serum of patients with chronic alcoholism // Addiction. 2002. N 1. P. 9–13.*
13. *Smolyakova R. M. The study of structural and functional state of serum albumin in patients with lung cancer by the method of EPR-spectroscopy // Health. 1998. N 11. P. 17–20.*
14. *Smolyakova R. M. Changes in the physico-chemical characteristics of the conformational state of serum albumin and their clinical significance in patients with lung cancer: Authoref. Dissertation ... PhD: 03.12.01. Minsk, 1999. 21 p.*
15. *Tarasevich Y. Y. Mechanisms and models of the dehydration self-organization in biological fluids // Successes of Physical. Sci. 2004. Vol. 174. N 7. P. 779–790.*
16. *Shabalin V. N., Shatokhina S. N. The morphology of human biological fluids. M.: Chrysostom, 2001. 304 p.*

*Стаття: надійшла до редакції 14.10.10*

*доопрацьована 02.03.12*

*прийнята до друку 05.03.12*



**КЛІНІЧНЕ ЗНАЧЕННЯ ВИКОРИСТАННЯ МЕТОДІВ ФЛЮОРЕСЦЕНТНИХ  
ЗОНДІВ І КЛИНОПОДІБНОЇ ДЕГІДРАТАЦІЇ В ОЦІНЦІ АЛЬБУМІНОВИХ  
ПОКАЗНИКІВ ОНКОХВОРИХ**

**Н. Луковська<sup>1</sup>, А. Шафорост<sup>1</sup>, А. Маленченко<sup>1</sup>, В. Беляковський<sup>2</sup>, Д. Окунцов<sup>2</sup>,  
Т. Пригожа<sup>2</sup>, С. Стасенкова<sup>2</sup>, Н. Крутіліна<sup>2</sup>, Л. Пархоменко<sup>2</sup>**

*<sup>1</sup>Інститут радіобіології НАН Білорусі  
вул. Федюнинського, 4, Гомель РБ 246007, Білорусь  
e-mail: irb@mail.gomel.by*

*<sup>2</sup>Гомельський обласний клінічний онкодиспансер  
вул. Медична, 2, Гомель РБ 246012, Білорусь  
e-mail: ic@grcoc.gomel.by*

Показано, що загальна концентрація альбуміну сироватки крові здорових людей і онкохворих перебуває в межах нормальних значень. Виявлено статистично достовірну зміну показників «ефективна концентрація альбуміну» й «індекс токсичності», яка відображає ефективність проведеної променевої терапії, пов'язану з процесом руйнування пухлинних клітин і надходженням продуктів катаболізму в кров'яне русло. Отримані результати узгоджуються з даними, отриманими методом клиноподібної дегідратації, який може бути використаний для візуалізації стану біологічних рідин і порушення їхніх властивостей при патологічних процесах.

*Ключові слова:* альбумін, рак шийки матки, рак голови і шиї, ОКА, ЕКА, РСА, ІТ, метод клиноподібної дегідратації.

**КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДОВ  
ФЛЮОРЕСЦЕНТНЫХ ЗОНДОВ И КЛИНОВИДНОЙ ДЕГИДРАТАЦИИ В ОЦЕНКЕ  
АЛЬБУМИНОВЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ОНКОБОЛЬНЫХ**

**Н. Луковская<sup>1</sup>, А. Шафорост<sup>1</sup>, А. Маленченко<sup>1</sup>, В. Беляковский<sup>2</sup>, Д. Окунцов<sup>2</sup>,  
Т. Пригожая<sup>2</sup>, С. Стасенкова<sup>2</sup>, Н. Крутилина<sup>2</sup>, Л. Пархоменко<sup>2</sup>**

*<sup>1</sup>Інститут радіобіології НАН Білорусі  
ул. Федюнинского, 4, Гомель РБ 246007, Білорусь  
e-mail: irb@mail.gomel.by*

*<sup>2</sup>Гомельський обласний клінічний онкодиспансер  
ул. Медицинская, 2, Гомель РБ 246012, Білорусь  
e-mail: ic@grcoc.gomel.by*

Показано, что общая концентрация альбумина сыворотки крови здоровых людей и онкобольных находится в пределах нормальных значений. Выведено статистически достоверное изменение показателей «эффективная концентрация альбумина» и «индекс токсичности», которая отражает эффективность проведенной лучевой терапии, связанную с процессом разрушения опухолевых клеток и поступлением продуктов катаболизма в кровяное русло. Полученные результаты согласуются с данными, полученными методом клиновидной дегидратации, который может быть использован для визуализации состояния биологических жидкостей и нарушения их свойств при патологических процессах.

*Ключевые слова:* альбумин, рак шейки матки, рак головы и шеи, ОКА, ЭКА, РСА, ИТ, метод клиновидной дегидратации.

## ОСОБЛИВОСТІ ВЕГЕТАТИВНОГО РОЗМНОЖЕННЯ МОХОПОДІБНИХ НА ВІДВАЛАХ СІРЧАНОГО ВИДОБУТКУ

**О. Лобачевська, І. Рабик**

*Інститут екології Карпат НАН України  
вул. Стефаника, 11, Львів 79000, Україна  
e-mail: morphogenesis@mail.lviv.ua*

Визначено основні типи вегетативного розмноження мохоподібних на відвали № 1 Язівського сірчаного родовища Новояворівського гірничо-хімічного підприємства “Сірка”. Установлено особливості морфології безстатевих репродуктивних пропагул доміантних видів і їх розвитку *in vivo*. Проаналізовано вплив 2% і 4% поліетиленгліколю (ПЕГ-6), 5 мкМ і 10 мкМ абсцизової кислоти (АБК), 5% сахарози та 10 мкМ АБК + 5% сахарози на активацію дедиференціації хлоронеми *Barbula unguiculata*, *Bryum dichotomum*, *B. argenteum* і *B. caespiticium* у геми та формування бульбочок *in vitro*. З’ясована участь спеціалізованих безстатевих пропагул і гем як важливої фази життєвого циклу дводомних видів мохів-поселенців у реалізації життєвої стратегії толерантності до екстремальних умов девастованих територій.

*Ключові слова:* мохоподібні, девастовані території, розмноження, ризоїдні бульбочки, геми.

У бріофітів вегетативне розмноження трапляється у різноманітних формах, які розділяють на три основні типи: вегетативні органи, фрагментація та спеціалізовані безстатеві репродуктивні пропагули [10, 11, 13, 17, 19, 20]. Переважно дводомні багаторічні види мохів, які досить часто бувають стерильними, розмножуються лише вегетативно. Найпростіший і одночасно досить поширений спосіб вегетативного розмноження полягає у відокремленні молодих пагонів унаслідок відмирання розгалуженого материнського пагона знизу, або підземної частини його столонів. Зазвичай будь-який ізольований фрагмент моху в достатньо сприятливих умовах здатний утворювати вторинну протонеми і нові рослини. Серед спеціалізованих репродуктивних органів розрізняють виводкові пропагули (ламкі стебла, гілки, флагели, виводкові бруньки та ризоїдні бульбочки), які мають апікальну клітину і тому можуть проростати в пагін без утворення протонеми, та геми (оппадаючі листки, хлоронемні й ендогенні геми), які через відсутність апікальної клітини завжди починають ріст із утворення протонеми [8].

Вважається [3, 12, 13], що висока регенераційна здатність, яка була втрачена складніше організованими вищими наземними рослинами як примітивна адаптивна ознака, у мохоподібних, навпаки, еволюціонувала. З розвитком різних пристосувань гаметофіта спеціалізовані типи безстатевих пропагул за структурно-функціональною організацією стали істотно складнішими, надзвичайно поширеними та значно важливішими для відтворення у несприятливих кліматичних умовах. Оскільки вегетативне розмноження відіграє важливу роль у життєвій стратегії виду й адаптації бріофітів до екстремальних і нестійких умов середовища [7, 12, 22], то вивчення розмірів та форми клітин, кольору, кількості й місця утворення різних типів спеціалізованих безстатевих репродуктивних пропагул і їхнього морфогенезу дає можливість з’ясувати участь банку діаспор у заселенні й утворенні мохо-

вих угруповань, підтримці та регуляції популяції мохів на девастованих територіях. Окрім того, останнім часом виводкові органи дедалі частіше використовують як важливу діагностичну ознаку в таксономії та молекулярних дослідженнях мохоподібних, для культури тканин і формування біотичного шару, для стабілізації поверхні дюн і пустель [6, 13, 24, 25].

У зв'язку з цим метою роботи було визначити основні типи вегетативного розмноження мохоподібних на відвалах видобутку сірки, встановити особливості морфології безстатевих репродуктивних пропагул доміантних видів і їхнього розвитку *in vitro*.

### Матеріали та методи

Об'єктом вивчення були мохоподібні породного відвалу № 1 Язівського сірчаного родовища Новояворівського гірничо-хімічного підприємства "Сірка". Систематичний аналіз зібраних мохоподібних здійснювали за В. Баком і Б. Гофінетом [5]. Зразки доміантних видів добирали й аналізували з основи, середньої частини та вершини північного і південного схилів відвалу. З кожного місцевиростання у 10 випадково відібраних дернинах розміром 3 x 3 см визначали тип і кількість виводкових пропагул [1, 2, 8, 14]. У роботі використовували природні зразки та лабораторну стерильну культуру мохів (*Barbula unguiculata* Hedw., *Bryum caespiticium* Hedw., *B. dichotomum* Hedw. та *B. argenteum* Hedw.). Для посіву спор коробочки стерилізували 10%-ним розчином сулеми. Ізольовані листки та фрагменти гаметофорів промивали водопровідною водою, стерилізували 1 хв 20%-ним дезінфікуючим розчином "Білізна" і тричі відмивали стерильною дистильованою водою. Культуру вирощували на 0,75%-ному агаризованому середовищі Кноп II у контрольованих умовах освітлення (2,0–2,2 тис. лк), температури (22–23°C), вологості (90–95%) і в 16-годинному світловому режимі. Через 7 днів протонему знімали препарувальною голкою з агару вихідної культури моху й у вигляді клубка переносили у чашки контролю (стандартне агаризоване середовище Кноп II) та дослідні (поживне середовище з 2% і 4% поліетиленгліколем (ПЕГ-6), 5 мкМ і 10 мкМ абсцизовою кислотою (АБК), 5% сахарозою та 10 мкМ АБК + 5% сахарози) згідно із загальноприйнятими методиками [3, 16, 18, 23, 24]. Культури мохів аналізували протягом трьох місяців і фотографували під стереомікроскопом Stemi 2000-C (Karl Zeiss). Усі експерименти проводили у 3-х повторностях, аналізуючи ріст і розвиток протонеми й особливості виводкових органів у не менше ніж 75 протонемних дернинах.

### Результати і їхнє обговорення

Установлено, що у мохів, окрім вегетативного самоклонування фрагментами протонеми, пагонів, листків, важливе значення для розвитку популяції на девастованій території мають численні інновації, які утворюються переважно під гаметангієм, завдяки чому рослини отримують більшу кількість світла, води і поживних речовин для забезпечення кращої життєздатності й репродукції (рис. 1). На відвалі № 1 Язівського сірчаного родовища спеціалізовані органи безстатевого розмноження знайдено у 7 дводомних видів бріофітів зі 49 видів, визначених для цієї території: у *Barbula unguiculata*, *Bryum caespiticium*, *B. dichotomum*, *B. pseudotriquetrum* (Hedw.) Gaertn., Meyer et Scherb. і *Leptobryum pyriforme* (Hedw.) Wils. (підземні ризоїдні бульбочки), в пазухах листків *Bryum argenteum*, *B. dichotomum* та на кінцях слані печіночника *Pellia endiviifolia* (Dicks.) Dumort. (виводкові лопаті). Установлено, що на відвалі майже всі доміантні види мохів утворюють підземні ризоїдні бульбочки, окрім *B. argenteum*. Для цього моху в сухіших умовах південного схилу відвалу відзначено істотне посилення галуження стебел і утворення на їхніх верхівках численних грон із овальних пазушних виводкових бруньок, які легко опадають, а у вологіших місцях північного схилу – значно більших ламких кінцевих гілочок (рис. 1, а).

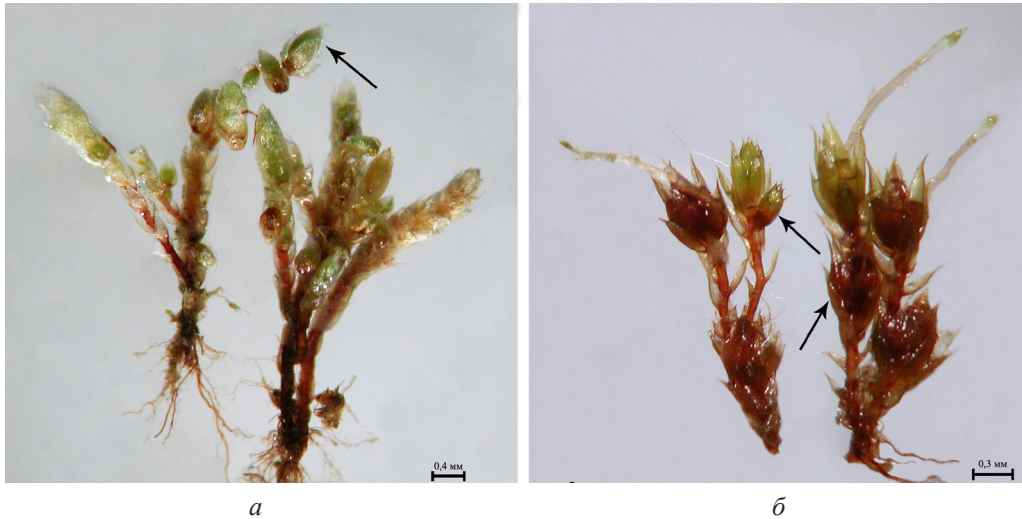


Рис. 1. Виводкові бруньки в пазухах листків *Bryum argenteum* (а) та під брунькоподібним андроцеєм *B. dichotomum* (б).

У пазухах верхівкових листків *B. dichotomum* густо формуються зелено-бурі, яйцеподібні та подовгасто-яйцеподібні виводкові бруньки з маленькими листочками, які після опадання швидко розвиваються у нові пагони без розростання протонеми. Відзначено, що виводкові органи утворюються на верхівках не лише стерильних, а й чоловічих і жіночих рослин (рис. 1, б).

На кінцях слані печіночника *P. endiviifolia* часто трапляються короткі, дуже розгалужені світло-зелені лопаті, які легко відриваються та проростають у нові рослини (рис. 2).



Рис. 2. Чоловіча слань *Pellia endiviifolia* з виводковими лопатями.

Для підземних сформованих бульбочок усіх проаналізованих видів мохів характерною ознакою є яскраво-оранжеве забарвлення, яке після їхнього відмивання від субстрату

поступово стає червоно-бурим. Завдяки значному запасу крохмалю в пластидах, ліпідів у цитоплазмі та білків у вакуолях [9, 13], підземні бульбочки на низьких інтенсивностях освітлення швидко проростають і формують дернину з нових вертикальних гаметофорів, кількість і щільність яких залежить від чисельності життєздатних виводкових пропагул. Утворення багатоклітинних ризоїдних бульбочок переважно відзначали для молодих пагонів, зазвичай, на дистальних кінцях головних ризоїдів. Ризоїдні бульбочки (округлі або грушоподібні з досить потовщеними стінками) сприяють успішному розселенню мохових дернин мохів на початкових стадіях сукцесій заростання порушених територій.

Чисельність бульбочок змінювалася залежно від рівня зволоження і температурних умов на схилах відвалу та мікросередовища мохової дернини: щільності гаметофорів і потужності розвитку ризоїдного шару. Незважаючи на те, що виводкові тільця, як правило, не потребують для розвитку відповідних сезонних умов, однак найбільше ризоїдних бульбочок закладалося восени і ранньою весною в середньому 5–7 на один пагін, переважно на вершині відвалу в *Barbula unguiculata* і *Bryum caespitium* та посередині схилів у *B. dichotomum*, *B. pseudotriquetrum* та *Leptobryum pyriforme*. У моховій підстилці основи відвалу ризоїдних бульбочок не виявлено.

На вершині й середній частині південного схилу відвалу в нестабільних умовах високої інсоляції та пересихання субстрату *B. caespitium* сформував щільну дернину з потужним ризоїдним шаром і великою кількістю бульбочок, що, очевидно, повністю компенсувало обмежену здатність до статевому розмноженню та забезпечило його виживання (рис. 3, а). Відтворення *Barbula unguiculata*, яка утворює пухку дернину, досягалося завдяки активному статевому розмноженню і формуванню численних (10 і більше) ризоїдних бульбочок (рис. 3, б). У посушливих умовах південного схилу листки і стебла скручувалися, ламкість дернин збільшувалася – в результаті окремі пагони з виводковими органами відокремлювались і поширювались на сусідні території.

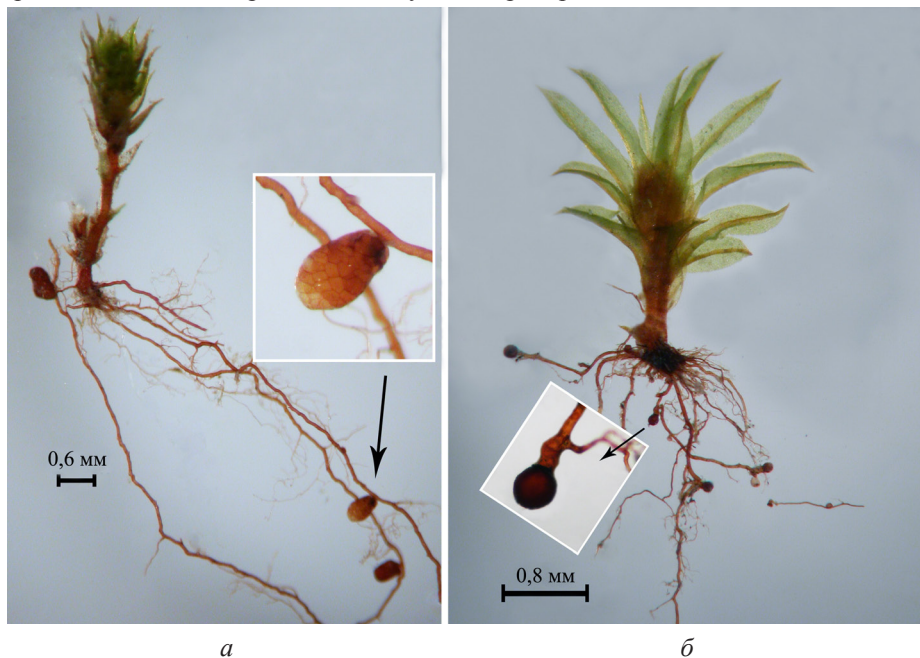


Рис. 3. Підземні ризоїдні бульбочки *Bryum caespitium* (а) та *Barbula unguiculata* (б).

У *Barbula unguiculata* і *Bryum caespiticium* бульбочки закладалися на столонах сильно розгалуженої ризоїдної протонеми – як великі, зрілі з пігментованими клітинними стінками, 195–210 мкм, так і дрібні, світло-зелені, 35–40 мкм. У *Bryum pseudotriquetrum* (рис. 4) ризоїдні бульбочки утворювалися безпосередньо на головних ризоїдних столонах і їхніх дистальних кінцях.

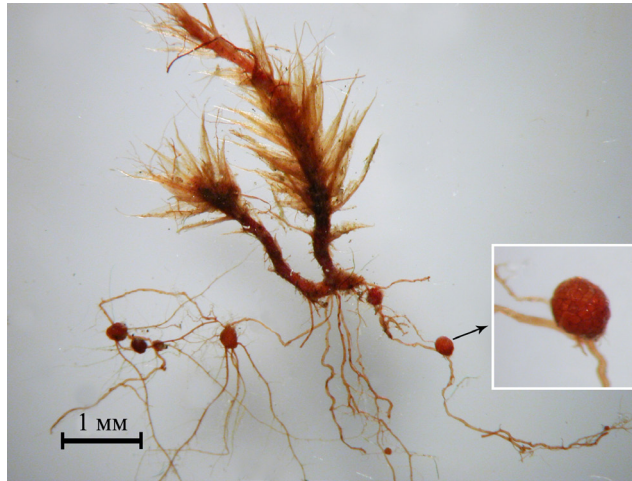


Рис. 4. Ризоїдні бульбочки *Bryum pseudotriquetrum*.

Багатоклітинні бульбочки моху, сформовані з невеликих потовщених клітин сферичної форми, діаметром 30–50 мкм, прикріплювалися до ризоїда “ніжкою” виводкової бульбочки, переважно з 1–2 ламких видовжених клітин. Молоді, зелені, майже округлі, виводкові бульбочки *B. pseudotriquetrum* мали розмір 106–178 x 206–248 мкм, сформовані зрілі, грушоподібної форми з червоно-коричневим забарвленням – 150–170 x 312–484 мкм (рис. 4). Їх знаходили на ризоїдах як стерильних, так і фертильних рослин, здебільшого у чоловічих дернинах, мабуть, через те, що розвиток спорофіта на жіночих рослинах потребує значно більших енергетичних затрат, ніж утворення андроцеїв [4].

У *B. dichotomum* бульбочки переважно знаходили в основі стерильних пагонів, на дистальних кінцях ризоїдів або на довгих ризоїдних гілках до 50–60 мкм (рис. 5, а). На відміну від бульбочок *B. pseudotriquetrum*, вони були меншими (55–67 x 76–104 мкм, зрідка до 136 x 142 мкм) з нечіткими клітинами, але на ризоїдах одного пагона їх було значно більше (до 12 штук), ніж у інших видів роду *Bryum* Hedw. (5–7). Неодноразово підземні бульбочки спостерігали на ризоїдах пагонів, на яких інтенсивно утворювалися виводкові бруньки як навесні, так і у попередні сезони, про що свідчили сліди їх прикріплення на стеблі (рис. 5, а). Утворення численних виводкових бруньок і ризоїдних бульбочок у *B. dichotomum* дає можливість сформувати потужні вегетативні клони на південному схилі та забезпечити його виживання за несприятливих умов літа (високих температур, нестачі вологи).

У *Leptobryum pyriforme* ризоїдні бульбочки були від округлих до овальних (93–116 x 120–148 мкм), сформовані з 5–6 великих клітин (70 x 80 мкм), переважно на досить довгих ризоїдних гілках (до 290 мкм). Окрім ризоїдів, виводкові бульбочки без хлоропластів знаходили у пазухах листків на підземних етіологованих пагонах (рис. 5, б). Оскільки у невеликих коробочках *L. pyriforme* утворюється небагато великих спор, які поширюються на незначні віддалі, то, очевидно, масове утворення виводкових органів сприяє виживанню моху і його збереженню.

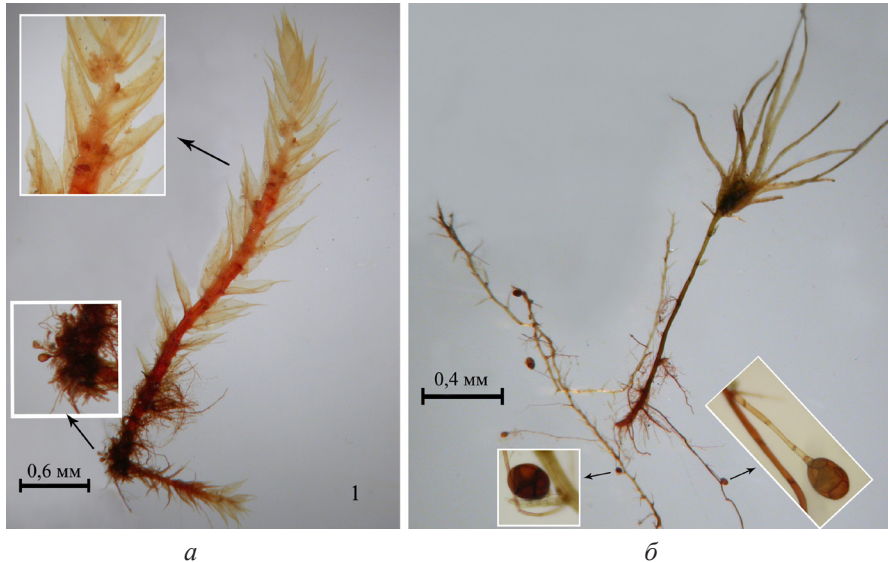


Рис. 5. Пагінь *Bryum dichotomum* з молоденькими пазушними виводковими бруньками на верхівці стебла та підземними ризоїдними бульбочками в його основі (а) та *Leptobryum pyriforme* з бульбочками на ризоїдних гілках і в пазухах листків підземних пагонів (б).

На відвалі лише для домінуючих дводомних верхоплідних мохів властиве і вегетативне, і генеративне розмноження. Формування спеціалізованих репродуктивних органів, таких як виводкові бруньки, ризоїдні бульбочки, потребує набагато менших енергетичних затрат [4], ніж утворення спор, і, як правило, не потребує відповідних сезонних умов [19, 20]. Мохи ростуть переважно групами, утворюючи більш або менш щільні дернини, що зумовлює утворення мікроумов в окремих дернинах, а саме власного мікросередовища. Слід відзначити, що для утворення спорогонів, які, без сумніву, найважливіші для успішного поширення виду, мохоподібні потребують умов, які не завжди відповідають середовищу їх оптимального росту. В екстремальних умовах на вершині відвалу, де переважають висока температура і підвищена сонячна радіація, *Bryum caespiticium* і *Barbula unguiculata* майже не утворюють спорогонів (лише 3–10% від загальної кількості пагонів), життєздатність і поновлення мохових дернин компенсуються утворенням великої кількості виводкових ризоїдних бульбочок, у вигляді недорозвинутих з пригніченим розвитком бруньок зі значним запасом поживних речовин, які завдяки специфічній будові клітинної стінки є стійкими до температурних змін і посухи. Поєднання різноманітних стратегій безстатевого і статевого розмноження у дводомних мохів-поселенців з утворенням численних діаспор сприяє розселенню бріофітів на гетерогенній техногенно трансформованій території та успішному поширенню на значні віддалі. Розсіювання на далекі відстані переважно відбувається спорами, тоді як безстатеві пропагули є важливими для локального поширення і підтримки популяції [7, 22], зокрема за відсутності статевого розмноження.

Результати досліджень, проведених у природі, свідчать про значну участь ризоїдів і ризоїдних бульбочок як непримітної, але важливої фази життєвого циклу дводомних видів мохів-поселенців у реалізації життєвої стратегії толерантності до екстремальних умов девастованих територій завдяки швидкому просторовому розповсюдженню і тривалому збереженню банку життєздатних діаспор. У такий спосіб дводомні види доповнюють або повністю замінюють статево розмноження.

В умовах лабораторної культури ріст і розвиток протонеми досліджуваних видів мохів відрізнявся як на стандартному поживному середовищі, так і в дослідних варіантах. Під впливом ПЕГ, АБК, сахарози та за сумісної дії останніх сповільнювались ріст і диференціація протонеми, зате посилювались потовщення стінок клітин і їхня пігментація. Більшість хлоронемних клітин, переважно на дистальних кінцях, дедиференціювалася у сферичні, сильно пігментовані виводкові геми. У видів *Bryum* геми утворювались на повітряних хлоронемних столонах, тоді як у *Barbula unguiculata* – на хлоронемі, що росла на або в агарі та лише зрідка на повітряних столонах, зокрема, в дослідах із додаванням АБК (рис. 6).

Найбільша кількість багатоклітинних, досить часто розгалужених, гем утворювалася на хлоронемі *Barbula unguiculata*, найменша – на *Bryum caespiticium* (рис. 6, д). На момент відокремлення виводкових пропагул від протонеми, в місці їх з'єднання утворювалася роздільна клітина (“тмема”), у якої зовнішня оболонка була дуже ніжною, тому легко розривалася (рис. 6). В умовах лабораторної культури у ланцюговоподібних гемах, що виникали з клітин хлоронемного типу, окремі сегменти були циліндричними або майже округлими, у поодиноких випадках вони мали булавоподібну або веретеноподібну форму внаслідок здуття посередині або над серединою, що пов'язано з відкладенням запасних речовин (рис. 6, е). Остання форма вказувала на початок перетворення клітинної нитки у виводкову бульбочку.

Окрім стресових чинників хімічної природи, формування гем і ризоїдних бульбочок у культурах контролю *Barbula unguiculata* і *Bryum dichotomum* пов'язане зі старінням та підсиханням бактоагару, можливо, в результаті зменшення поживних речовин і/або нагромадження АБК (рис. 6, а, б). У досліджуваних видів мохів, як правило, екзогенна 10 мкМ АБК істотно підвищувала кількість ланцюговоподібних гем та ініціювала формування багатоклітинних сферичної форми бульбочок (а саме у *B. unguiculata* і *B. dichotomum*). У *B. unguiculata*, окрім того, бульбочки утворювались й під впливом ПЕГ та сумісної дії АБК + сахароза (рис. 6, е). Унаслідок тангентальних поділів апікальних клітин бульбочки формувалися на верхівці ризоїдних гілок або на коротких бічних галузjenнях. Відомо, що екзогенна АБК підвищує толерантність мохоподібних до посухи та заморожування [18, 21, 24, 26], проте лише у кількох роботах повідомлялося про наявність ендогенної АБК [15, 26] і підвищення її рівня в умовах посухи [16, 26]. Установлено, що під впливом фітогормону АБК чоловічі протонемні дернини *B. dichotomum*, порівняно з жіночими, утворювали значно більшу кількість бруньок гаметофорів на протонемі, що занурювалася глибоко в агар, та виводкових гем на повітряних хлоронемних столонах. Також сахароза переважно на протонемі чоловічих рослин *B. argenteum* стимулювала утворення численних гем на кінцях повітряної, рясно розгалуженої хлоронеми (рис. 6, в, з).

На відміну від зрілих спор, висівання яких у мохів переважно обмежене в часі, а саме у видів *Bryum*, лише кількома тижнями, утворення та розповсюдження виводкових пропагул триває набагато довше, майже цілий рік. Проте у репродуктивній стратегії мохів, очевидно, геми і ризоїдні бульбочки відіграють різну роль, що пов'язано з тим, що бульбочки, як і спори, заповнені жирами, тому поширюються на далекі віддалі переважно водою, тоді як крохмаль і висока гідрофільність пектинових складників під кутикулярним шаром гем [23] не лише полегшують поглинання та утримання води, а й роблять їх липкими, завдяки чому розповсюджуються здебільшого тваринами. Геми – це нитчасті відгалуження протонеми, з чітко диференційованим механізмом відокремлення, які у природних умовах менше живучі й толерантні, ніж бульбочки, однак підвищують потенціал виду на початку його виживання та локального поширення. Ризоїдні бульбочки, на нашу думку, функціонують здебільшого



як органи нагромадження поживних речовин, є стійкішими до зміни температур і вологості, містять більше запасних речовин, ніж одноклітинні спори, що і сприяє утворенню більшої кількості нових рослин і активнішій колонізації порушених субстратів.

Отже, на підставі проведених досліджень можна стверджувати, що на відвалі домінують дводомні види мохів, які завдяки статевому диморфізму, значній пластичності

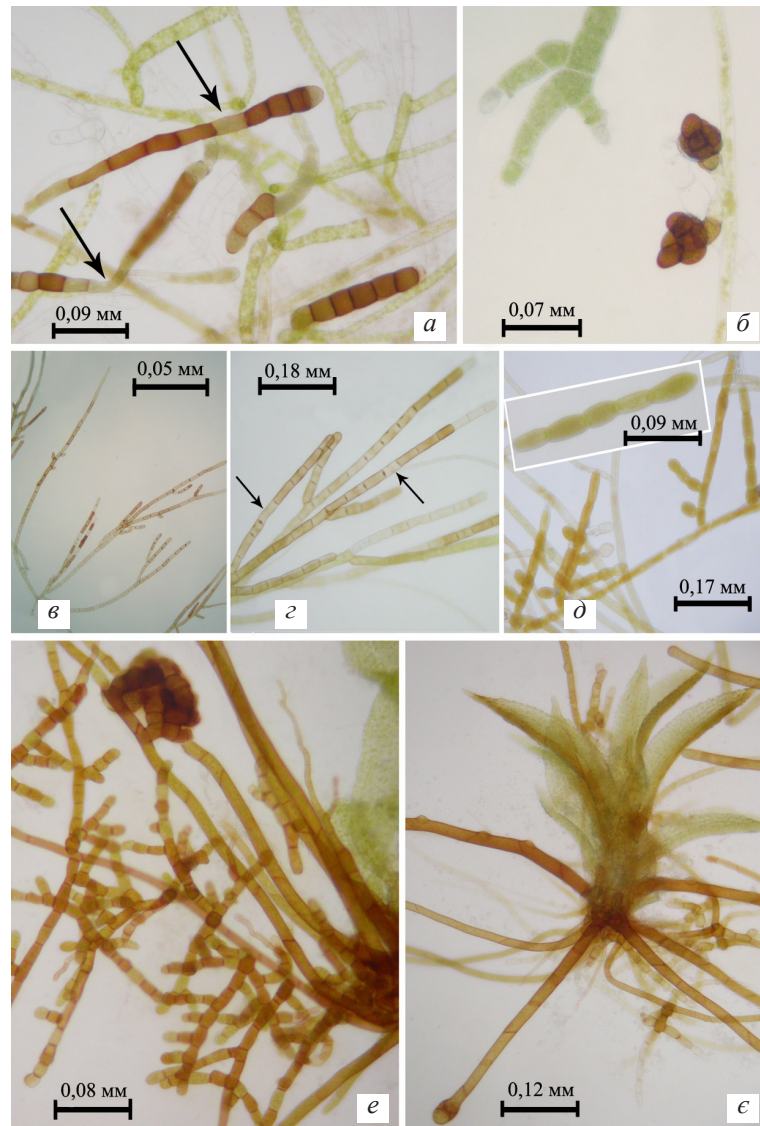


Рис. 6. Протонемні виводкові пропагули, утворені *in vitro*: ланцюговоподібні гемаи *Bryum dichotomum* з подовгастими тмемами (позначено стрілками) на підсихаючому бактоагарі (а); розгалужена гема і ризоїдні бульбочки *B. dichotomum* (б), утворені під впливом 4% ПЕГ; пігментовані гемаи на повітряній розгалуженій хлоронемі *B. argenteum* (в, г) з численними розділовими клітинами (середовище зі сахарозою); повітряні гемаи з округлими клітинами *B. caespiticium* (д) на бактоагарі з 10 мкМ АБК; сильно розгалужені пігментовані гемаи (е) та ініціація дистальної ризоїдної бульбочки (е) у *Barbula unguiculata* під впливом АБК + сахароза.

розвитку, реалізації, окрім статевого, різноманітних можливостей вегетативного розмноження є життєздатнішими й успішно розселяються на девастованих територіях.

Робота виконана за фінансової підтримки Українського науково-технологічного центру (проект № 5032).

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Лобачевська О. Репродуктивна фенологія моху *Orthotrichum obtusifolium* Brid. // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2004. Вип. 36. С. 215–219.
2. Хоркавців Я. Д., Лобачевська О. В. Особливості генеративного розмноження домінуючого виду моху *Barbula unguiculata* Hedw. на відвалах сірчаного видобутку // Наук. зап. Тернопіль. нац. пед. ун-ту. Сер. біол. 2011. № 2 (47). С. 150–154.
3. Awasthi V., Nath V., Asthana A. K. Effect of Some Physical Factors on Reproductive Behaviour of Selected Bryophytes // International J. Plant Reproductive Biol. 2010. Vol. 2(2). P. 141–145.
4. Bisang I., Ehrlén J. Reproductive effort and cost of sexual reproduction in female *Dicranum polysetum* // Bryologist. 2002. Vol. 105. P. 384–397.
5. Buck W. R., Goffinet B. J. Morphology and classification of mosses // Bryophyte Biology / Eds. by A.J. Shaw, B.J. Goffinet. - Cambridge University Press, 2000. P. 71–123.
6. Chen Y., Guo S., Cao T. Asexual reproduction of moss and its applications // Chinese J. Ecol. 2008. Vol. 27(6). P. 993–998.
7. Cleavitt N. L. Stress tolerance of rare and common moss species in relation to their occupied environments and asexual dispersal potential // J. Ecology. 2002. Vol. 90. P. 785–795.
8. Duckett J. G., Ligrone R. A survey of diaspore liberation mechanisms and germination patterns in mosses // J. Bryol. 1992. Vol. 17. P. 335–354.
9. Duckett J. G., Pressel S. Studies of protonemal morphogenesis in mosses. IX. *Diselium nudum*: exquisite pioneer of unstable clay banks // J. Bryol. 2003. Vol. 25. P. 241–245.
10. During H. J., ter Horst B. The diaspore bank of Bryophytes and ferns in chalk grassland // Lindbergia. 1983. N 9. P. 57–64.
11. During H. J. Ecological classifications of bryophytes and lichens // Bryophytes and Lichens in a Changing Environment / Eds. by J.W. Bates, A.M. Farmer - Clarendon Press, Oxford, 1992. P. 1–31.
12. During H. J. Diaspore banks // Bryologist. 2001. Vol. 104. P. 92–97.
13. Glime G. M. Bryophyte ecology // 2006. <http://www.bryoecol.mtu.edu>.
14. Greene S. W. The maturation cycle, or the stages of development of gametangia and capsules in mosses // Trans. Brit. Bryol. Soc. 1960. Vol. 3. P. 736–745.
15. Hartung W., Weiler E. W., Volk O. H. Immunochemical evidence that abscisic acid is produced by several species of Anthocerotae and Marchantiales // Bryologist. 1987. Vol. 90. P. 393–400.
16. Hellwege E. M., Dietz K. J., Volk O. H. et al. Abscisic acid and the induction of desiccation tolerance in the extremely xerophilic liverwort *Exormotheca holstii* // Planta. 1994. Vol. 194. P. 525–531.
17. Longton R. E. Reproductive biology and life-history strategies // Bryology for the Twenty-first Century / Eds. J.W. Bates, N.W. Ashton, J.G. Duckett. - Maney Publishing and the British Bryological Society, UK, 1998. P. 369.
18. Mallon R., Reinoso J., Rodriguez-Oubica J. et al. In vitro development of vegetative propagules in *Splachnum ampullaceum*: brood cells and chloronematal bulbils // Bryologist. 2006. Vol. 109. P. 215–223.

19. *Mishler B. D.* Reproductive ecology of bryophytes // *Plant Reproductive Ecology, Patterns and Strategies* / Eds. by J. Lovett Doust, L. Lovett Doust. - Oxford Univer. Press, New York, 1988. P. 285–306.
20. *Newton A. E., Mishler B. D.* The evolutionary significance of asexual reproduction in mosses // *J. Hattori Bot. Lab.* 1994. Vol. 76. P. 127–145.
21. *Pence V. C., Dunford S. S., Redella S.* Differential effects of abscisic acid on desiccation tolerance and carbohydrates in three species of liverworts // *J. Plant Physiol.* 2005. Vol. 162. P. 1331–1337.
22. *Pohjamo M., Laaka-Lindberg S., Ovaskainen O.* et al. Dispersal potential of spores and asexual propagules in the epixylic hepatic *Anastrophyllum hellerianum* // *Evol. Ecol.* 2006. Vol. 20. P. 415–430.
23. *Pressel S., Matcham H. W., Duckett J. G.* Studies of protonemal morphogenesis in mosses. XI. *Bryum* and allied genera: a plethora of propagules // *J. Bryol.* 2007. Vol. 29. P. 241–258.
24. *Rowntree J. K., Duckett J. G., Mortimer C. L.* et al. Formation of Specialized Propagules Resistant to Desiccation and Cryopreservation in the Threatened Moss *Ditrichum plumbicola* (Ditrichales, Bryopsida) // *Annals of Botany.* 2007. Vol. 100. P. 483–496.
25. *Söderström L., During H.J.* Bryophyte rarity viewed from the perspectives of life history strategy and metapopulation dynamics // *J. Bryol.* 2005. Vol. 27. P. 259–266.
26. *Werner O., Espin R.M.R., Bopp M.* et al. Abscisic acid induced drought tolerance in *Funaria hygrometrica* Hedw. // *Planta.* 1991. Vol. 186. P. 99–103.

Стаття: надійшла до редакції 30.08.12

прийнята до друку 21.09.12

## PECULIARITIES OF BRYOPHYTES VEGETATIVE REPRODUCTION ON THE DUMPS OF SULPHUR PRODUCTION

O. Lobachevska, I. Rabyk

*Institute of Ecology of the Carpathians of NAS of Ukraine  
11, Stefanyk St., Lviv 79000, Ukraine  
e-mail: morphogenesis@mail.lviv.ua*

The main types of vegetative reproduction of bryophytes on the rock dump of Jaziv sulphur deposit of Novoavoriv mining-chemical enterprise “Sirka” have been determined. The features of reproductive asexual propagules morphology of the dominant species and their development were established *in vivo*. The influence of 2% and 4% polyethylene glycol (PEG), 5  $\mu$ M and 10  $\mu$ M abscisic acid (ABA), 5% sucrose and 10  $\mu$ M ABA + 5% sucrose on activation of dedifferentiation chloronemata of *Barbula unguiculata*, *Bryum dichotomum*, *B. argenteum* and *B. caespiticium* in the gemmae and the formation of tubers was analyzed *in vitro*. Specialized sexual propagules and gemmae participation as an important phase of the life cycle of dioecious species of moss-colonists in realization of the life tolerance strategy to extreme conditions of devastated territories has been shown.

*Keywords:* bryophytes, devastated territories, reproduction, rhizoid tubers, gemmae.

## ОСОБЕННОСТИ ВЕГЕТАТИВНОГО РАЗМНОЖЕНИЯ МОХООБРАЗНЫХ НА ОТВАЛАХ ДОБЫЧИ СЕРЫ

О. Лобачевская, И. Рабик

*Институт экологии Карпат НАН Украины  
ул. Стефаника, 11, Львов 79000, Украина  
e-mail: morphogenesis@mail.lviv.ua*

Определены основные типы вегетативного размножения мохообразных на отвале № 1 Язовского серного месторождения Новояворивского горно-химического предприятия „Сера“. Установлены особенности морфологии бесполой репродуктивной пропагулы доминантных видов и их развития *in vivo*. Проанализировано влияние 2% и 4% полиэтиленгликоля (ПЭГ), 5 мкМ и 10 мкМ абсцизовой кислоты (АБК), 5% сахарозы и 10 мкМ АБК + 5% сахарозы на активацию дедифференциации хлоронемы *Barbula unguiculata*, *Bryum dichotomum*, *B. argenteum* и *B. caespiticium* в геммы и формирование клубеньков *in vitro*. Выяснено участие специализированных бесполой пропагулы и геммы как важной фазы жизненного цикла двудомных видов мхов-поселенцев в реализации жизненной стратегии толерантности к экстремальным условиям девастированных территорий.

*Ключевые слова:* мохообразные, девастированные территории, размножение, ризоидные клубеньки, геммы.

**HOMOLOGUES OF PLEOTROPIC REGULATORY GENE *adpA*  
IN *ACTINOPLANES*: ANALYSIS *IN SILICO***

**B. Ostash<sup>1</sup>, N. Ziburanyi<sup>1,2</sup>, L. Horbal<sup>1</sup>, A. Luzhetskyy<sup>2</sup>, S. Shulga<sup>3</sup>, V. Fedorenko<sup>1</sup>**

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

<sup>2</sup>*Helmholtz Institute for Pharmaceutical Research, Saarland Campus  
Building C2.3, 66123 Saarbrücken, Germany*

<sup>3</sup>*Institute of Food Biotechnology and Genomics of NAS of Ukraine  
2a, Osypovskiyi St., Kyiv 04123, Ukraine*

*Actinoplanes teichomyceticus* produces glycopeptide antibiotic teicoplanin, a “last line defense” against multidrug resistant cocci. The gene cluster for biosynthesis of teicoplanin (*tcp*) has been cloned 8 years ago, although regulation of its production is poorly understood because of lack of genetic toolkit to manipulate this strain as well as knowledge of its genome organization. In streptomycetes, regulatory gene *adpA* encodes a master regulator of secondary and primary metabolism, as well morphogenesis, forming the largest gene “modulon” known to date for bacteria. Here we analyzed the possibility that AdpA-like protein might be involved in regulation of teicoplanin production. We used the described consensus AdpA operator sequences, inferred from analysis of streptomycete genomes, to screen the *tcp* cluster. Several putative AdpA operators were revealed within *tcp* cluster, implying that AdpA-like transcriptional factors may indeed operate in *Actinoplanes*. Using comparative genomic approaches, we revealed several putative *adpA* homologues in completely sequenced *Actinoplanes* genomes as well as in draft sequence of *A. teichomyceticus* genome. Taken together, our data strongly support the idea that *adpA*-mediated regulation influences the production of antibiotics not only in genus *Streptomyces*, but also in *Actinoplanes*.

**Keywords:** *Actinoplanes*, teicoplanin, AdpA, genome analysis.

*Actinoplanes teichomyceticus* is a representative of rare and slow-growing actinomycetes that possess motile spores and produce secondary metabolites not found in more common genera, such as *Streptomyces*, *Micromonospora* or *Saccharopolyspora* [17]. *A. teichomyceticus* is not exception: it is the only known producer of teicoplanin, a clinically valuable glycopeptide active against vancomycin- and methicillin-resistant cocci [1, 5, 6, 14]. *A. teichomyceticus* has also been shown in early works to accumulate second group of antibiotics referred to as teichomycin A<sub>1</sub> complex. It is believed to consist of moenomycin-like antibiotics [1, 3, 12]. Much effort has been put into physiological and genetic studies on teicoplanin biosynthesis [2, 4, 7, 13–16]. There is growing interest in exploration of *A. teichomyceticus*, and *Actinoplanes* in general, as a basis for the development of a new class of antibiotics operating through inhibition of peptidoglycan biosynthesis [11, 12]. In this regard, it is essential to explore all possible ways to stimulate secondary metabolism of actinoplanetes, which will lead to improvement of production of known antibiotics as well as to activation of silent secondary metabolome. Here we decided to explore a possibility that known pleiotropic regulators of secondary metabolism of *Streptomyces* have their counterparts in *Actinoplanes*. Particularly, we focused on gene *adpA* that codes for transcriptional

factor globally affecting the gene expression in several studied model cases [10]. In streptomycetes, AdpA-dependent genes form a largest known to date modulon that is responsible for a number of essential functions as well as production of antibiotics [18]. No information is available about existence of AdpA orthologues in genus *Actinoplanes*, although two completely sequenced genomes of representatives of this genus are available. Here we present *in silico* evidence that AdpA-mediated regulation may operate in *Actinoplanes*, and, in particular, it may be involved in teicoplanin production by *A. teichomyceticus*.

### Materials and methods

Genome of *A. teichomyceticus* NRRL-B16726 was sequenced using Illumina approach [9] at company Seq-IT (Germany). Details of sequencing of NRRL-B16726 genome will be reported elsewhere. Complete sequences of *A. sp.* SP50/110 and *A. missouriensis* genomes were retrieved from NCBI website ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genome](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome)). Aminoacid sequences of AdpA orthologous group were downloaded from [www.streptomyces.org.uk](http://www.streptomyces.org.uk) and NCBI. Programs blast-2seq and CLUSTALW for pairwise (multiple) sequence alignment were accessed at NCBI and [www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk), respectively [8]. Position-specific weight matrices (PSWM) for AdpA operator sequences were built with the help of programs FIMO and TFBS, and visualized with WebLogo. Orthology of proteins was based on results of reciprocal BLAST results. Phylogenetic analysis of the proteins was carried out on server [www.phylogeny.fr](http://www.phylogeny.fr). Tree topology was verified with the help of approximate likelihood ratio test (aLRT). In all cases aLRT values were well above minimal threshold of 0.5. PSIPRED was used to analyze protein secondary structure.

### Results and discussion

Known *Streptomyces* AdpA operator sequences were retrieved from public sources and used to build PSWM; it is presented as a WebLogo on Fig. 1. The PSWM was used to screen against published sequence of teicoplanin biosynthetic gene (*tcp*) cluster. Indeed, we revealed 3 AdpA-like operators upstream of gene *tcp28* (Fig. 1). The latter encodes putative pathway-specific transcriptional activator of structural genes for teicoplanin biosynthesis. This finding is in accord with currently accepted speculation that global (pleiotropic) regulators of secondary metabolism exert their action via modulation of expression of pathway-specific (cluster-situated) regulatory genes [10].

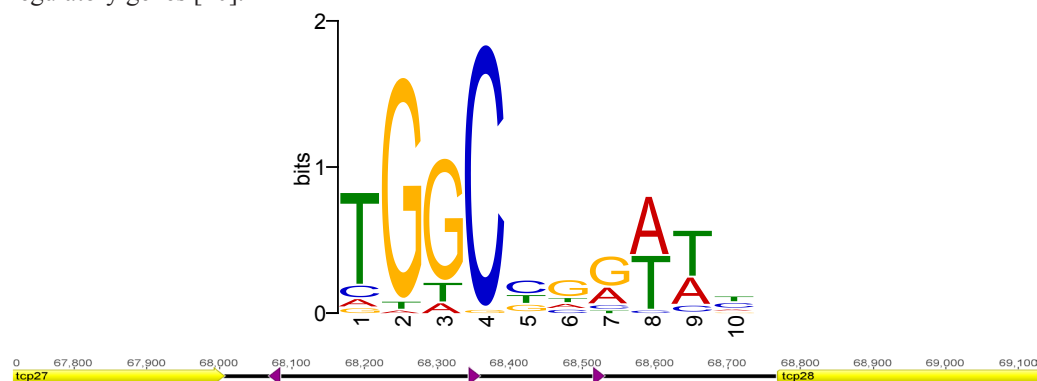


Fig. 1. Consensus AdpA operator sequence presented as WebLogo (top) and location of such sequences (shown as back triangles) within *tcp* cluster upstream of gene *tcp28* (bottom of the figure). Ruler above the genes – distance in base pairs.

Of the three putative AdpA operators within *tcp28* upstream region, one is in orientation opposite to that of *tcp28* transcription. However, since AdpA is known to function as a homodi-

mer, all three AdpA operators could be recognized by AdpA and thus influence *tcp28* expression.

Having discovered that *tcp* cluster contains sequences similar to that of AdpA operators, a question inevitably arises: does *A. teichomyceticus* genome contain orthologue of *Streptomyces* AdpA protein? There is no publicly available genome sequence of *A. teichomyceticus* and focused (PCR-based) approaches towards identification of *adpA* genes are not developed. We therefore set out to partially sequence *A. teichomyceticus* genome and to use it for identification of putative AdpA homologues. The genome of *A. teichomyceticus* was sequenced using reversible terminators approach (Illumina) to approximately 10-fold depth. At this stage, we miss almost 5% of the genome of teicoplanin producer, although the quality is enough to perform an initial screening for AdpA homologues. The genome of *A. teichomyceticus* carries several genes whose translation products resemble AdpA of *Streptomyces griseus* (Fig. 2). The similarity is within 37–49% range, although no synteny was observed. The discovered *A. teichomyceticus* proteins are truncated at the C-termini as compared to streptomycete ones. Analysis of secondary structure of aminoacid sequence of the proteins with the help of PSIPRED and ClustalW revealed typical DNA-binding domain of helix-turn-helix type. Type I glutamine amidotransferase domain was also well represented in these proteins. However, orthology of any of the studied 6 AdpA-like proteins of

<i>S. coelicolor</i>	MSHDSTAAPDAARKLAGRRRKEIVAVLLFSGGPIFESSIPLSVFGIDRQDAGV-PRYRLVLCAGGEDGP LRTTGGLELT	78
<i>S. ghanaensis</i>	MSHDSTAAPDAARKLAGRRRKEIVAVLLFSGGPIFESSIPLSVFGIDRQDAGV-PRYRLVLCAGGEDGP LRTTGGLELT	78
<i>S. griseus</i>	MSQDS-AAATEAARKLTGRRRREVVAVLLFSGGPIFESSIPLSVFGIDRQDAGV-PRYRLVLCAGGEDGP LRTTGGLELT	77
<i>A. teichomyceticus</i> 1	-----HRGHTVAILLPGA SPDVGIPQVAFAR-RHG-----LNYVVPQAAEIGPVPGRDGLGFH	55
<i>A. teichomyceticus</i> 2	-----VRKIRARHPHIVIAVLLDAVVPFDLGVPAQVFGAARHGVARGRPYEVLFCG--EGTVRTAAGFTVT	65
<i>A. teichomyceticus</i> 3	-----MYPRRVALVDEHSNPFVEGCACEIFGGRRRPQIGVELYELTVVSPTRSVPMRDLFRVS	60
<i>A. teichomyceticus</i> 4	-----MVTHAVAVLADRVVPLDLSPAGIFGEOPDP-----YRLTVCG-RDPEVATTTGSSTR	55
<i>A. teichomyceticus</i> 5	-----MPYIFKKLPTLRYGGMRMSVAVIAMPVAVFELGVLCFLFYDRTAEG-LPGYDFAVCGVGGPVPSSGFTIT	74
<i>A. teichomyceticus</i> 6	-----VSVVVFVLTTPQVHLLDLAGPAQVFTAPGYTLR-----VYAESATVPTWQGVVHL	52
<i>S. coelicolor</i>	APQGLEAISRAGTVVVPARWS-----ITSPPPPEALDARRAHEEGARIVGLCTGAFVLAAGL LDGRPATTHMYAPTL	153
<i>S. ghanaensis</i>	APQGLEAISRAGTVVVPARWS-----ITSPPPPEALDARRAHEEGARIVGLCTGAFVLAAGL LDGRPATTHMYAPTL	153
<i>S. griseus</i>	VEAGLETLDGADTVIVPGFON-----PTGPDPRVLDALRAAHEEGARIVGLCTGAFVLAAGL LDGRPATTHMYAPTL	130
<i>A. teichomyceticus</i> 1	VEAGLETLDGADTVIVPGFON-----PTGPDPRVLDALRAAHEEGARIVGLCTGAFVLAAGL LDGRPATTHMYAPTL	130
<i>A. teichomyceticus</i> 2	PDHPLSAAERADTVLPGIINAGGPVTDGTLPEPVRAALHSAADRGARIVSICGAFALAAAGL LDGRPATTHMYAPTL	142
<i>A. teichomyceticus</i> 3	APGRLSLDLRADMIIVPNRPD-----VDVPSRGAVALAARRAHARGARLVGLCTGAFVLAAGL LDGRRAAVHMLPADF	135
<i>A. teichomyceticus</i> 4	VPGTDDARRADTVIVPGYTG-----AGGDLDPQVLDITQVHARGRRVVSICSGAFALAAAGL LDGRRAAVHMLPADF	129
<i>A. teichomyceticus</i> 5	PSHDLAPAWTADLVAVVPNDVR-----QAPAEVLDVLRHAHRGAWMVSVCFTGFTLGEAGL LDGRRCTTHMYRDTSL	147
<i>A. teichomyceticus</i> 6	ADLENPALTPDDLVVVPGNSAG-----HGFFRTGTLRRIADHHAAGGTVASVCAGADALGRAGL LDGRRCTTHHDLQDLL	125
<i>S. coelicolor</i>	AKRYPVHVPREL FVDDGDVLT SAGTAAGIDL CLHIVRTHDGHNEAAGALARRLVVPPRRSGGQERYLDRSLPEEIGAD	232
<i>S. ghanaensis</i>	AKRYPVHVPREL FVDDGDVLT SAGTAAGIDL CLHIVRTHDGHNEAAGALARRLVVPPRRSGGQERYLDRSLPEEIGAD	232
<i>S. griseus</i>	AKRYPVHVPREL FVDDGDVLT SAGTAAGIDL CLHIVRTHDGHNEAAGALARRLVVPPRRSGGQERYLDRSLPEEIGAD	231
<i>A. teichomyceticus</i> 1	AREYKRVVDDSVL FVDDGQVLT AAGVAAAGIDL CLHIVRTHDGHVQASNETARVMAAPVRSGGQAOYVRSIPPELGD	209
<i>A. teichomyceticus</i> 2	GGLYPRVRMDFDL FMDGDVLT SAGVGAAGVDL CLHIVRSDYGAEVANAARRCVVPPWRDGGQAOYIERPVPAAAG-S	221
<i>A. teichomyceticus</i> 3	HRRFPVRL EPDVL FVDDGDLT SAGSAAALDL GLHIVRSDYGAEVANAARRCVVPPWRDGGQAOYIERPVPAAAG-S	214
<i>A. teichomyceticus</i> 4	ARRYPRI TVDPHVL VYDEGQLT SAGVSAAGIDL CLYLVRDHDGAAAANRVARINVAAPHRDGGQAOYIERPVPAAAG-S	208
<i>A. teichomyceticus</i> 5	AARFPRAKVDVPGVL VYVDGTVL SAGTAAADICGLHLIREEQGSAAVAQIARRIVVPPHRDGGQAOYIERPVPAAAG-S	226
<i>A. teichomyceticus</i> 6	ARSYPRSSVIRDVLYVSDRRVTSAGIASGIDLALHLVALRHGPAVAARVAREMIVVYARRNGDQOAGVMLRHRRAHLS	204
<i>S. coelicolor</i>	AKRYPVHVPREL FVDDGDVLT SAGTAAGIDL CLHIVRTHDGHNEAAGALARRLVVPPRRSGGQERYLDRSLPEEIGAD	232
<i>S. ghanaensis</i>	AKRYPVHVPREL FVDDGDVLT SAGTAAGIDL CLHIVRTHDGHNEAAGALARRLVVPPRRSGGQERYLDRSLPEEIGAD	232
<i>S. griseus</i>	AKRYPVHVPREL FVDDGDVLT SAGTAAGIDL CLHIVRTHDGHNEAAGALARRLVVPPRRSGGQERYLDRSLPEEIGAD	231
<i>A. teichomyceticus</i> 1	AREYKRVVDDSVL FVDDGQVLT AAGVAAAGIDL CLHIVRTHDGHVQASNETARVMAAPVRSGGQAOYVRSIPPELGD	209
<i>A. teichomyceticus</i> 2	GGLYPRVRMDFDL FMDGDVLT SAGVGAAGVDL CLHIVRSDYGAEVANAARRCVVPPWRDGGQAOYIERPVPAAAG-S	221
<i>A. teichomyceticus</i> 3	HRRFPVRL EPDVL FVDDGDLT SAGSAAALDL GLHIVRSDYGAEVANAARRCVVPPWRDGGQAOYIERPVPAAAG-S	214
<i>A. teichomyceticus</i> 4	ARRYPRI TVDPHVL VYDEGQLT SAGVSAAGIDL CLYLVRDHDGAAAANRVARINVAAPHRDGGQAOYIERPVPAAAG-S	208
<i>A. teichomyceticus</i> 5	AARFPRAKVDVPGVL VYVDGTVL SAGTAAADICGLHLIREEQGSAAVAQIARRIVVPPHRDGGQAOYIERPVPAAAG-S	226
<i>A. teichomyceticus</i> 6	ARSYPRSSVIRDVLYVSDRRVTSAGIASGIDLALHLVALRHGPAVAARVAREMIVVYARRNGDQOAGVMLRHRRAHLS	204
<i>S. coelicolor</i>	PLAEVVAHAL EHLHEQFDVETLAARAYMSRRTFDRFRSLTGSAPLOWLITORVLAORLLETSDYSVD EAVAGCGFRS	311
<i>S. ghanaensis</i>	PLAEVVAHAL EHLHEQFDVETLAARAYMSRRTFDRFRSLTGSAPLOWLITORVLAORLLETSDYSVD EAVAGCGFRS	311
<i>S. griseus</i>	PLAEVVAHAL EHLHEQFDVETLAARAYMSRRTFDRFRSLTGSAPLOWLITORVLAORLLETSDYSVD EAVAGCGFRS	310
<i>A. teichomyceticus</i> 1	VFAL TREHALAHLEOPLTVAVLARHAGVSARTFGRFRVEDTGYTPMOWLARVDLARELLESTDLAVDQIAARVGVGT	287
<i>A. teichomyceticus</i> 2	GTEPTRAKVLDRLSEPVTLLEEMARHARMSVTRFTSRFRDETGSSSPROWLRRORVEHARLLESTDLAVDQIAARVGVGT	299
<i>A. teichomyceticus</i> 3	PLAPVLOWAQLERLHLRLVDDLARHGRMSATLHRRFRNEVGSPTLAWLTAORVALACRLIEQGAAGVD AVAROSGLGT	292
<i>A. teichomyceticus</i> 4	ALSGVRWALAHLD RPPVPEL ARHAAAPRTFARFRVAETGHTPLQWLHARIDRARELLESSTLSIGIQIADSTGLGS	286
<i>A. teichomyceticus</i> 5	TLOPLLALHLETLDREHVTETMADAVHMAARTFARFRVAETGATPHDWTGORVLLARRLLEETDLSVEAIGRAGFGS	305
<i>A. teichomyceticus</i> 6	VHVRVQDRIDASFGLRLRAGLAAGAGVSERTLTRLFTAAATGRTPLOVQQLLRVERAEVLIHGHSVEAARAVGPF	283
<i>S. coelicolor</i>	PVALRGHFRROLGSSPAAYRAAYRARRRPOGDRDPD-TAAG-----ATRP LPPSDP-PASLAPENAVPFTQRT	388
<i>S. ghanaensis</i>	PVALRGHFRROLGSSPAAYRAAYRARRRPOGDRDPD-TAAG-----ATRP LPPSDP-PASLAPENAVPFTQRT	388
<i>S. griseus</i>	PVALRGHFRROLGSSPAAYRAAYRARRRPOGDRDPD-TAAG-----ATRP LPPSDP-PASLAPENAVPFTQRT	386
<i>A. teichomyceticus</i> 1	GANLRMHFORLRTISPEYRRTFAAAPGGP-----KLAEGAASARRS	353
<i>A. teichomyceticus</i> 2	AAALROHLHATIGVAPSAYRRTFRHAG-----	361
<i>A. teichomyceticus</i> 3	AANLRALLRKHVGLSPSEYRRTFAADGAR-----	356
<i>A. teichomyceticus</i> 4	AINLRVHFRLVGTTPSAYRRTFRFTADVS-----	349
<i>A. teichomyceticus</i> 5	AOTLRHFRTORLSTTPQAYRSTFKAKV-----	367
<i>A. teichomyceticus</i> 6	ARMLR-RLRSRAATLPA-----	333
<i>S. coelicolor</i>	ATPMPAG-----AASVPGORSAP	398
<i>S. ghanaensis</i>	AAASSLGPSTASAPSDSGREAYVPTPRAGVPGORSAP	428
<i>S. griseus</i>	GELS LGGP-----DAYVPGRALPQORSAP	405
<i>A. teichomyceticus</i> 1	GAAR-----	337

Fig. 2. Multiple sequence alignment of known AdpAs and *A. teichomyceticus* homologues (1-6). Rectangle marks DNA binding domain.

*A. teichomyceticus* to known AdpA proteins from either *S. coelicolor* or *S. griseus* could not be readily established in a series of reciprocal BLAST searches. No synteny was observed between *adpA* loci of streptomycetes and that of *A. teichomyceticus*. This is probably because *Streptomyces* and *Actinoplanes* are only remotely related actinomycete genera.

We explored alternative ways to establish relatedness of *A. teichomyceticus* sequences to known AdpA proteins. It is possible that AdpA sequences of *S. coelicolor* and *S. griseus* are not optimal ones to screen *Actinoplanes* genome for AdpA orthologues. Phylogenetic tree of *Streptomyces* AdpA proteins is very coherent, yet it did form several distinct clades and branches clearly divergent from SGR\_4742 and SCO\_2792 (AdpA proteins from *S. griseus* and *S. coelicolor*, respectively; data not shown). AdpA protein from *S. clavuligerus* (SCLAV\_1957) is located in such divergent clade, and function of this protein has been experimentally verified. Reciprocal BLASTP searches confirmed that completely sequenced genomes of *A. missouriensis* and *A. sp.* SE50/110 contained proteins AMIS\_10050 and ACPL\_1231, respectively, orthologous to SCLAV\_1957. The orthology of both *Actinoplanes* proteins to the other members of *Streptomyces* AdpA group cannot be inferred from BLAST searches, suggesting unequal value of AdpA from different species origin for interrogation of remotely related genomes. Nevertheless, an ability to find *Actinoplanes* orthologs to certain AdpA sequences implies that non-*Streptomyces* AdpA proteins might indeed exist. Additional searches turned up more AdpA orthologues from two other genomes of the family *Micromonosporaceae*, a home to genus *Actinoplanes*: SACE\_4523 (*Saccharopolyspora erythraea*) and Micau\_1999 (*Micromonospora aurantiaca*). A resulting tree of the aforementioned proteins is shown on Fig. 3.

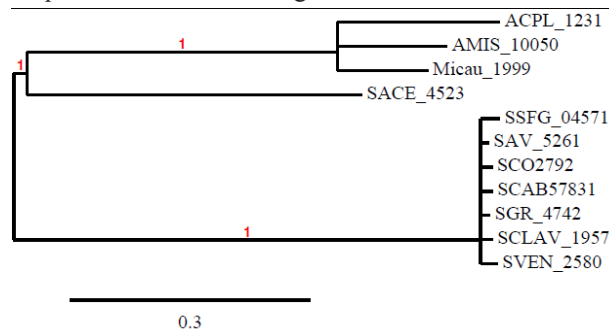


Fig. 3. Maximum-likelihood tree of *Streptomyces* AdpA proteins and putative AdpA from selected *Micromonosporaceae* genomes. Branches with aLRT values (numbers at nodes) less than 0.8 were collapsed. Protein abbreviations – see the text. The scale bar under the tree indicates number of aa substitution per aa position.

Proteins Micau\_1999 and AMIS10050 were subjected to pairwise blast2seq alignment with six AdpA-like sequences found in *A. teichomyceticus* genome (At-1 to At-6, see also Fig. 2). The results of these analyses are summarized in Table 1. Of the six proteins compared, At-2 and At-5 displayed the highest similarity to both AMIS\_10050 and ACPL\_1231. Respective expectation (*e*) values were close for both At-proteins, making it challenging to determine the best *A. teichomyceticus* hit to AMIS\_10050 and ACPL\_1231. Reciprocal BLAST with the respective genomes confirmed that only At-2 protein is orthologous to AMIS\_10050, although the former failed to show orthology to ACPL\_1231. Thus, while, *Streptomyces* AdpA sequences behave as typical cluster of orthologous proteins, the AMIS\_10050, ACPL\_1231 and At-proteins do not show the same robust behavior, irrespective of the type and parameters of BLAST search being employed.



Table 1

Results of BLASTP comparison of AMIS10050 and ACPL\_1231  
to *A. teichomyceticus* homologues

<i>A.t.</i> protein		comparison to AMIS 10050			comparison to ACPL 1231		
Name <sup>1</sup>	Size, aa	ID/SI <sup>2</sup> , %	e-value <sup>3</sup>	Gaps	SI/ID, %	e-value	Gaps
At-1	327	43/59	3e <sup>-77</sup>	10/317	44/60	2e <sup>-81</sup>	10/316
At-2	333	45/59	3e <sup>-85</sup>	4/313	44/59	7e <sup>-83</sup>	12/316
At-3	322	44/58	3e <sup>-80</sup>	8/319	43/58	5e <sup>-77</sup>	12/323
At-4	317	46/62	6e <sup>-72</sup>	6/314	47/62	8e <sup>-73</sup>	6/318
At-5	338	47/62	7e <sup>-85</sup>	5/314	46/62	2e <sup>-85</sup>	5/318
At-6	298	35/48	2e <sup>-35</sup>	2/262	36/48	5e <sup>-35</sup>	2/262

**Comments.** <sup>1</sup>As mentioned in Fig. 2

<sup>2</sup>Percentage of identity and similarity

<sup>3</sup>The lowest e-values, showing the most significant similarity, are highlighted in grey

Our work is the first attempt to identify in *Actinoplanes* a functional counterpart of *Streptomyces* pleiotropic regulator AdpA. Here we provide initial bioinformatic evidence that *tcp* cluster of *A. teichomyceticus* contains putative operator sequences for Adp family proteins. We partially sequenced *A. teichomyceticus* genome and identified a set of genes encoding AdpA homologues. Comparative genomic analyses of the other completely sequenced *Actinoplanes* genomes revealed proteins showing orthology to certain *Streptomyces* AdpA proteins. These *A. missouriensis* and *A. sp.* SE50/110 orthologs of AdpA allowed us to narrow down the list of 6 *A. teichomyceticus* AdpA-like protein to two candidates for the role of true AdpA protein. It should be noted that, unlike in *Streptomyces*, the *Actinoplanes* AdpA-like sequences under study diverged from *Streptomyces* AdpA significantly enough to prevent any reliable prediction of AdpA orthologs for the entire genus *Actinoplanes* from the results of BLAST or synteny only. Despite these challenges, our data suggest that AdpA-like regulation may operate in *Actinoplanes*, and we currently are pursuing experimental verification of the identified AdpA homologues from *A. teichomyceticus*.

**Acknowledgements.** This work has been supported by grant Bg-98F of the Ministry of Education, Science, Youth and Sport of Ukraine (to VF), grants from NAS of Ukraine (to VF and SS) and by DAAD scholarship A/12/04489 (to B. O).

#### REFERENCES

1. Bardone M. R., Paternoster M., Coronelli C. Teichomycins, new antibiotics from *Actinoplanes teichomyceticus*-Nov-Sp.2. Extraction and chemical characterization // J. Antibiot. 1978. Vol. 31. P. 170–177.
2. Ha H. S., Hwang Y. I., Choi S. U. Application of conjugation using phiC31 *att/int* system for *Actinoplanes teichomyceticus*, a producer of teicoplanin // Biotechnol. Lett. 2008. Vol. 30. P. 1233–1238.
3. Huber G. Moenomycin and related phosphorus containing antibiotics. In: Hahn, F. E. (ed). *Antibiotics*, Springer-Verlag, New York, USA, 1979.
4. Jung H.-M., Kim S.-Y., Prabhu P. et al. Optimizatoin of culture conditions and scale-up to plant scales for teicoplanin production by *Actinoplanes teichomyceticus* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2008. Vol. 80. P. 21–27.
5. Jung H.-M., Jeva M., Kim S.-Y. et al. Biosynthesis, biotechnological production, and application of teicoplanin: current state and perspectives // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2010. Vol. 82. P. 57–69.
6. Kahne D., Leimkuhler C., Lu W., Walsh C. Glycopeptide and lipoglycopeptide antibiotics // Chem. Rev. 2005. Vol. 105. P. 425–448.

7. Li T.L.H.F., Haydock S. F., Mironenko T. et al. Biosynthetic gene cluster of the glycopeptide antibiotic teicoplanin: characterization of two glycosyltransferase and the key acyltransferase // Chem. Biol. 2004. Vol. 11. P. 107–109.
8. Makitrinsky R., Rebets Yu., Ostash B. et al. Genetic factors that influence moenomycin production in streptomycetes // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2010. Vol. 37. P. 559–566.
9. Metzker M. L. Sequencing technologies – the next generation // Nat. Rev. Genet. 2010. Vol. 11. P. 31–46.
10. Nett M., Ikeda H., Moore B.S. Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes // Nat. Prod. Rep. 2009. Vol. 26. P. 1362–1384.
11. Ostash B., Doud E., Fedorenko V. The molecular biology of the moenomycins: towards novel antibiotics based on inhibition of bacterial peptidoglycan glycosyltransferases // Biol. Chem. 2010. Vol. 391. P. 499–504.
12. Ostash B., Walker S. Moenomycin family antibiotics: chemical synthesis, biosynthesis, and biological activity // Nat. Prod. Rep. 2010. Vol. 27. P. 1594–1617.
13. Parenti F., Beretta G., Berti M., Arioli V. Teichomycins, new antibiotics from *Actinoplanes teichomyceticus* nov. sp. Description of the producer strain, fermentation studies and biological properties // J. Antibiot. 1978. Vol. 31. P. 276–283.
14. Somma S., Gastaldo L., Corti A. Teicoplanin, a new antibiotic from *Actinoplanes teichomyceticus* nov. sp. // Antimicrob. Agents Chemother. 1984. Vol. 26. P. 917–923.
15. Song J. M., Park J. T., Lee H. S. et al. Production of teicoplanin from *Actinoplanes teichomyceticus* ID9303 by adding proline // Biosci. Biotechnol. Biochem. 2008. Vol. 72. P. 1635–1637.
16. Sosio M., Kloosterman H., Bianchi A. et al. Organization of the teicoplanin gene cluster in *Actinoplanes teichomyceticus* // Microbiology. 2004. Vol. 150. P. 95–102.
17. Vobis G. The genus *Actinoplanes* and related genera // Prokaryotes. 2006. Vol. 3. P. 623–653.
18. Wezel van G. P., McDowall K. J. The regulation of the secondary metabolism of Streptomycetes: new links and experimental advances // Nat. Prod. Rep. 2011. Vol. 28. P. 1311–1333.

Стаття: надійшла до редакції 14.09.12

прийнята до друку 16.11.12

## ГОМОЛОГИ ПЛЕЙОТРОПНОГО РЕГУЛЯТОРНОГО ГЕНА *adpA* В *ACTINOPLANES*: АНАЛІЗ *IN SILICO*

Б. Осташ<sup>1</sup>, Н. Забуранний<sup>1,2</sup>, Л. Горбаль<sup>1</sup>, А. Лужецький<sup>2</sup>, С. Шульга<sup>3</sup>, В. Федоренко<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, Саарбрюкен 66123, Німеччина

<sup>3</sup>Інститут харчової біотехнології та геноміки НАНУ  
вул. Осиповського, 2а, Київ 04123, Україна

*Actinoplanes teichomyceticus* продукує глікопептидний антибіотик тейкопланін, що є антибіотиком “останньої лінії оборони” проти мультирезистентних коків. Кластер генів біосинтезу тейкопланіну (*tcp*) клоновано 8 років тому, хоча регуляція продукції цього антибіотика погано зрозуміла внаслідок браку розроблених методів

генетичних маніпуляцій цим видом, а також відсутності даних про будову генома *A. teichomyceticus*. У стрептоміцетів регуляторний ген *adpA* кодує один із ключових регуляторів вторинного та первинного метаболізму, а також морфогенезу, формуючи найбільший на сьогодні генний “модулон”, що описано у бактерій. Ми проаналізували гіпотезу про те, що **AdpA-подібний білок може бути задіяно у регуляції продукції тейкопланіну**. Використовуючи описану консенсусну операторну послідовність AdpA для стрептоміцетів, ми здійснили пошук відповідних операторів у *tcp*-кластері. Виявлено кілька імовірних операторів AdpA, що вказує на те, що AdpA-залежна регуляція може функціонувати в *Actinoplanes*. З використанням низки методів порівняльної геноміки виявлено кілька гомологів *adpA* у повністю просеквенованих геномах *Actinoplanes*, а також у чорновій послідовності генома *A. teichomyceticus*. У сумі наші дані узгоджуються з припущенням, що *adpA*-залежна регуляція впливає на продукцію антибіотиків не тільки в роді *Streptomyces*, але й у роді *Actinoplanes*.

*Ключові слова:* *Actinoplanes*, тейкопланін, AdpA, геномний аналіз.

### ГОМОЛОГИ ПЛЕЙОТРОПНОГО РЕГУЛЯТОРНОГО ГЕНА *adpA* В *ACTINOPLANES*: АНАЛІЗ *IN SILICO*

Б. Осташ<sup>1</sup>, Н. Забуранний<sup>1,2</sup>, Л. Горбаль<sup>1</sup>, А. Лужецкий<sup>2</sup>, С. Шульга<sup>3</sup>, В. Федоренко<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Гельмгольц-інститут фармацевтичних досліджень Саарланда, Саарланд-кампус  
д. С2.3, Саарбрюкен 66123, Германия

<sup>3</sup>Інститут пищевих биотехнологий и геномики НАНУ  
ул. Осыповского, 2а, Киев 04123, Украина

*Actinoplanes teichomyceticus* продуцирует гликопептидный антибиотик тейкопланин, который является антибиотиком “последней линии обороны” против мультирезистентных кокков. Кластер генов биосинтеза тейкопланина (*tcp*) клонирован 8 лет назад, однако регуляция продукции тейкопланина слабо изучена из-за почти полного отсутствия методов генетических манипуляций этим видом, а также отсутствия данных о строении генома *A. teichomyceticus*. У стрептомицетов регуляторный ген *adpA* кодирует один из ключевых регуляторов вторичного и первичного метаболизма, а также морфогенеза, формируя самый большой среди известных сегодня бактериальных генных “модулонов”. Мы проанализировали гипотезу о том, что **AdpA-подобный белок может участвовать в регуляции продукции тейкопланина**. Используя описанную консенсусную операторную последовательность AdpA в стрептомицетах, мы выполнили поиск соответствующих операторов в пределах *tcp*-кластера. Вывявлены несколько вероятных операторов AdpA, что указывает на вероятность AdpA-зависимой регуляции в *Actinoplanes*. С использованием ряда методов сравнительной геномики выявлены несколько гомологов *adpA* в полностью просеквенированных геномах *Actinoplanes*, а также в черновой последовательности генома *A. teichomyceticus*. В сумме наши данные согласуются с предположением, что *adpA*-зависимая регуляция влияет на продукцию антибиотиков не только в роде *Streptomyces*, но и в роде *Actinoplanes*.

*Ключевые слова:* *Actinoplanes*, тейкопланин, AdpA, геномный анализ.

ЕКОЛОГІЯ

УДК 581.5(582.623;631.961):(629.331:504.73.05)

**МОРФОЛОГІЧНА РЕАКЦІЯ ЛИСТКІВ ТОПОЛІ В РІЗНИХ  
УМОВАХ УРБОТЕХНОГЕННОГО НАВАНТАЖЕННЯ**

**Д. Ганжа**

*ДСП “ЦППРВ”*

*вул. Кірова, 52, Чорнобиль 07270, Україна*

*e-mail: dmган@rambler.ru*

Досліджено морфологічну реакцію листків тополі пірамідальної на якість довкілля в умовах урбоекосистеми. Порівняно значення морфометричних показників із деякими параметрами довкілля, що характеризують техногенне навантаження. Запропоновано нові способи морфометричної оцінки реакції листків рослин на стан довкілля. Показано, що різні морфометричні коефіцієнти листків рослин неоднаково проявляються у різних урбоекологічних умовах.

*Ключові слова:* автотранспорт, забруднення довкілля, забудова, морфологія листка, урбоекосистема.

Більшість території України перебуває у стані техногенного навантаження. Вплив хімічних і фізичних забруднень на живі організми значною мірою залежить від інших факторів довкілля. За таких умов важливо не тільки проводити пошук екстремальних забруднень, але також досліджувати місцеві екологічні умови, на фоні яких відбувається забруднення, тобто здійснювати оцінку якості довкілля окремо у кожному екосистемному виділі на досліджуваній території. Чи не найважливішим об'єктом біоіндикації довкілля є рослини. Серед критеріїв, яким мають відповідати параметри рослин, що досліджуються при проведенні оцінки якості довкілля, на першому місці – інформативність і доступність у вивченні. Реакція рослин, зокрема за їх морфометричними параметрами, – інтегральний показник якості довкілля, що дає можливість оцінити стан екосистеми у поєднанні природних і техногенних факторів при незначних затратах. Для оцінки якості довкілля досліджують морфологічну реакцію листків рослин, зокрема в урбанізованому середовищі – тих, що застосовуються при озелененні. Для оцінки морфологічної реакції рослин на стан довкілля застосовують різні морфометричні параметри їх листків, серед яких найбільш розповсюдженими є оцінка флуктуючої асиметрії та форми листків [1, 5, 6].

Метою цього дослідження є аналіз деяких способів вимірювань морфометричних параметрів листків тополі пірамідальної щодо придатності запропонованих способів для оцінки якості довкілля та вивчення морфологічної реакції листків тополі у різних урбоекологічних умовах.

**Матеріали та методи**

Спостереження проведене протягом 2010–2011 рр. на 27 пікетах, розташованих в урбоекосистемі Мелітополя – промислового міста із населенням 158,45 тис. осіб, при оцінній щільності населення – 3370 осіб/км<sup>2</sup>. На пікетах відбирали листки тополі пірамідальної (*Populus pyramidalis* Wokh.), не менше 50 листків із 5 й більше дерев. Ідентифікацію видів проводили за формою крони та листків, з урахуванням того, що для міського озеленення могли бути використані гібриди тополі пірамідальної, при обробці зібраної колекції проведено статистичний аналіз приналежності окремих листків за морфометричними

ми параметрами до генеральної сукупності, з якої взято вибірку. Те саме було пророблено для усереднених значень вибірок з окремих дерев і окремих пікетів. Зібрані листки сканували, растрові зображення реєстрували у додатку **MapInfo Professional** від **MapInfo Corporation** (Тroy, New York). У середовищі MapInfo проводили подальшу обробку сканованих матеріалів та вимірювання морфологічних параметрів листків.

Результати морфометричних вимірювань порівнювали з екологічно значущими параметрами урбоекосистеми – загороженістю приземного шару повітря, будівельним навантаженням, інтенсивністю потоків автотранспорту ( $qAT$ , авт.·год.<sup>-1</sup>), сумарним показником забруднення хімічними елементами верхнього шару ґрунту. Останнє обчислено за результатами раніше проведених спостережень [2].

Загороженість атмосферного повітря у місцях спостережень оцінювали за результатами фотометрії каламутності водних змивів пилу з поверхні листків дерев. Аналіз проводили у день відбору проб із використанням приладу контролю якості води U-10 (HoriBa). За результатами вимірювань, представленими у нефелометричних одиницях каламутності ( $NTU$ ), обчислювали значення показника загороженості повітря [3]:

$$P_{\text{милу}} = (NTU_1 - NTU_{\text{витажки}}) \cdot S^l, \quad (1)$$

де  $NTU_1$  – значення каламутності змиву з листків;  $NTU_{\text{витажки}}$  – каламутність розчину за рахунок пошкодження листків (каламутність водної 30-хвилинної витяжки із промитих листків);  $S$  – площа поверхні листків, см<sup>2</sup>.

Будівельне навантаження урбоекосистеми оцінювали за ландшафтометричним показником забудови ( $K_{\text{бвд}}$ ) за формулою [2]:

$$K_{\text{бвд}} = \frac{S_{\text{бвд}} \cdot H_{\text{бвд}} + S_{\text{дрз}}}{S_{\text{тер}}} \cdot 100, \quad (2)$$

де:  $S_{\text{бвд}}$  – площа під будинками на ключовій ділянці, м<sup>2</sup>;  $S_{\text{дрз}}$  – площа під дорогами з твердим покриттям, м<sup>2</sup>;  $H_{\text{бвд}}$  – усереднена на ділянці кількість поверхів умовної будівлі;  $S_{\text{тер}}$  – площа ключової ділянки, м<sup>2</sup>.

Сумарний показник забруднення ( $Z_c$ ) обчислювали за формулою [4]:

$$Z_c = \sum_1^i \frac{C_i - C_\phi}{C_\phi}, \quad (3)$$

де:  $C_i$  – концентрація речовини на пікеті,  $C_\phi$  – фонові концентрації речовини (у даному випадку обчислено для умов регіону [2]).

Значення коефіцієнта асиметрії [5] обчислювали як відношення морфологічних параметрів листків тополі, виміряних з лівого боку ( $L$ ), до аналогічних – з правого боку ( $R$ ):

$$K = (L - R) / (L + R), \quad (4)$$

Лабораторні вимірювання за даним дослідженням проведено із розширеною невизначеністю, котра не перевищувала 3%, а польові спостереження – 20%.

### Результати і їхнє обговорення

Переважає більшість методів морфометричного аналізу листків дерев, як це видно із доступних літературних джерел, базується на вимірюванні лінійних параметрів листових пластинок. Вимірювання проводяться на живих листках [1, 5, 6]. Згаданий підхід, поряд із перевагами, наприклад, багатопараметричністю морфологічної оцінки [5] та відносною простотою вимірювань, має певні недоліки – складність у застосуванні до листків із нерегулярним жилкуванням, або зі суттєвими флуктуаціями форми, значні похибки при вимірюваннях тощо. Для часткового подолання названих недоліків нами запропоновано

проводити морфометричні вимірювання листків рослин на сканованому матеріалі за параметрами площі листової пластинки або її частин. За принципом мінімаксу, оптимальною формою при поглинанні сонячної енергії є круг, що вказує на доцільність порівняння площі поверхні листової пластинки із площею круга. Відповідно, коефіцієнт площі листової пластинки ( $K_{SL}$ ) обчислювали як відношення її площі до площі круга:

$$K_{SL} = S_L \cdot S_A^{-1} \quad (5)$$

де  $S_L$  – виміряна площа листової пластинки, мм<sup>2</sup>;  $S_A$  – площа кола (мм<sup>2</sup>) із радіусом, що дорівнює півдовжині листової пластинки (мм) та центром, розташованим на півдовжині центральної жилки листка.

На рис. 1 надано приклади листових пластинок тополі пірамідальної із різними значеннями коефіцієнтів площі, що трапляються на досліджених пікетах. Аналіз отриманих даних показує, що запропонований коефіцієнт площі дає змогу також оцінити видовженість листових пластинок дерев. Видовженість листових пластинок зростає, як це видно з рис. 1, зі зменшенням значення  $K_{SL}$ , та навпаки.

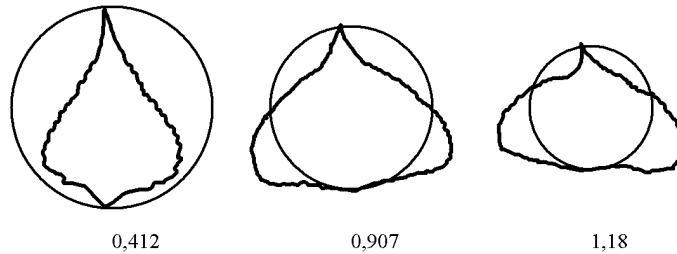


Рис. 1. Варіанти відносної площі листової пластинки тополі при різних значеннях  $K_{SL}$  (числами показано значення коефіцієнта).

При обчисленні коефіцієнта форми ( $K_{FL}$ ) листової пластинки за ознакою площі їх частин розділяли листову пластинку поперечним перерізом на рівні півдовжини й обчислювали значення  $K_{FL}$  як відношення площі верхньої частини до нижньої:

$$K_{FL} = S_t \cdot S_b^{-1}, \quad (6)$$

де  $S_t$  – площа верхньої частини листової пластинки, мм<sup>2</sup>;  $S_b$  – площа нижньої частини, мм<sup>2</sup>.

На рис. 2 подано приклади варіацій форми листової пластинки тополі пірамідальної, що трапляються на досліджених пікетах. З рисунка видно, що максимальна ширина листової пластинки значно коливається вздовж їхньої подовжньої осі. Така флуктуація форми ускладнює встановлення правила вимірювань лінійних заперечних параметрів при оцінці як форми, так і асиметрії листків, що призводить до значної похибки вимірювань. При вимірюваннях за ознакою площі названа проблема знімається, що збільшує достеменність результатів.

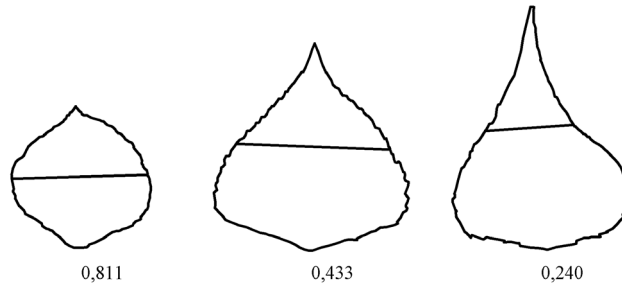


Рис. 2. Варіанти форми листової пластинки тополі при різних значеннях  $K_{FL}$  (числами показано значення коефіцієнта).

При обчисленні коефіцієнта асиметрії листків тополі пірамідальної застосовано вимірювання площі лівого та правого боків листкової пластинки. Поздовжній переріз листків здійснювали за контуром центральної жилки. Коефіцієнт асиметрії ( $K_{AL}$ ) обчислювали за формулою 4. На рис. 3 подано приклади варіації асиметрії листкової пластинки тополі пірамідальної, відібрані на досліджуваних пікетах.

Значення морфометричних параметрів на пікетах обчислювали як середнє від усіх виміряних листків дерев. Як правило, на кожному пікеті траплялися листки дерев із ознаками значного відхилення від середнього за усіма обчисленими морфометричними коефіцієнтами. Між собою пікети відрізнялися за відносною кількістю таких відхилень. Для порівняння морфологічної реакції листків дерев на якість довкілля, крім урбоекосистеми Мелітополя, було закладено пікет у фонових умовах, у 10 км на північний схід від Мелітополя, у заплаві р. Молочна поблизу заповідника Кам'яна могила. Порівняння параметрів якості довкілля із фоновим пікетом показують, що спостереження в урбоекосистемі Мелітополя проведено на тлі слабкого та середньої сили техногенного забруднення (табл. 1).



Рис. 3. Варіанти асиметрії листків тополі при різних значеннях  $K_{AL}$  (числами показано значення коефіцієнта).

Таблиця 1

Значення параметрів довкілля та морфометричних параметрів листків тополі пірамідальної у місцях спостережень (за результатами вимірювань 1040 листків)

Параметр	Середнє значення	V, %	$K_c$
Коефіцієнт площі листків ( $K_{SL}$ )	0,864	14	1,3
Коефіцієнт форми листків ( $K_{FL}$ )	0,436	9	0,96
Коефіцієнт асиметрії ( $K_{AL}$ )	0,0434	17	1,4
Показник запорошеності повітря ( $\Pi_{пшв}$ )	0,231	37	2,0
Інтенсивність потоків автотранспорту (авт. · год. <sup>-1</sup> )	403	30	–
Сумарний показник забруднення ( $Z_c$ )	11	38	1,2
Ландшафтметричний показник забудови ( $K_{зд}$ )	0,227	55	–

**Примітка.** V – коефіцієнт варіації;  $K_c$  – усереднене відхилення від фону, обчислене як  $C_i/C_\phi$ , де  $C_i$  – значення параметра у Мелітополі,  $C_\phi$  – значення фону.

Наведені у таблиці дані показують, що не за всіма застосованими морфометричними параметрами листків дерев спостерігається однакова реакція рослин на антропогенне навантаження. Значення відхилення морфометричних параметрів від фону коливається в межах від 4 до 40%. При цьому перевищення над фоном параметрів якості довкілля, як і значення їх коефіцієнтів варіації, є більш контрастним, порівняно із морфологічними параметрами, у 2–5 разів. Разом із тим, отримані результати показують, що незважаючи на “буферність” реакції рослин на антропогенне навантаження, прояв через морфометричні параметри листків є на-

явним. Важливо відзначити, що у даному випадку спостерігається реакція рослин в умовах не екстремального, а слабкого та середньої сили антропогенного забруднення.

Аналіз кореляційних зв'язків морфометричних параметрів листків тополі в урбо-екосистемі Мелітополя показує, що вони не однаковою мірою пов'язані між собою та із параметрами довкілля (табл. 2). Переважно наявні слабкі та середньої сили кореляційні зв'язки, які проявляються при заданому рівні значущості ( $P=0,95$ ).

Таблиця 2

Фрагмент матриці результатів кореляційного аналізу зв'язків морфометричних параметрів листків тополі з параметрами урбоекосистеми

Параметр	$K_{SL}$	$K_{FL}$	$K_{AL}$	$\Pi_{\text{шир}}$	$qAT$	$Z_c$
$K_{FL}$	0	1				
$K_{AL}$	0,59	0,31	1			
$\Pi_{\text{шир}}$	0	0	0,40	1		
$qAT$	0,37	0,32	0	0	1	
$Z_c$	0,25	0	0	0,31	0	1
$K_{\text{б-УД}}$	0	0	0,45	0,45	0	0,49

**Примітка.** Наведено достовірні коефіцієнти кореляції, відсутність кореляційних зв'язків позначено як "0".

Між значеннями коефіцієнтів площі та форми листкових пластинок тополі у межах проведеного дослідження достеменних зв'язків не знайдено. Коефіцієнт форми листків тополі, на відміну від інших морфометричних коефіцієнтів, не тільки проявляє найменші відмінності від фонових значень (табл. 1), але й найслабше зв'язаний із параметрами довкілля – проявляє тільки слабку залежність від автотранспортного навантаження із коефіцієнтом кореляції 0,32. Коефіцієнт асиметрії утворює зв'язки як із коефіцієнтом площі, так і з коефіцієнтом форми. Значення  $K_{AL}$  найбільш тісно пов'язане із заповненістю приземного шару повітря та забудовою, при цьому не проявляє зв'язку із транспортним навантаженням та забрудненням ґрунту. З останніми двома параметрами довкілля корелює коефіцієнт площі листків тополі. Неодноразова морфологічна реакція листків тополі на різні параметри довкілля, що проявляється у різній силі або відсутності зв'язків між морфометричними коефіцієнтами та значеннями параметрів довкілля, свідчить про доцільність використання, при проведенні оцінки якості довкілля, більше одного параметра морфологічної реакції листків.

Для порівняння проведено обчислення морфологічної реакції листків тополі за лінійними параметрами [1, 6]. Коефіцієнт видовженості листкових пластинок обчислювали як відношення довжини до ширини листка, коефіцієнт форми – як відношення ширини перерізу листка між першим і другим від черешка кватрилями до ширини перерізу між третім і четвертим, коефіцієнт флюктуючої асиметрії – як співвідношення ширини лівого та правого боку листків у перерізах між кватрилями. На кватилі розділяли листову пластинку за її поздовжньою віссю. Кореляційний аналіз зв'язків морфометричних коефіцієнтів листя тополі, обчислених за лінійними параметрами, із параметрами антропогенного навантаження показав, що коефіцієнти форми та видовженості реагують на стан довкілля тільки в умовах найбільшого антропогенного навантаження. За умов слабкого та середньої сили антропогенного навантаження коефіцієнт асиметрії проявляє слабкий зв'язок зі значеннями  $\Pi_{\text{шир}}$  та  $K_{\text{бод}}$  із коефіцієнтами кореляції 0,26 та 0,42, відповідно.

Пікети, де проводили спостереження, розташовано в екосистемах селітебних, садово-паркових, транспортних, а також у тих, що перебувають під впливом промислових



урболандшафтів. Місця спостережень перебувають під різного рівня та якості техногенним навантаженням, проте без екстремальних значень, про що свідчать коефіцієнти варіації параметрів довкілля – від 30 до 55% (табл. 1). Схему просторового розташування екосистем і місць спостережень наведено на рис. 4. Літерними індексами на рисунку позначено типи екологічних виділів. Селітебні урбоекосистеми: “Н” – котеджевої забудови з присадибними ділянками; “НР” – те саме, розрідженої забудови; “НЩ” – щільної; “М” – 1–2 поверхової забудови без присадибних ділянок; “МЩ” – те саме, щільної забудови; “С” – 3–4-поверхової забудови; “СР” – те саме, розрідженої; “В” – 5–9-поверхової забудови; “ВЩ” – те саме, щільної. На схемі виділено екосистеми садово-паркових урболандшафтів (СПЛ), до яких віднесено лісопарки та міський парк. Найбільші емісії токсичних речовин та заповненість приземного шару повітря пов’язані з екосистемами транспортних і промислових ландшафтів (ПРЛ).



Рис. 4. Схема урбоекосистем Мелітополя (пояснення у тексті). Зірочками позначено місця відбору проб листків тополі.

Із наведених у табл. 3 даних видно, що найбільші відмінності від фонових значень і варіабельність показників морфологічної реакції листків тополі притаманні екосистемам, що перебувають під впливом промислових ландшафтів. За ознакою коефіцієнта форми листків, рослини, в умовах проведених досліджень, не виявили реакції на автотранспортне навантаження. Спостерігається відмінність між реакцією рослин на промислове та селітебне навантаження. Реакція тополі на якість довкілля за ознакою коефіцієнтів площі й асиметрії листків є подібною в умовах селітебних і транспортних екосистем, але більш виразна за ознакою асиметрії листків у зоні впливу промислових підприємств. Найбільшу варіабельність морфометричних коефіцієнтів спостережено у селітебних екосистемах.

Причиною цього є значна відмінність умов місць зростання на фоні різної сили будівельного і транспортного навантаження, які значно коливаються в урбоекосистемах різного типу забудови. Порівняння значень морфометричних параметрів листків тополі, відібраних у різних урбоекологічних умовах, показує, що реакція рослин на антропогенне навантаження відповідає уявленням про відмінності якості середовища в них.

Таблиця 3

Усереднені значення відхилення від фону морфометричних параметрів листків тополі пірамідальної у різних урбоекологічних умовах

Параметр	Екосистеми селітебних урболандшафтів (n=9)		Екосистеми промислових урболандшафтів (n=8)		Екосистеми транспортних урболандшафтів (n=7)	
	$K_c$ , %	V, %	$K_c$ , %	V, %	$K_c$ , %	V, %
$K_{SL}$	22	16	34	17	32	7
$K_{FL}$	-5,2	8	-8,0	6	0	11
$K_{AL}$	28	20	48	13	30	16

**Примітка.**  $n$  – кількість спостережень;  $V$  – коефіцієнт варіації;  $K_c$  – усереднене значення відхилення від фону обчислене як  $(C_i - C_\phi) / C_\phi \cdot 100$ , де  $C_i$  – значення параметра у Мелітополі,  $C_\phi$  – значення фону.

Запропоновані на прикладі тополі пірамідальної способи вимірювання й обчислення значень морфометричних коефіцієнтів, що базуються на обліку площі листків рослин і комп'ютерній обробці зображень, – більш чутливі до змін антропогенного навантаження довкілля, порівняно зі способами, що базуються на лінійних параметрах листків. Запропоновані способи дають змогу проводити вимірювання із більшою достовірністю результатів, оцінювати і порівнювати у різних урбоекологічних умовах морфологічну реакцію листків дерев на якість довкілля за ознакою їх відносної площі, конфігурації та видовженості (коефіцієнт площі), порушень форми та флуктуацій асиметрії (коефіцієнти форми й асиметрії).

Неоднакова у різних урбоекологічних умовах морфологічна реакція листків тополі пірамідальної свідчить про те, що недоцільно обмежуватись одним морфологічним параметром при проведенні оцінки якості довкілля.

Запропоновані способи оцінки морфологічної реакції рослин на якість довкілля дають змогу використовувати їх разом із параметрами антропогенного навантаження для диференціації урбоекосистем.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Андреева М. В. Оценка состояния окружающей среды в насаждениях в зонах промышленных выбросов с помощью растений-индикаторов: автореф. дис. ... канд. с-х. наук: 06.03.03. СПб., 2007. 20 с.
2. Ганжа Д. Д. Індикаційно-діагностична оцінка поверхневого забруднення суходольних біогеоценозів (на прикладі Запорізької, Івано-Франківської областей та зони відчуження Чорнобильської АЕС): автореф. дис. ... канд. біол. наук: 03.00.16. Дніпропетровськ, 2009. 20 с.
3. Ганжа Д. Д. Оцінка накопичення атмосферного пилу листками дерев тополі в різних урбоекологічних умовах // Наук. записки Тернопіль. пед. ун-ту. Сер. біол. 2011. № 2. (47). С. 82–85.
4. Геохимия окружающей среды / под ред. Ю.Е. Саега, Б.А. Ревич, Е.П. Янин и др. М.: Недра, 1990. 335 с.

5. Методические рекомендации по выполнению оценки качества среды по состоянию живых существ: оценка стабильности развития живых организмов по уровню асимметрии морфологических структур / Утверждено Распоряжением Росэкологии от 16.10.2003 № 460-р. М., 2003. 25 с.
6. Отчет. По договору №23 от 25. 07.2002 г. на выполнение научно-исследовательских и опытно-конструкторских работ: «Внедрение нового метода раннего предупреждения в систему мониторинга зеленых насаждений» (заключительный). Руководитель проекта В.М. Захаров. М., 2003. 34 с.

*Стаття: надійшла до редакції 27.03.12*

*доопрацьована 09.10.12*

*прийнята до друку 10.10.12*

### **MORPHOLOGICAL RESPONSE OF POPLAR LEAVES IN A VARIETY CONDITIONS OF ANTHROPOGENIC LOAD**

**D. Ganzha**

*SSE "CEMRW"*

*52, Kirov St., Chornobyl UA-07270, Ukraine*

*e-mail: dmgan@rambler.ru*

Probed morphological reaction of poplar leaves in the different quality environment of the urban ecosystem. The morphometry parameters values are compared with some parameters of the environment that describing anthropogenic load. New methods of leaves plants morphometry reaction assessment to environmental quality were adoption. It is shown that different morphometry parameters of leaves plants differently manifested in different urban ecological conditions.

*Keywords:* area reclamation, environmental pollution, plant morphology, motor transport, urban ecosystem.

### **МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ РЕАКЦИЯ ЛИСТЬЕВ ТОПОЛЯ В РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ УРБОТЕХНОГЕННОЙ НАГРУЗКИ**

**Д. Ганжа**

*ГСП "ЦПОРВ"*

*ул. Кирова, 52, Чернобыль 07270, Украина*

*e-mail: dmgan@rambler.ru*

Исследована морфологическая реакция листьев тополя пирамидального на качество окружающей среды в условиях урбоэкосистемы. Проведено сравнение значений морфометрических коэффициентов с некоторыми параметрами окружающей среды, которые характеризуют техногенные нагрузки. Предложены новые способы морфометрической оценки реакции листьев растений на состояние окружающей среды. Показано, что разные морфометрические показатели листьев растений неодинаково проявляются в различных урбоэкологических условиях.

*Ключевые слова:* автотранспорт, загрязнение окружающей среды, застройка, морфология растений, урбоэкосистема.

## ЕКОЛОГО-ГЕОХІМІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ВМІСТУ РІЗНИХ ФОРМ Co, Ni, Cr У ҐРУНТАХ РІЗНОГО ГЕНЕЗИСУ В УКРАЇНІ

**В. Самохвалова, А. Фатєєв, Є. Лучникова, О. Ликова**

*ННЦ «Інститут ґрунтознавства та агрохімії імені О.Н. Соколовського»  
вул. Чайковського, 4, Харків 61024, Україна  
e-mail: v.samokhvalova@mail.ru*

На основі розрахунку й оцінки базових рівнів природного вмісту валових і рухомих форм мікроелементів у ґрунті, використання алгоритму еколого-геохімічного картографування результатів проведення ґрунтово-геохімічних досліджень у різних природно-кліматичних зонах України (Полісся, Лісостеп, Степ, Донбас, Крим, Карпати, Передкарпаття, Закарпаття) встановлено основні закономірності просторового розподілу Co, Ni, Cr у ґрунтах різного генезису та створено електронні картосхеми.

*Ключові слова:* ґрунтово-геохімічні дослідження, ґрунт, мікроелементи (кобальт, нікель, хром), фоновий рівень вмісту, еколого-геохімічне картографування.

Геохімічні ландшафти, ґрунт, хімічний елемент є фундаментальними поняттями природознавства [27]. Складовими геохімічних ландшафтів є біокосні системи (ґрунти, кори вивітрювання, підземні та ґрунтові води). Відповідно до закону *Вернадського-Кларка*, хімічні елементи є всюди, але в різних концентраціях, а максимальне напруження геохімічних процесів, що відбуваються у ландшафтах, характерна для ґрунтів [3].

Вивчення геохімії ґрунтів стало необхідним для вирішення ряду питань, пов'язаних із установами закономірностей формування хімічного складу різних компонентів трофічних ланцюгів (рослина, вода, тварина, людина), розробкою методологічних основ оцінки еколого-геохімічної стійкості ґрунтів до техногенних впливів, екологічного нормування вмісту хімічних елементів у об'єктах довкілля [2].

Встановлення закономірностей процесів надходження й накопичення мікроелементів (МЕ), важких металів (ВМ) є досить складним унаслідок високої варіабельності їхнього вмісту у ґрунтах, що іноді унеможлиблює узагальнення даних і виявлення існуючих просторових закономірностей їх розподілу [30]. Тому удосконалення методології одержання й обробки інформації щодо мікроелементного складу ґрунтів, які мають різні властивості, якісна й кількісна оцінка екологічного стану ґрунтового покриву для визначення ступеня забруднення та деградаційних змін довкілля, розробка оптимальних рішень щодо вибору доцільних засобів і заходів проведення детоксикації системи ґрунт – рослина, вибору шляхів подальшого використання ґрунтів, надання рекомендацій із поліпшення їхнього екологічного стану та зниження інтенсивності процесів деградації ґрунтів; прогнозування якості ґрунтів, харчових продуктів рослинного походження й опосередкованого та прямого впливу надлишку і нестачі хімічних елементів у трофічних ланцюгах є актуальними як у теоретичному плані, так і у прикладному аспекті їх втілення.

Аналіз літературних джерел показав, що характер функціонування ґрунту, прояв його властивостей пов'язані з перерозподілом сполук хімічних елементів. Для об'єктивної оцінки мікроелементного статусу ґрунтів (нестача МЕ, надлишок ВМ) як кінцевої мети фоновий моніторинг необхідними є дані як щодо валового мікроелементного складу ґрунтів, так і щодо вмісту рухомих форм МЕ певної території регіону за різних ґрунтово-

кліматичних умов [24, 34]. Однак валовий вміст елемента у ґрунті не завжди відображає його справжню міграційну здатність, тому що у ґрунті водночас наявні різні форми елементів, які відрізняються властивостями й доступністю для рослин. Отже, для більш точної оцінки зв'язку рухомості МЕ і їх міграції необхідно використовувати показники вмісту рухомих форм МЕ у ґрунті [16, 33].

Виходячи з того, що у різних геохімічних умовах природна норма для певного типу ґрунту і підтипів автоморфних ґрунтів може помітно відрізнятися, та враховуючи високу природну варіабельність вмісту сполук МЕ у ґрунтах, доцільно використовувати довірчі інтервали фонових концентрацій, тобто середнє значення вмісту речовини у ґрунті [23, 31]. Уявлення про фонові рівні вмісту (ФРВ) дає модальне значення (що зустрічається найчастіше). За умов визначення вмісту МЕ у ґрунтах та оцінки забруднення як фонові (еталонні) розглядають значення вмісту хімічних сполук, які є характерними для незабруднених територій із певним ґрунтовим покривом [4, 5, 25–26, 29, 31].

Мета даної роботи – проведення ґрунтово-геохімічних досліджень, аналіз отриманих даних щодо вмісту різних форм Co, Ni, Cr у ґрунтах різного генезису за використання алгоритму еколого-геохімічного картографування; визначення ФРВ їхніх валових і рухомих форм, ступеня рухомості МЕ ґрунтів у зональному аспекті, що забезпечить підвищення точності визначення, оцінки та прогнозування вмісту МЕ і ВМ у ґрунтах для об'єктивної характеристики ґрунтового покриву загалом, для подальшої розробки теоретичних основ діагностики стану й нормування вмісту МЕ і ВМ у системі ґрунт-рослина; удосконалення методології одержання й обробки інформації щодо мікроелементного статусу ґрунтів.

#### Матеріали та методи

Методика ґрунтово-геохімічного обстеження передбачала відбір об'єднаних проб ґрунтів (по кожному полю й ґрунтових виділах відповідно) згідно з чинними ДСТУ 4287:2004 [9], ДСТУ ISO 10381-2:2004 [13–14]; вивчення гранулометричного складу ґрунтів – ДСТУ 4730:2007 [11]; визначення загального гумусу ґрунту – ДСТУ 4289:2004 [10]; рН ґрунту – ГОСТ 2621291 [7]; атомно-абсорбційне визначення МЕ у ґрунтах – ДСТУ 4770.5:2007; ДСТУ 4770.7:2007 – ДСТУ 4770.8:2007 [12], МВВ 497058-016-2003 [22], Методики визначення складу та властивостей ґрунтів [23]; рН водної витяжки – ГОСТ 17.5.4.01-84 [6].

Використано фондові матеріали ґрунтово-геохімічних обстежень лабораторії охорони ґрунтів від техногенного забруднення щодо природного вмісту валових форм МЕ у ґрунтах, дані еколого-агрохімічної паспортизації земель територіальних центрів охорони родючості ґрунтів «Центрдержродючість».

В основу досліджень мікроелементного складу ґрунтів покладено досвід вивчення, визначення й узагальнення наявних даних лабораторії охорони ґрунтів від техногенного забруднення ННЦ «ІГА імені О.Н. Соколовського» щодо вмісту МЕ у ґрунтах різних природно-кліматичних зон України, використовуючи єдину науково-методичну базу (НМБ) з метою досягнення єдності вимірів і мінімізації систематичної складової похибок.

НМБ передбачає таке: загальні теоретичні положення щодо формування мікроелементного статусу ґрунтів, природного вмісту МЕ в основних типах зональних ґрунтів України, закономірностей їхнього просторового поширення; досвід вивчення й визначення мікроелементного складу ґрунтів лабораторії фізико-хімії ґрунтів (вітчизняна школа досліджень МЕ й, зокрема, М.К. Крупського, Г.М. Александрової, Л.П. Головіної, М.М. Лисенко); досвід розробки комплексу показників діагностики й оцінки ґрунтової системи (Кулаковская, 1970; Добровольський, Никитин, 1975; Чесняк, 1978; Муха, 1980;

Гринченко, 1981 і ін.), теоретичні концепції щодо технобіогеомів (Глазовская, 1976), теорія геохімічних бар'єрів і геохімічних ландшафтів (Перельман, 1979); *результати використання уніфікованих методів аналізу властивостей ґрунтів* різних природно-кліматичних зон; *результати дослідження ґрунтових процесів і факторів ґрунтоутворення* на основі визначення основних фізико-хімічних і агрохімічних показників ґрунтів; установлених загальних закономірностей, зональних особливостей змін характеру ґрунтоутворення; зв'язку гранулометричного складу, властивостей ґрунтів із вмістом валових і рухомих форм МЕ; *використання єдиного алгоритму картографування мікроелементного складу ґрунтів*.

Моніторинг ґрунтів сполучених геохімічних ландшафтів зон Полісся, Лісостепу і Степу, Донбасу, Криму, Передкарпаття, Закарпаття України, аналіз проб ґрунту на вміст МЕ, визначення параметрів властивостей ґрунтів основних типів різного ступеня еродованості та ксероморфності профілю й експозиції, відбувався з використанням таких методів досліджень: аналізування, зіставлення, системного і екосистемного підходів; ландшафтно-геохімічних, експедиційних, аналітичних, статистичних [8, 32] і геостатистичного (метод ординарного кригінгу [15, 17–20]); експертного оцінювання нормативно-довідкової документації; еколого-геохімічного картографування [15, 17, 19, 28] (моделювання просторового розподілу МЕ, використовуючи ГІС; інтерполяція, складання картосхем просторового розподілу валових і рухомих форм МЕ у ґрунтах різних природно-кліматичних зон України проведено з використанням пакету *MapInfo 8*, нерегулярної сітки з географічною прив'язкою за допомогою *GPS*, більше 850 опорних розрізів ґрунтів).

#### Результати і їхнє обговорення

За результатами проведення й аналізування отриманих даних ґрунтово-геохімічних досліджень визначено ФРВ валових і рухомих форм **Co**, **Ni**, **Cr** у ґрунтах різної буферної здатності. Розрахунок ФРВ МЕ у типовому ґрунті для певної обстежуваної території проводили, встановлюючи середні значення їхнього вмісту у досліджуваній вибірці даних із довірчим інтервалом у межах стандартної помилки. ФРВ МЕ ґрунту визначають як модальні значення (що зустрічаються найчастіше), котрі відповідають лівому максимуму функції розподілу вибірки даних щодо вмісту МЕ у ґрунтах і є незміщеною оцінкою середнього рівня вмісту МЕ у ґрунті, розподіл яких, як правило, відповідає логарифмічно нормальному закону. Отже, розрахункові показники ФРВ МЕ характеризують вміст хімічного елемента у ґрунтах певної зони, території та їх доцільно розглядати як міру розповсюдженості МЕ.

Згідно з розробленим нами алгоритмом, урахування просторової залежності ФРВ МЕ ґрунтів відбувається на підставі того, що окреме значення параметрів властивості ґрунту певного типу є функцією його розташування у ґрунтовому покриві. Отже, властивість приймається як змінна величина (районовані змінні), розглядається її зміна у просторі статистично, а придатність геостатистичних методів спирається на конфігурацію точок відбору проб за площею.

Для встановлення взаємозв'язку груп МЕ в межах кожного ґрунтово-геохімічного району або підрайону за вмістом валових і рухомих форм МЕ використано факторний аналіз; кластерний аналіз – для аналізу вибірки за сукупністю елементів кожної асоціації МЕ; ґрунтові карти – для просторової екстраполяції виділених ґрунтово-геохімічних умов.

Алгоритм картографування мікроелементного складу ґрунтів включав підготовку й використання вихідних картографічних матеріалів, присвоєння їм атрибутивної інформації, опис просторових об'єктів, створення бази геоданих, проведення реєстрації зображен-

ня, перевірку даних, макетування електронних картосхем і легенди до них, розробка ГІС «МЕ ґрунтів України».

Для створення цифрових картосхем розподілу МЕ у ґрунтах використано картографічні матеріали (ґрунтові карти масштабу 1:2 500 000 і 1:200 000 за редакцією Н.К. Крупського, топографічні карти масштабу 1:200 000). Оцифровано контури ґрунтового покриття, населених пунктів, водних об'єктів, лісових насаджень, присвоєно їм атрибутивну інформацію, використано пошаровий (оверлейний) спосіб опису просторових об'єктів, створена база геоданих. Далі сформовано електронні цифрові картосхеми розподілу МЕ в ґрунтах. Таким чином, дрібномасштабне картографування (1:2 500 000) дало змогу виявити основні закономірності поширення й забезпеченості ґрунтів України валовими та рухомими формами МЕ. Для цього обрано одну з концептуальних моделей просторової інформації, що заснована на різних властивостях середовища та необхідних для його аналізу й інтерпретації, географічних полів безперервного розподілу, які оцінювалися в обраних точках із заданими координатами. Використано статистичну версію інтерполяції – кригінг, що є оптимальним інтерполятором і одночасно методом апроксимації даних, ґрунтуючись на математичних і статистичних моделях, з виділенням інтервалів вмісту МЕ у ґрунтах. Угрупування кількісних ознак здійснювалося на основі розподілу діапазону значень вмісту МЕ у ґрунті на інтервали однакового розміру. Вибір числа класів здійснено з огляду на обсяг вибірки. При обсязі вибірки 200 – число класів становило 5. Отже, отримані електронні картосхеми інтерполюють значення концентрацій МЕ для кожної моніторингової точки ґрунтового покриття обстежених територій.

Визначено статистичні характеристики розподілу кількісних параметрів мікроелементного статусу ґрунтів з урахуванням їхньої просторової мінливості. Такий підхід дав змогу встановити зональні типові закономірності вмісту і розподілу МЕ у ґрунтах, виявити фактори, що впливають на вміст і рухомість МЕ у ґрунтах, тобто на процеси розсіювання і концентрації МЕ у ґрунтовій системі.

Розрахунок і оцінку даних проводили за умов обов'язкового урахування критерію їх репрезентативності, що забезпечує достовірність зроблених висновків при проведенні оцінки вмісту МЕ, яка є не більшою ніж достовірність, що закладена в репрезентативності даних, виходячи з того, що запланований рівень статистичних характеристик одержаних даних впливає на вибір процедур відбирання проб, часу відбору проб тощо.

КОБАЛЬТ (Co). Відомо, що у ґрунтах Co наявний у дво- та тривалентній формах [18].  $Co^{2+}$  легко мігрує у складі розчинів у вигляді хлоридів, сульфатів і бікарбонатів, але у ґрунтах  $Co^{2+}$  швидко переходить у  $Co^{3+}$ , який сполучається в нерухомі форми органічною речовиною. Виходячи зі здатності Co змінювати ступінь окислення, його рухомість у ґрунті залежить від окисно-відновлювальних умов, із підвищенням рН вона зменшується. Зміна рН з 5,8 до 7,2 зменшує поглинання Co ґрунтом удвічі [18, 21].

У ґрунтовому покритті України вміст і розподіл валових форм Co (рис. 1) залежить від його запасів у ґрунотвірній породі, кислотно-лужних умов, рівня окисно-відновлювального потенціалу, кількості та якості гумусу. У ґрунтах із високим рівнем кислотності, низьким вмістом органічної речовини та промивним типом водного режиму сформувався низький вміст цього елемента, який коливається від 3,8 мг/кг ґрунту в Західному районі провінції до 11 мг/кг ґрунту – у Лівобережному. У Поліссі встановлено зменшення вмісту Co у ґрунтах до 2,5 мг/кг, а у ґрунтах Карпат – підвищення накопичення Co до 40–76 мг/кг ґрунту.

Зона Лісостепу загалом характеризується високим рівнем валового вмісту Co у ґрунтах. Середній вміст цього елемента тут коливається в межах 14–21 мг/кг ґрунту, про-

те сірі лісові й темно-сірі опідзолені ґрунти характеризуються нижчим вмістом Со, ніж чорноземи. Ґрунти Лівобережного Лісостепу, за винятком піщаних терас Дніпра та його приток, мають високі запаси Со – 15–25 мг/кг ґрунту.

У зоні Степу вміст і розподіл Со в чорноземах звичайних близький до чорноземів Лісостепу. Вміст Со у ґрунтах в середньому становить 15–17 мг/кг ґрунту. Деяке зниження вмісту цього елемента спостерігається в чорноземах південних (до 8–15 мг/кг ґрунту).

У ґрунтах Донбасу найбільший вміст Со виявлено в чорноземах звичайних – до 30–36 мг/кг ґрунту, а середній показник – 23 мг/кг ґрунту.

Ґрунти Криму також характеризуються високим рівнем вмісту Со. Вміст валових форм Со у чорноземах південних малогумусних становить 22 мг/кг і 28 мг/кг ґрунту – у темно-каштанових ґрунтах.

У Карпатській зоні середній вміст Со у ґрунтах близький до зони Лісостепу, але в дерново-буроземних ґрунтах Закарпаття його кількість знижується до 5 мг/кг ґрунту.

Аналіз вмісту рухомих форм Со у ґрунтового покриві України засвідчує їх рівномірний розподіл (рис. 2). Винятком є ґрунти Полісся (дерново-слабопідзолисті ґрунти Західного Полісся, дерново-середньопідзолисті супіщані оглеєні ґрунти Правобережного Полісся), де вміст Со становить 0,15 мг/кг ґрунту. У темно-сірих опідзолених легкосуглинкових ґрунтах і чорноземах опідзолених важкосуглинкових Лісостепу, в чорноземі звичайному середньогумусному й каштанових солонцюватих ґрунтах Степу вміст рухомих форм Со значно коливається (відповідно 0,16; 0,14; 0,16; 0,09 мг/кг ґрунту). В інших ґрунтах вміст цих форм Со коливається в межах 0,24–0,36 мг/кг для зони Лісостепу та 0,47–0,87 мг/кг – для зони Степу, 0,44–0,78 мг/кг – в чорноземах Донбасу, а в степовій зоні Криму вміст рухомих форм Со коливається в межах 0,08–0,42 мг/кг ґрунту. Відзначено, що більша рухомість Со притаманна темно-каштановим солонцюватим ґрунтам.

За оцінювання ступеня рухомості Со у ґрунтах встановлено, що найвищий коефіцієнт рухомості Со притаманний Поліссю, де він досягав 11,84% із коливанням від 1,4 до 11,8%. У ґрунтах Лісостепу коефіцієнт рухомості Со становив 0,97–6,6%, у Степу в чорноземах звичайних важкосуглинкових і глинистих коефіцієнт рухомості Со дорівнює 0,5–3,6%, а в чорноземах південних і темно-каштанових ґрунтах – 2,76–6,0%. Найбільшу рухомість Со встановлено у чорноземах та дернових щебенюватих ґрунтах на елювії щільних безкарбонатних порід.

У чорноземах Донбасу коефіцієнт рухомості Со, як і вміст рухомої форми, більш вирівняний і коливається від 2,53 до 2,91%, а в чорноземах солонцюватих збільшується і досягає 4,58%. У зоні Криму коефіцієнт рухомості Со в чорноземі південному малогумусному дорівнює 0,86%, у чорноземах на елювії карбонатних порід – 1,75%.

Встановлено, що коефіцієнт рухомості Со в буроземах опідзолених глеюватих Передгір'я Карпат дорівнює 0,92%, а лучно-буроземні та бурі гірські ґрунти характеризуються підвищенням рухомості Со до 1,52–1,86%.

НИКЕЛЬ (Ni). Розподіл валових форм Ni у ґрунтового покриві України відповідає розподілу території на ґрунтово-кліматичні зони (рис. 3) з чітким поступовим збільшенням вмісту Ni з півночі на південь. Так, у Поліссі середній вміст Ni становить 11–13 мг/кг з коливанням у межах 9–15 мг/кг. Більш високі показники його вмісту характерні для ґрунтів Західного Полісся – до 13–15 мг/кг, а в зоні Лісостепу вміст Ni у ґрунтах значно збільшується та досягає 21–36 мг/кг з коливанням 10–80 мг/кг. У світло-сірих, сірих лісових, темно-сірих опідзолених ґрунтах виявлено, що вміст валових форм Ni нижчий, ніж у чорноземах опідзолених.



У Степовій зоні вміст Ni у ґрунтах характеризується рівномірним розподілом: від 24–29 мг/кг у чорноземах звичайних до 25–28 мг/кг ґрунту в темно-каштанових і каштанових солонцюватих ґрунтах.

Строкатість ґрунтового покриву Донбасу відіграє вирішальну роль і в розподілі Ni у ґрунтах і залежить від його кількісного вмісту у ґрунотвірній породі. Так, чорноземи, які сформувалися на піщаних безкарбонатних породах, на елювії карбонатних і щільних безкарбонатних порід, містять Ni в середньому 12–15 мг/кг, а на лесах – 22–30 мг/кг ґрунту.

У чорноземах південних Криму вміст валових форм Ni є близьким до аналогів ґрунтів зони Степу України – 30 і 29 мг/кг ґрунту відповідно.

У зоні Карпат вміст валових форм Ni коливається від 15 мг/кг в буроземно-підзолистих ґрунтах до 47 мг/кг ґрунту – в лучних та лучно-буроземних. Але розповсюджені в Передкарпатті дерново-підзолисті поверхнево-оглеєні ґрунти містять 30 мг/кг ґрунту Ni, у Карпатах – бурі гірські лісові та дерново-буроземні містять 29–32 мг/кг ґрунту Ni, а в Закарпатті – дернові опідзолені й оглеєні їх види – до 34 мг/кг ґрунту Ni.

Встановлено, що характер розподіл рухомої форми Ni у ґрунтовому покриві України є відмінним від розподілу його валового вмісту (рис. 4). Більшим (до 1,7 мг/кг) вмістом рухомих форм Ni характеризуються ґрунти Полісся. Так, у ґрунтах Західного Полісся середній вміст Ni коливався в межах 0,06–3,07 мг/кг ґрунту, у ґрунтах Правобережного Полісся – 0,08–1,7 мг/кг, а у ґрунтах Лівобережного Полісся – 0,03–1,8 мг/кг ґрунту.

Найменший вміст рухомих форм Ni (до 0,03 мг/кг) встановлено для дернових і дерново-підзолистих оглеєних ґрунтів. Подальше підвищення (до 0,5–0,9 мг/кг ґрунту) їх вмісту виявлено у супіщаних їх різновидах і до 1,43–1,7 мг/кг – у сірих опідзолених ґрунтах.

У зоні Лісостепу найбільший вміст рухомої форми Ni (0,44–1,33 мг/кг ґрунту) встановлено для ґрунтів підзолистого ряду (ясно-сірі, сірі, темно-сірі, чорноземи опідзолені). У чорноземах типових вміст рухомих форм Ni коливався у межах 0,91–1,7 мг/кг, у лучно-чорноземних – від 0,03 до 1,5 мг/кг ґрунту.

Виявлено, що вміст рухомої форми Ni у ґрунтах зони Степу України є аналогічним до вмісту у ґрунтах Лісостепу, Донбасу й Криму, окрім темно-каштанових солонцюватих ґрунтів, де вміст становив 1,08 мг/кг ґрунту з коливаннями у межах 0,06–5,0 мг/кг ґрунту.

За аналізу ступеня рухомості Ni у ґрунтах встановлено, що коефіцієнт рухомості є найвищим у ґрунтах зони Полісся – 1,5% (із коливанням 0,77–1,53%) – у дерново-підзолистих оглеєних ґрунтах Західного Полісся, до 3,8% – у дерново-підзолистих супіщаних ґрунтах Правобережного Полісся, до 4,7% – у дерново-підзолистих піщаних і глинисто-піщаних ґрунтах Лівобережного Полісся.

У зоні Лісостепу коефіцієнт рухомості Ni у ґрунтах становить 2,4% для сірих і ясно-сірих лісових ґрунтів; 2,13% – для чорноземів опідзолених важкосуглинкових; 1,33% – для чорноземів типових.

У ґрунтах зони Степу найвищим коефіцієнт рухомості Ni був у каштанових солонцюватих ґрунтах (4,5%), у чорноземах звичайних – 2,5%. Найнижчими рівнями рухомості Ni характеризувалися лучно-чорноземні та дернові глеєві ґрунти (0,005%).

У степовій зоні Криму встановлено зниження рухомості Ni до 0,86% у чорноземах південних малогумусних, до 1,2% – у темно-каштанових ґрунтах.

ХРОМ (Cr). Досліджено, що коливання вмісту валових форм Cr у ґрунтах України є значними – 18 мг/кг в окремих ґрунтах Полісся, 282 мг/кг ґрунту – у ґрунтах Закарпаття (рис. 5). У зоні Полісся виявлено незначні коливання вмісту Cr в окремих ґрунтах, більша кількість цього елемента відповідає ґрунтам Західної провінції – 48 мг/кг ґрунту, а менша – у Лівобережній – 33 мг/кг.

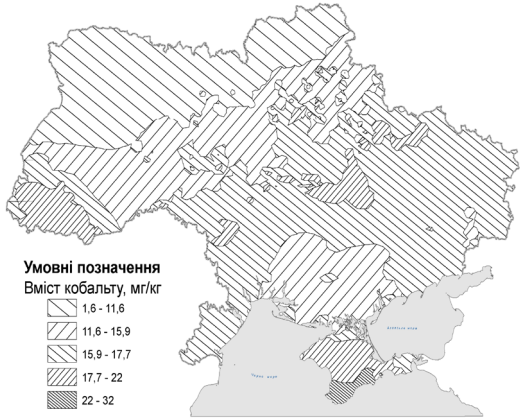


Рис. 1

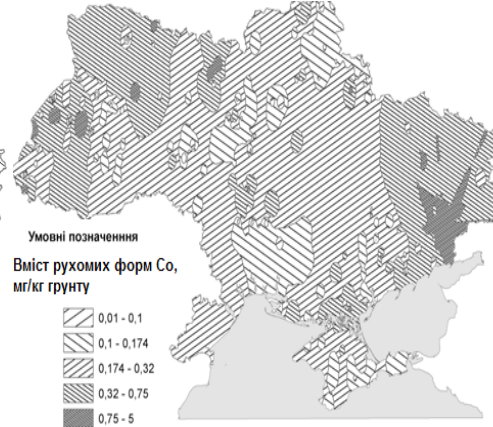


Рис. 2

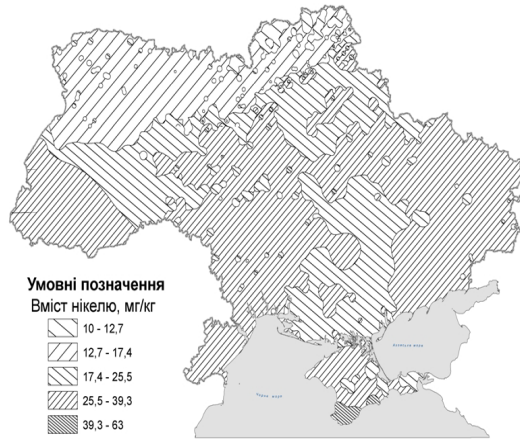


Рис. 3

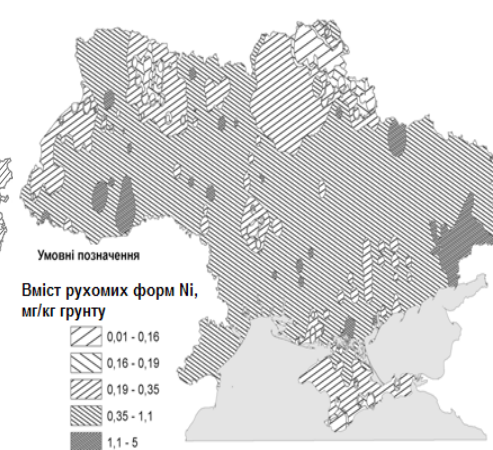


Рис. 4

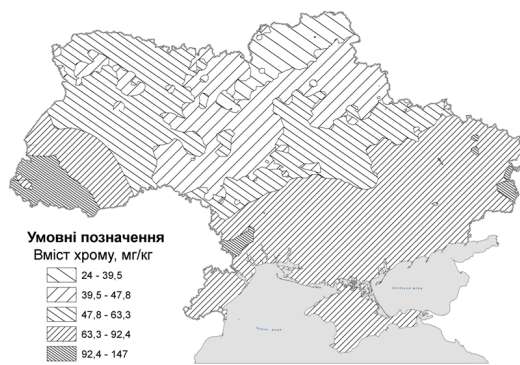


Рис. 5

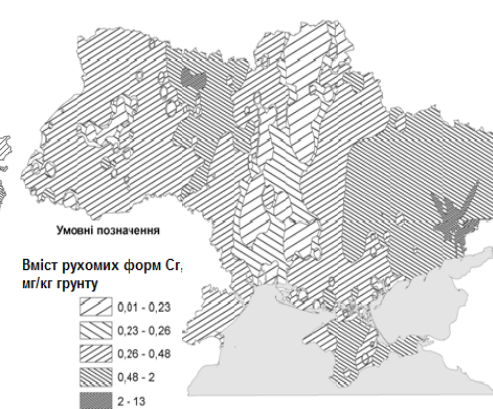


Рис. 6

Рис. 1–6. Просторовий розподіл вмісту валових (1, 3, 5) і рухомих (2, 4, 6) форм Со, Ні, Сг у ґрунтах.

У ґрунтовому покриві Лісостепу вміст валових форм Сг досить високий (у середньому 51 мг/кг), а коливання вмісту Сг є значними – 10–100 мг/кг ґрунту. Мінімальний вміст – 10 мг/кг ґрунту виявлено в окремих виділах темно-сірого опідзоленого ґрунту, а максимальне значення 100 мг/кг – в чорноземі опідзоленому середньосуглинковому.

У ґрунтах зони Степу України кількість валових форм Сг збільшується в середньому до 85 мг/кг із коливанням 40–150 мг/кг ґрунту (68 мг/кг – у каштанових солонцюватих ґрунтах, 111 мг/кг ґрунту – у чорноземі звичайному середньогумусному).

Вміст валових форм Сг у ґрунтах Донбасу зменшується в середньому до 48 мг/кг, а встановлений мінімум вмісту – 15 мг/кг ґрунту виявлено в чорноземах звичайних і дерново-карбонатних ґрунтах на елювії карбонатних порід.

Високий рівень вмісту валових форм Сг виявлено у ґрунтах степової зони Криму (40–156 мг/кг ґрунту), зони Карпат (30–160 мг/кг) і Закарпаття (30–282 мг/кг ґрунту).

Встановлено, що закономірності просторового розподілу вмісту рухомих форм Сг у ґрунтах України не збігаються із закономірностями вмісту його валових форм. Зокрема, в чорноземах і дерново-підзолистих ґрунтах Західного Полісся вміст цього елемента найнижчий – 0,07–0,66 мг/кг, а в аналогічних ґрунтах Правобережного і Лівобережного Полісся досягає 0,08–11,19 мг/кг ґрунту (рис. 6).

У ґрунтовому покриві зони Лісостепу вміст рухомих форм Сг більш рівномірний, з коливаннями від 0,17 до 0,98 мг/кг ґрунту залежно від типу ґрунту і вмісту гумусу.

У зоні Степу, в чорноземах звичайних глибоких, рівень вмісту рухомих форм Сг досягає 0,9–1,84 мг/кг ґрунту. В малогумусних аналогах вміст рухомих форм Сг знижується до 0,40–0,89 мг/кг ґрунту, а в чорноземах південних – до 0,39 мг/кг ґрунту.

Чорноземи звичайні Донбасу містять рухомих форм Сг від 0,25 до 12,5 мг/кг, чорноземи південні степового Криму – до 0,92 мг/кг, дернові опідзолені суглинкові ґрунти Закарпаття – 0,08–0,3 мг/кг, буроземи опідзолені Передгір'я Карпат – 0,19 мг/кг ґрунту.

Виявлено, що коефіцієнт рухомості Сг є найвищим у ґрунтах Правобережного Полісся (коливається від 1,58 до 5,4%), тоді як в інших ґрунтово-кліматичних зонах – від 0,24 до 1,9%.

Таким чином, за результатами комплексного еколого-геохімічного обстеження та картографування районування території України щодо закономірностей просторового розподілу різних форм Со, Ні, Сг у ґрунтах, використання удосконаленої бази даних мікроелементного складу ґрунтів України встановлено, що вміст МЕ у ґрунтах України підпорядковується природній зональності, обумовлений вмістом гумусу, типом і гранулометричним складом ґрунту.

Встановлено закономірності просторового розподілу вмісту різних форм Со у ґрунтах – зростає вміст і рухомість елемента від зони Полісся до Криму.

Середній вміст різних форм Ні у ґрунтах і ступінь рухомості його сполук є найвищою у зоні Карпат, Передкарпаття, Закарпаття та зоні Степу. Мінімальні значення вмісту різних форм Ні притаманні ґрунтам Полісся.

Особливостями просторового розподілу вмісту різних форм Сг у ґрунтовому покриві України відповідно до природно-кліматичних зон є збільшення їх вмісту від зони Полісся до Лісостепу і Степу, від Донбасу до Криму. Максимальні значення вмісту різних форм Сг встановлено для ґрунтів Передкарпаття і Закарпаття.

Створені електронні картосхеми вмісту МЕ у ґрунтах сприяють ефективному оцінюванню МЕ статусу ґрунтів різних природно-кліматичних зон України.

*Роботу підтримано грантом ДФФД № Ф43 /010 за договором із Державним агентством з питань науки, інновацій та інформатизації України. Роботу виконано*

*в лабораторії охорони ґрунтів від техногенного забруднення ННЦ «ІГА імені О.Н. Соколовського» НААНУ.*

*Автори висловлюють щиру подяку директорові ННЦ «ІГА імені О.Н. Соколовського», академіку НААН, д-ру с.-г. наук, професору С. А. Балюку, директорам обласних центрів системи «Центрдержрідючість» за сприяння та дієву допомогу в організації відбору зразків ґрунтів різного генезису у різних ґрунтово-кліматичних зонах України.*

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. География, общество, окружающая среда. Т. VII: Картография, геоинформатика и аэрокосмическое зондирование / Под ред. А.М. Берлянт. М.: ИД «Городец», 2004. 624 с.
2. Глазовская М. А. Геохимические основы типологии и методики исследований природных ландшафтов. Смоленск: Ойкумена, 2002. 286 с.
3. Глазовская М. А. Геохимия природных и техногенных ландшафтов СССР. М.: Высш. школа, 1988. 324 с.
4. Головина Л. П., Лысенко М. М. Вміст рухомих форм мікроелементів у ґрунтах УРСР // Довідник працівника агрохімслужби / за ред. Б.С. Носка. К.: Урожай, 1991. С. 10–15.
5. Головина Л. П., Лысенко М. Н., Александрова А. М. Геохимический фон тяжелых металлов в почвах УССР // Химия в сельском хозяйстве. № 2. 1987. С. 52–54.
6. ГОСТ 17.5.4.01-84 Охрана природы. Рекультивация земель. Метод определения рН водной вытяжки вскрышных и вмещающих пород.
7. ГОСТ 2621291 Почвы. Определение гидролитической кислотности по методу Каппена в модификации ЦИНАО.
8. Дмитриев Е. А. Математическая статистика в почвоведении: учебник. М.: Изд-во МГУ, 1995. 320 с.
9. ДСТУ 4287:2004 Якість ґрунту. Відбирання проб.
10. ДСТУ 4289:2004 Якість ґрунту. Методи визначання органічної речовини.
11. ДСТУ 4730:2007 Визначення гранулометричного (зернистого) складу ґрунту методом піпетки в модифікації Н.А. Качинського.
12. ДСТУ 4770.5:2007; ДСТУ 4770.7:2007 – ДСТУ 4770.8:2007 Якість ґрунту. Визначення вмісту рухомих сполук Со, Ні, Ст у ґрунті в буферній амонійно-ацетатній витяжці з рН 4,8 методом атомно-абсорбційної спектрофотометрії.
13. ДСТУ ISO 10381-1:2004 Якість ґрунту. Відбирання проб. Ч. 1. Настанови щодо складання програм відбирання проб.
14. ДСТУ ISO 10381-2:2004 Якість ґрунту. Ч. 2. Настанови з методів відбирання проб (ISO 10381-2:2002, IDT).
15. Екологічна географія і екологічна картографія / В.А. Барановський. К.: Фітосоціоцентр, 2001. 249 с.
16. Жовинский Э. Я., Кураева И. В. Геохимия тяжелых металлов в почвах Украины. К.: Наук. думка, 2002. 213 с.
17. Картографування ґрунтів: навч. посібник / за ред. Д. Г. Тихоненко. Х.: ХНАУ, 2001. 321 с.
18. Крупский Н. К., Александрова А. М. Содержание микроэлементов в почвах УССР // Агрохимическая характеристика почв СССР. Украинская ССР. М.: Наука, 1973. С. 107–124.
19. Кузякова И. Ф., Романенков В. А., Кузяков Я. В. Применение метода геостатистики при обработке результатов почвенных и агрохимических исследований // Почвоведение. 2001. № 11. С. 1365–1376.

20. *Лурье И. К.* Основы геоинформатики и создания ГИС. Дистанционное зондирование и географические информационные системы. Ч. 1 / под ред. А.М. Берлянта. М.: Изд-во ООО «ИНЭКС-92», 2002. 140 с.
21. *Лысенко М. Н.* Содержание и распространение кобальта в почвах Левобережной Лесостепи Украинской ССР: дис. ... канд. с.-х. наук. Х., 1972. 175 с.
22. МВВ 31-497058-015-2003 Визначення вмісту рухомих форм важких металів (Co, Cu, Cd, Ni, Pb, Zn, Mn, Fe) у ґрунті в 1n HCl на атомно-абсорбційному спектрофотометрі / Методи аналізів ґрунтів і рослин. Х.: ННЦ ІГА, 1991. С. 175–192.
23. Методики визначення складу та властивостей ґрунтів / Балюк С.А., Баряхтян В.О., Лазебна М. Є. / за ред. С.А. Балюка. Х., 2004. С. 193–210.
24. *Мірошниченко М. М., Фатєєв А. І., Бородіна Я. В.* та ін. Відображення просторової неоднорідності мікроелементного складу ґрунтів за результатами ґрунтово-геохімічних та еколого-агрохімічних обстежень // Агрохімія та ґрунтознавство. 2007. Вип. 67. С. 129–135.
25. *Мотузова Г. В.* Соединения микроэлементов в почвах: Системная организация, экологическое значение, мониторинг. Изд. 2-е. М.: КД «ЛИБРОКОМ», 2009. 168 с.
26. Патент на корисну модель № 70345 UA Спосіб встановлення атестованих значень показників вмісту хімічних елементів / компонентів у системі ґрунт-рослина / В.Л. Самохвалова, В.П. Філатов (Україна) / Державна служба інтелектуальної власності України, 11.06.2012, Бюл. №11.
27. Патент на корисну модель № 50068 UA Спосіб оцінки забруднення та нестачі мікроелементів ґрунту за встановлення фонового вмісту різних їх форм / В.Л. Самохвалова, Є.В. Лучникова (Україна) / Міністерства освіти і науки України, Державна служба інтелектуальної власності, 25.05.2010, Бюл. №10.
28. *Перельман А. И., Касимов Н. С.* Геохимия ландшафта. М: МГУ, 1999. 610 с.
29. *Позняк С. П., Красеха Є. Н., Кім М. Г.* Картографування ґрунтового покриву: навч. посібник. Львів: ЛНУ імені І.Франка, 2003. 500 с.
30. *Самохвалова В. Л., Фатєєв А. И., Лучникова Е.В.* и др. Уровни фонового содержания микроэлементов в почвах разного генезиса в Украине // Почвенно-земельные ресурсы: оценка, устойчивое использование, геоинформационное обеспечение: материалы междунауч. научн.-практ. конф. (6–8 июня 2012, Минск, Беларусь). Минск: Изд. центр БГУ, 2012. С. 206–208.
31. *Самохвалова В. Л., Фатєєв А. И., Лучникова Є. В., Ликова О. А.* Методика ґрунтово-геохімічного моніторингу в системі землекористування // «Довкілля для України». Зелена економіка: перспективи впровадження в Україні: Матеріали Міжнар. наук.-практ. конф. 3б. міжнар. екол. форуму. (К., 24–26 квітня 2012): у 2 т. К.: Центр екоосвіти та інформації, 2012. Т. 1. С. 322–326.
32. *Самохвалова В. Л., Фатєєв А. И., Лучникова Є. В.* Еколого-геохімічна оцінка фонового рівня вмісту різних форм мікроелементів ґрунту // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2011. Вип. 55. С. 125–133.
33. *Самсонова В. П., Мешалкина Ю. Л., Дядькина С. Е.* Практикум на компьютере по курсу: «Математическая статистика». М.: ИТК «Дашков и К», 2005. 36 с.
34. *Самчук А. І., Кіраєва І. В., Єгоров О. С.* та ін. Важкі метали у ґрунтах українського Полісся та київського мегаполісу. К.: Наук. думка, 2006. 108 с.
35. Фоновий вміст важких металів у ґрунтах України / за ред. А.І. Фатєєва і Я.В. Пащенко. Х., №13, 2003. 117 с.

Стаття: надійшла до редакції 20.08.12

доопрацьована 02.10.12

прийнята до друку 03.10.12

## ECOLOGICAL AND GEOCHEMICAL INVESTIGATIONS OF DIFFERENT FORMS OF Co, Ni, Cr IN SOILS OF DIFFERENT GENESIS IN UKRAINE

**V. Samokhvalova, A. Fateev, E. Luchnikova, E. Lykova**

*NSC «Institute for Soil Science and Agrochemistry Research  
named after O.N. Sokolovsky»  
4, Chajkovskiy St., Kharkiv 61024, Ukraine  
e-mail: v.samokhvalova@mail.ru*

For calculations, and estimation of the natural baseline levels content of the trace elements total and mobile forms in soils, using of the algorithm ecological and geochemical mapping of the results of soil-geochemical studies in different climatic zones of Ukraine (Polesie, Forest-steppe, Steppe, Donbass, Crimea, the Carpathians, Precarpathian, Transcarpathia) sets the basic regularities of Co, Ni, Cr spatial distribution in soils of different genesis and created electronic schematic maps.

*Keywords:* soil-geochemical investigations, soil, trace elements (cobalt, nickel, chromium), background levels, ecological and geochemical mapping.

## ЭКОЛОГО-ГЕОХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ СОДЕРЖАНИЯ РАЗНЫХ ФОРМ Co, Ni, Cr В ПОЧВАХ РАЗНОГО ГЕНЕЗИСА В УКРАИНЕ

**В. Самохвалова, А. Фатеев, Е. Лучникова, Е. Лыкова**

*ННЦ «Институт почвоведения и агрохимии имени О.Н. Соколовского»  
ул. Чайковского, 4, Харьков 61024, Украина  
e-mail: v.samokhvalova@mail.ru*

При проведении расчетов и оценивании базовых уровней природного содержания валовых и подвижных форм микроэлементов почв, использовании алгоритма эколого-геохимического картографирования результатов почвенно-геохимических исследований в разных природно-климатических зонах Украины (Полесье, Лесостепь, Степь, Донбасс, Крым, Карпаты, Предкарпатье, Закарпатье) установлены основные закономерности пространственного распределения Co, Ni, Cr в почвах разного генезиса и созданы электронные картосхемы.

*Ключевые слова:* почвенно-геохимические исследования, почва, микроэлементы (кобальт, никель, хром), фоновый уровень содержания, эколого-геохимическое картографирование.

**НАКОПИЧЕННЯ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ У ОРГАНАХ РОСЛИН ГІРЧАКА  
ЯПОНСЬКОГО (*POLYGONUM CUSPIDATUM* SIEB. ET ZUCC)  
ТА КРЕМЕНИ ГІБРИДНОЇ (*PETASITES HIBRIDUS* L.) ЗА ДІЇ  
ВИТЯЖОК СУБСТРАТІВ ВІДВАЛУ ВУГІЛЬНИХ ШАХТ**

**С. Ващук<sup>1</sup>, В. Баранов<sup>1</sup>, А. Баня<sup>2</sup>, З. Фецько<sup>1</sup>, Л. Карпинець<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Львівський національний університет імені Івана Франка

вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна

<sup>2</sup>Відділення фізико-хімії горючих копалин

Інституту фізико-органічної хімії і вуглехімії

імені Л. М. Литвиненка НАН України

вул. Наукова, 3а, Львів 79053, Україна

e-mail: sergijvaschuk@gmail.com

Вивчено розподіл важких металів у органах *Polygonum cuspidatum* і *Petasites hybridus* за впливу водних витяжок зі субстратів породного відвалу вугільних шахт. Показано, що відбувається збільшення вмісту важких металів у органах рослин.

*Ключові слова:* зольність, важкі метали, *Polygonum cuspidatum*, *Petasites hybridus*, породний відвал.

Проблема забруднення навколишнього середовища важкими металами (ВМ) на сьогоднішній день є достатньо важливою [6, 7, 12, 15–17]. Особливо це актуально для техногенно забруднених територій [9, 10]. У контексті цієї проблеми важливим є вивчення перерозподілу ВМ між ґрунтом і рослинами для з'ясування фітореMediaційних властивостей останніх [5, 11, 13]. Прикладом таких антропогенно порушених ґрунтів є території відвалів вугільних шахт.

Львівсько-Волинський вугільний басейн у межах Львівської та Волинської областей України, а також Люблінського воєводства Польщі охоплює площу близько 10 тис. км<sup>2</sup>. Видобуток вугілля західноукраїнським гірничо-видобувним виробничим комплексом триває уродовж 60 років. Як і кожне виробництво, вугільна промисловість має відходи, якими є пуста порода, що залишається після видобутку вугілля, і їх накопичення призводить до утворення відвалів – териконів.

З 1979 р. почала своє виробництво Центральна збагачувальна фабрика (ЦЗФ), що розташована у с. Сілець Сокальського р-ну Львівської обл. У результаті її діяльності сформований відвал загальною площею понад 76 гектарів і формується вже другий [3, 4]. Понад 70% субстрату відвалу складається із глинистих аргілітів, що сприяє сорбції хімічних елементів (Li, V, B, P, Zn, Pb, Bi, Co) [2]. Вони є дуже крихкими і мають майже провальну водопроникність [19], стічним водам відвалів властивий низький рівень рН=3–4, у субстратах міститься високий відсоток важких металів (в окремих місцях відбору перевищення ГДК по кількох елементах у 6–8 разів), у субстраті відвалу практично відсутня органічна речовина (вміст її менше 1–2%), – всі ці показники характеризують субстрати відвалу як малосприятливі для росту рослин, а відвал ЦЗФ – як техногенно забруднену територію [3]. Фіторекультивация є найбільш економічно й екологічно вигідним засобом рекультивации [8], однак потребує підбору стійких до умов відвалу рослин – концентраторів важких металів (гіперакумуляторів), які можуть виконувати функції фітореMediaції [1, 20].

Показано, що в біогеохімічних провінціях, збагачених важкими металами, рівень вмісту їх у рослинах вищий, ніж у зональній рослинності [23]. Тому важливим є дослідження накопичення важких металів рослинами зі субстратів відвалів для відбору рослин – гіперакумуляторів металів.

Метою роботи була перевірка здатності накопичувати важкі метали таких рослин, як кремена гібридна (*Petasites hybridus* L.), яка поширена по всій Україні та має значну фітомасу, і гірчак японський (*Polygonum cuspidatum* Sieb. Et Zucc.), оскільки є відомості, що дуже близький до нього вид, гірчак сахалінський (*Polygonum sachalinensis* Fr. Schmidt), в умовах Німеччини дає за рік 200–300 т зеленої маси з гектара, екстрагуючи з ґрунту до 24 кг свинцю і 322 кг цинку [22].

#### Матеріали та методи

Кореневу систему рослини замочували у витяжках зі субстратів, які використовувались як реальний чинник токсичності субстратів відвалу (у співвідношенні 1:10), в які екстрагувалися рухомі форми ВМ і які одночасно мали рН відповідних субстратів ґрунту відвалу. За контроль слугували рослини, які росли в ботанічному саду ЛНУ імені Івана Франка (м. Львів). Через 3 доби органи рослин подрібнювали, висушували до повітряно-сухої маси та для визначення важких металів (ВМ) проби спалювали у фарфорових тиглях у муфельній печі за температури 400–450°C протягом 2 год до отримання однорідного кольору золи. Після охолодження наважки золи розчиняли у амонійно-ацетатному буфері рН 4,8, фільтрували розчини через фільтр Шота № 3 під вакуумом і визначали вміст елементів на атомно-адсорбційному спектрофотометрі ААС-115 зі селективними світлофільтрами. Проби брали у триразовій повторності і при  $P=0,95$  похибка не перевищувала 7%, при допустимій похибці приладу 10% [25].

Для перерахунку вмісту важких металів на рослину та гектар зважували дорослі рослини, визначали кількість особин на 1 м<sup>2</sup>, після чого теоретично розраховували кількість рослин на 1 га, їх масу та кількість ВМ, які ними екстрагуються.

#### Результати і їхнє обговорення

При визначенні вмісту води у органах кремени виявилось, що найменший її вміст був у коренях, середній у листках і найбільший у черешках листка рослин. Вміст води по органах гірчаку японського збільшувався від коренів до пагонів, із максимумом у листках.

При визначенні вмісту золи у кремені гібридної (табл. 1) спостерігалось зростання її вмісту в усіх частинах рослини: у листках до 167% на витяжці з червоного субстрату, у черешках листка до 171% на витяжці з чорного субстрату та до 163% в коренях порівняно з контролем. Отримані результати свідчать про досить високу здатність до накопичення зольних елементів цією рослиною.

На відміну від кремени, у всіх частинах рослини гірчаку спостерігалось зниження відсотка зольності, порівняно з контролем, крім листків на витяжці з червоного субстрату, де вміст її сягав 117%. Це свідчить про різні бар'єрні механізми поглинання мінеральних елементів із розчину та селективне їх накопичення в різних частинах рослин. Найбільша зольність була у коренях і листках рослини, тобто корінь вочевидь виступав первинним бар'єром при надходженні елементів із розчину в рослину, а листки були накопичувачами мінеральних елементів. Роль пагона полягає у переносі мінеральних елементів із кореня у листки, що пояснює незначну зольність у ньому.

Як відомо, рослини поділяються на три основні групи, які розрізняються за механізмом стійкості до високого вмісту ВМ у ґрунті: рослини–гіперакумулятори, з вмістом ВМ, набагато більшим за їх вміст у ґрунті, рослини–індикатори з вмістом ВМ, приблизно



таким, як у ґрунті, і рослини–унікачі, у яких вміст ВМ значно нижчий за вміст у субстраті [14]. Який із цих механізмів накопичення виявиться у вищезгаданих рослин, у даних умовах було невідомо, і для з'ясування типу механізму накопичення ВМ був проведений аналіз їх вмісту в органах рослин кремені гібридної та гірчаку японського.

Таблиця 1

Вміст води і золи в органах рослин кремені гібридної та гірчаку японського

Ґрунт/колір субстрату	% води (від сирової маси)	% до контролю	% золи (від сухої маси)	% до контролю
	M±m		M±m	
Кремена гібридна				
Листки				
Контроль	58,5±1,8	100	10,7±0,7	100
Чорний	55,0±1,8	93	16,9±0,6	157
Червоний	54,8±1,3	93	17,9±0,4	167
Черешок листка				
Контроль	64,0±2,0	100	11,0±0,7	100
Чорний	65,5±1,8	103	18,8±0,3	171
Червоний	65,5±1,6	103	17,5±0,3	159
Корінь				
Контроль	46,0±2,1	100	3,8±0,4	100
Чорний	46,0±2,3	100	6,2±0,3	163
Червоний	49,5±3,4	109	5,2±0,6	137
Гірчак японський				
Листки				
Контроль	42,3±0,8	100	4,7±0,1	100
Чорний	43,5±1,6	105	4,3±0,3	91
Червоний	42,5±2,6	102	5,5±0,3	117
Пагін				
Контроль	32,9±1,8	100	7,3±0,3	100
Чорний	34,5±1,6	106	3,1±0,5	42
Червоний	35,5±2,7	109	5,3±0,5	73
Корінь				
Контроль	31,8±1,9	100	4,4±0,2	100
Чорний	26,5±2,1	84	4,0±0,3	91
Червоний	28,8±1,7	91	2,7±0,1	61

Важкі метали за ступенем екологічної безпеки для ґрунтів, рослин, тварин і людини згідно з ДЕСТу 17.4.02-8.3 поділяються на три класи: до першого належать високонебезпечні елементи (As, Cd, Hg, Se, Pb, Zn, F); до другого – середньонебезпечні (B, Co, Ni, Mo, Sb Cz); до третього – малонебезпечні (Ba, V, Mn, Sr) [24].

У рослин кремені на витяжці з червоного (перегорілого) субстрату відвалу спостерігалось збільшення вмісту всіх важких металів у листках і їх черешках, а у коренях збільшення спостерігалось тільки по двох металах – кадмію та свинцю – 1539 і 260% відповідно, ці два ВМ належать до найбільш токсичних. На витяжках чорної породи спостерігалась інша картина накопичення ВМ – максимум накопичення всіх металів у листках і поступове зменшення у пагонах і коренях.

Гірчак, як і кремена, у листках мав перевищення по вмісту всіх ВМ на обох субстратах. У пагоні спостерігалось тільки перевищення вмісту кадмію на обох витяжках – 578% на витяжці з чорного та 652% червоного субстратів, тоді як вміст інших елементів у пагоні гірчаку був меншим за контроль. У коренях, як і в листках, збільшувався вміст усіх ВМ (крім цинку) на витяжці з чорного субстрату, на витяжці з червоного субстрату вміст усіх елементів був меншим за контроль.

Таблиця 2

Важкі метали	Вміст ВМ (мг/кг повітряно-сухої маси)					
	Листки					
	Контроль	% до контролю	Чорний субстрат	% до контролю	Червоний субстрат	% до контролю
Cu	1,571	100	7,113	453	1,854	118
Pb	5,104	100	16,768	329	15,948	312
Ni	1,173	100	2,209	188	3,573	305
Cd	0,150	100	1,395	931	0,707	472
Zn	22,100	100	52,702	238	33,754	153
Важкі метали	Черешок листка					
	Контроль	% до контролю	Чорний субстрат	% до контролю	Червоний субстрат	% до контролю
	Cu	1,126	100	6,824	606	1,955
Pb	6,857	100	14,417	210	22,409	327
Ni	1,235	100	1,022	83	6,060	491
Cd	0,566	100	0,416	73	2,140	378
Zn	32,186	100	31,171	97	37,154	115
Важкі метали	Корінь					
	Контроль	% до контролю	Чорний субстрат	% до контролю	Червоний субстрат	% до контролю
	Cu	0,885	100	0,153	17	0,335
Pb	2,231	100	3,557	159	5,811	260
Ni	0,633	100	0,471	74	0,529	84
Cd	0,338	100	0,061	18	5,195	1539
Zn	21,395	100	15,083	70	27,216	127

Таблиця 3

Важкі метали	Вміст ВМ (мг/кг повітряно-сухої маси)					
	Листки					
	Контроль	% до контролю	Чорний субстрат	% до контролю	Червоний субстрат	% до контролю
Cu	1,098	100	2,635	240	1,805	164
Pb	5,895	100	3,984	68	7,533	128
Ni	1,131	100	1,555	137	1,207	107
Cd	0,076	100	0,313	410	0,100	130
Zn	23,847	100	26,796	112	31,501	132
Важкі метали	Пагін					
	Контроль	% до контролю	Чорний субстрат	% до контролю	Червоний субстрат	% до контролю
	Cu	1,590	100	0,766	48	1,069
Pb	5,562	100	1,837	33	5,189	93
Ni	2,147	100	0,893	42	0,314	15
Cd	0,054	100	0,313	578	0,353	652
Zn	37,765	100	14,760	39	24,881	66
Важкі метали	Корінь					
	Контроль	% до контролю	Чорний субстрат	% до контролю	Червоний субстрат	% до контролю
	Cu	0,813	100	1,322	163	0,068
Pb	2,336	100	4,164	178	0,791	34
Ni	0,669	100	1,394	208	0,016	2
Cd	0,075	100	0,241	319	0,027	36
Zn	13,285	100	8,944	67	3,695	28

Виявлено, що в усіх частинах рослин тією чи іншою мірою спостерігалось збільшення вмісту ВМ порівняно з контрольними рослинами, які росли в ботанічному саду, окрім їх вмісту в коренях гірчаку на витяжці з червоного субстрату, де вміст усіх елементів був меншим за контроль.

Зміни у накопиченні ВМ по органах рослин поки що важко пояснити, скоріше всього це пов'язано з видовими відмінностями. Більш цікавим є накопичення ВМ усією рослиною, що характеризує її фітореMediaційні властивості, тому був проведений теоретичний обрахунок кількості й маси рослин на гектар (га) і кількість винесених цією масою рослин важких металів (табл. 4).

Обрані для дослідження рослини мають високу щільність в угрупованні, яке формують, і накопичують значну фітомасу, що є дуже важливим при фітореMediaції ґрунтів, забруднених важкими металами. З перерахунку як на дорослу рослину, так і з території площею в 1 га спостерігається збільшення вмісту ВМ – так кремна гібридна накопичувала ВМ у всіх варіантах, від 129% по Ni до 466% по Cu на чорному субстраті й від 130% по Zn до 556% по Cd на червоному. Гірчак японський поглинав Cd у досить значних концентраціях, – до 300% на червоному та до 457% на чорному субстратах, тоді як по Pb спостерігалось тільки незначне перевищення на червоному та по Cu на чорному субстратах.

Таблиця 4

Кількість поглинутих важких металів кременою гібридною і гірчаком японським на різних субстратах

Важкі метали	Вміст ВМ ( мг/рослину)					
	Контроль	% до контролю	Чорний субстрат	% до контролю	Червоний субстрат	% до контролю
Кремена гібридна						
Cu	0,699	100	3,262	466	0,915	131
Pb	2,966	100	7,554	255	9,406	317
Ni	0,612	100	0,791	129	2,288	374
Cd	0,194	100	0,427	220	1,077	556
Zn	14,360	100	20,757	145	18,699	130
Гірчак японський						
Cu	0,599	100	0,777	130	0,591	99
Pb	2,485	100	1,447	58	2,649	107
Ni	0,711	100	0,586	82	0,312	44
Cd	0,031	100	0,143	458	0,094	302
Zn	13,410	100	9,044	67	11,750	88
Важкі метали	Вміст ВМ ( мг/га)					
	Контроль	% до контролю	Чорний субстрат	% до контролю	Червоний субстрат	% до контролю
Кремена гібридна						
Cu	27,97	100	130,59	466	36,59	131
Pb	118,66	100	376,24	255	376,24	317
Ni	24,47	100	91,53	129	91,53	374
Cd	7,75	100	43,09	220	43,09	556
Zn	574,41	100	747,97	145	747,97	130
Гірчак японський						
Cu	470,87	100	610,72	130	462,61	98
Pb	1949,42	100	1142,19	59	2072,77	106
Ni	557,79	100	462,14	83	243,81	44
Cd	24,59	100	112,29	457	73,75	300
Zn	10520,18	100	7094,80	67	9195,86	87

Таким чином, гірчак японський і кремна гібридна виявились акумуляторами важких металів, а по деяких елементах (зокрема, по кадмію) навіть гіперакумуляторами, що дає змогу говорити про перспективи використання цих рослин для фіторекультиваци відвалів вугільних шахт.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Алексеев Ю. В.* Тяжелые металлы в почвах и растениях. Л.: Агропромиздат, 1987. 142 с.
2. Аналітична довідка Управління охорони навколишнього природного середовища у Львівській області по Сокальському адміністративному району та Червоноградському промисловому району станом на 01.01.2007 р.
3. *Баранов В. І.* Екологічний опис породного відвалу вугільних шахт ЦЗФ ЗАТ «Львівсистеменерго» як об'єкта для озеленення // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2008. Вип. 46. С. 172–178.
4. *Баранов В. І., Книш І. Б.* Хіміко-мінералогічний склад порід відвалу вугільних шахт ЦЗФ «Львівсистеменерго» та їх вплив на проростання насіння // Промислова ботаніка: стан та перспективи розвитку: мат-ли V Міжнар. наук. конф. Донецьк, 2007. С. 36–37.
5. *Бортник Л. М.* Забруднення ґрунту важкими металами та стан рослинності на території міста Харкова // Агрохімія та ґрунтознавство: спец. вип. до V з'їзду ґрунтознавців. Харків, 1998. Ч. IV. С. 207–214.
6. *Валерко Р. А.* Забруднення важкими металами ґрунтового покриву і фітоценозів на території м. Житомира та прилеглих до нього агроєкосистем // Вісн. ДАЕУ. 2008. № 1. С. 356–366.
7. *Гамкало З.* Градієнтний аналіз вмісту важких металів в едафотопі агроландшафтів західного лісостепу України // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. геогр. 2004. Вип. 31. С. 246–252.
8. *Гуральчук Ж. З., Гудков І. М.* Фіторе mediaція та її роль в очищенні ґрунтів від важких металів та радіонуклідів // Физиология и биохимия культ. растений. 2005. Т. 37. № 5. С. 371–383.
9. *Книш І. Б., Харкевич В. В.* Розподіл вмісту хімічних елементів у породах териконів Червоноградського гірничо-промислового району // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. геол. 2003. Вип. 17. С. 148–158.
10. *Ковальчук І. П., Рудько Г. І.* Геоєкологічний аналіз гірничопромислових систем Західноукраїнського пограниччя // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. геогр. 1997. Вип. 20. С. 8–16.
11. *Козловський В.* Кореляційні зв'язки між вмістом хімічних елементів у мохах, лишайниках і корі хвойних порід Чорногори (Українські Карпати) // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2008. Вип. 47. С. 81–88.
12. *Козловський В., Пука Є., Воронцов Д., Романюк Н.* Оцінка еколого-геохімічної стійкості екосистем Сколівських Бескидів (Українські Карпати) до важких металів та кислих опадів // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2007. Вип. 45. С. 91–101.
13. *Козловський В., Романюк Н., Терек О.* та ін. Важкі метали у ґрунтах та рослинах заплави ріки Тиса // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2005. Вип. 40. С. 35–50.
14. *Кузнецов В. В., Дмитриева Г. А.* Физиология растений. М.: Высш. школа, 2006. 742 с.
15. *Лебедева О. Ю.* Геоэкологическая оценка распределения валовых форм тяжелых металлов в почвах Костромской области: автореф. дис. ... канд. геогр. наук: 25.00.36. СПб., 2011. 21с.
16. *Мислива Т. М., Онопрієнко Л. О.* Важкі метали в урбоедафотопі і фітоценозах на території м. Житомира // Вісн. ХНАУ. 2009. № 1. С. 89–95.
17. *Паньків З.* Забруднення важкими металами ґрунтів міста Бурштин Івано-Франківської області // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. геогр. 2007. Вип. 34. С. 189–192.
18. *Пересипкіна Т., Дубова О., Фендер Л.* Фізіолого-біохімічні особливості рослин в умовах промислового середовища // Укр. ботан. журн. 1997. Т. 54. С. 469–473.

19. Почвоведение / под ред. И. С. Кауричева. М.: Агропромиздат, 1989. 719 с.
20. Прасад И. М. Практическое использование растений для восстановления экосистем, загрязненных металлами // Физиология растений. 2003. Т. 50. № 5. С. 764–780.
21. Растения в экстремальных условиях минерального питания: Эколого-физиологические исследования / под ред. М. Я. Школьника, Н. В. Алексеевой-Поповой. Л.: Наука, 1983. 176 с.
22. Школьник М. Я., Алексеева-Попова М. В. Растения в экстремальных условиях минерального питания. Л.: Наука, 1983. С. 82–129.
23. Bild der Wissenschaft // Наука и жизнь. 1992. № 8. С. 47.
24. [http://agrowiki.nubip.edu.ua/wiki/index.php/Забруднення\\_грунту\\_важкими\\_металами](http://agrowiki.nubip.edu.ua/wiki/index.php/Забруднення_грунту_важкими_металами).
25. <http://www.google.com.ua/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=5&cad=rja&ved=0CDUQFjAE&url=ftp%3A%2F%2Flib.sumdu.edu.ua%2Frio%2F2010%2Fm2732.doc&ei=CFBgUIDyFIThtQbVqYHQcw&usg=AFQjCNH4sYzxXOxgjtrAMMHuoWmT0DM3pQ>.

Стаття: надійшла до редакції 21.08.12

прийнята до друку 26.09.12

## FEATURES OF HEAVY METALS ACCUMULATION IN PLANTS ORGANS *POLYGONUM CUSPIDATUM* SIEB. ET ZUCC AND *PETASITES HIBRIDUS* L.

S. Vaschuk<sup>1</sup>, V. Baranov<sup>1</sup>, A. Banya<sup>2</sup>, Z. Fetcko<sup>1</sup>, L. Karpinets<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ivan Franko National University of Lviv  
4, Hrushevskiyi St., Lviv 79005, Ukraine

<sup>2</sup>Physical Chemistry of Combustible Minerals Department of the L.M. Lytvynenko  
Institute of Physical-Organic Chemistry and Coal Chemistry of NAS of Ukraine  
3a, Naukova St., Lviv 79053, Ukraine  
e-mail: sergijvaschuk@gmail.com

The distribution of heavy metals in organs of *Polygonum cuspidatum* and *Petasites hybridus* was studied under the influence of aqueous extracts of substrates dumps of coal mines. It was shown that there was an increase of heavy metals in the plants organs.

**Keywords:** ash content, heavy metals, *Polygonum cuspidatum*, *Petasites hybridus*, rock dumps.

**НАКОПЛЕНИЕ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ В ОРГАНАХ РАСТЕНИЙ ГОРЦА ЯПОНСКОГО (*POLYGONUM CUSPIDATUM* SIEB. ET ZUCC.) И БЕЛОКОПЫТНИКА ГИБРИДНОГО (*PETASITES HIBRIDUS* L.) ПРИ ДЕЙСТВИИ ЭКСТРАКТОВ СУБСТРАТОВ ОТВАЛА УГОЛЬНЫХ ШАХТ**

**С. Ващук<sup>1</sup>, В. Баранов<sup>1</sup>, А. Баня<sup>2</sup>, З. Фецко<sup>1</sup>, Л. Карпинец<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Львовский национальный университет имени Ивана Франко  
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина

<sup>2</sup>Отделение физико-химии горючих ископаемых  
Институт физико-органической химии и углехимии имени Л.М.Литвиненко  
НАН Украины  
ул. Научная, 3а, Львов, 79053, Украина  
e-mail: sergijvaschuk@gmail.com

Изучено распределение тяжелых металлов в органах *Polygonum cuspidatum* и *Petasites hybridus* при действии водных экстрактов из субстратов породного отвала угольных шахт. Показано, что происходит увеличение содержания тяжелых металлов в органах растений.

*Ключевые слова:* зольность, тяжелые металлы, *Polygonum cuspidatum*, *Petasites hybridus*, породный отвал.

## ПОКАЗНИКИ ІМУННОГО СТАТУСУ РИБ У БІОМОНІТОРИНГУ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ У НАВКОЛИШНЬОМУ СЕРЕДОВИЩІ

М. Онисковець

*Львівський національний аграрний університет  
вул. Володимира Великого, 1, Дубляни 80381, Україна  
e-mail: Onyskovets\_M@mail.ru*

У статті проаналізовано й узагальнено наявні в зарубіжній і вітчизняній літературі дані про особливості імунної системи та імунологічних реакцій риб в умовах підвищеного антропогенного навантаження. Відзначено, що часто причиною імунологічних порушень у риб є імунотоксичність важких металів. Обґрунтовано необхідність подальших досліджень імунних показників риб як біоіндикаторів забруднення оточуючого середовища важкими металами.

*Ключові слова:* імунна система, клітини крові, риби, важкі метали, моніторинг.

Дослідження, присвячені дії різних техногенних факторів на живі організми, є в даний час пріоритетними у всьому світі. Імунна система організму визнана однією з надчутливих до впливу несприятливих чинників оточуючого середовища [2, 12, 42]. На сьогодні відомо, що більшість хімічних речовин, у тому числі й важкі метали, які застосовуються в умовах виробництва та побуті, спричиняють імунотоксичний ефект і призводять до порушення захисної функції імунної системи [12]. Аналіз даних літератури свідчить, що проблема впливу сполук важких металів на імунну систему організму потребує подальших досліджень.

**Риби як об'єкт дослідження імунотоксичності важких металів.** За останні десятиріччя імунна система риб набула важливого значення як об'єкт дослідження імунотоксичності важких металів [40]. Встановлено, що риби набагато чутливіші, ніж вищі хребетні, до важких металів, які здійснюють суттєвий вплив на імунологічні реакції організму, що дає змогу розглядати імунну систему риб як важливий біоіндикатор забруднення довкілля [51]. Зміни з боку імунітету риб під впливом невеликих доз важких металів проявляються швидше і тривають довше, ніж у ссавців. Важкі метали не тільки мають шкідливу дію на тварин, але й порушують природний розвиток процесів у екосистемі. Ці поллютанти можуть пригнічувати функції імунної системи риб або приводити до розвитку реакцій гіперчутливості й аутоімунних реакцій через дисфункції механізмів регуляції імунної системи, тим самим беручи участь у порушенні гомеостазу в організмі риб [36]. Імунологічні реакції є потужними гомеостатичними механізмами, які забезпечують сталість внутрішнього середовища організму при порушенні його речовинами антигенної природи [11]. У зв'язку з цим показники імунного статусу риб визнані чутливими і надійними біомаркерами забруднення водойм [51].

Об'єктами вивчення імунотоксичності важких металів можуть бути як ссавці (люди, миші, щурі), так і риби, проте особлива роль сьогодні відводиться експериментальним дослідженням на рибах. Оскільки риби є найбільш поширеною і різноманітною групою хребетних, які займають велику частину водного середовища, то розуміння змін в імунітеті риб є важливим для оцінки змін у загальному стані водного середовища [7, 10]. У багатьох країнах функціонують потужні імунологічні лабораторії, які на основі

численних імунологічних тестів можуть передбачити імунотоксичність ксенобіотиків для гідробіонтів. Імунологічний моніторинг за ксенобіотиками, у тому числі важкими металами, здійснюється на кількох рівнях: природна резистентність, імунна відповідь, імунопатологія [10].

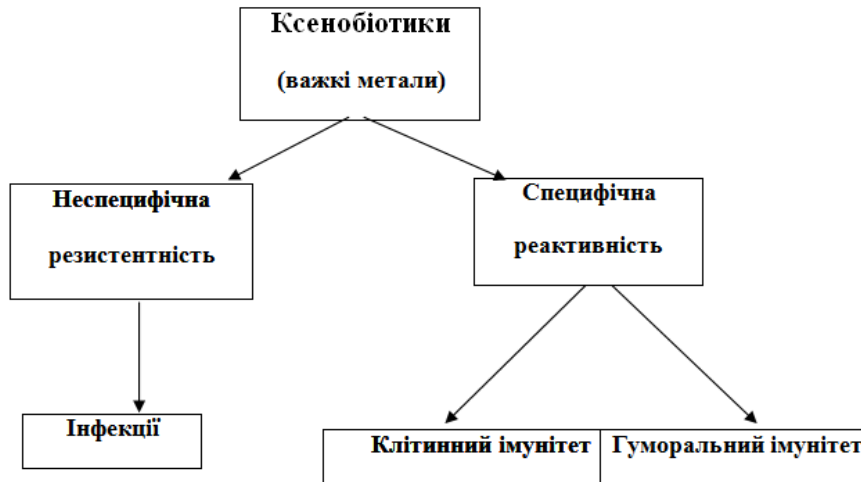


Рис. 1. Схема дії важких металів на імунну систему риб.

Імунотоксичність визначають як властивість ксенобіотика викликати порушення функції імунної системи, що проявляється неадекватними імунними реакціями. Імунотоксичність ксенобіотиків розглядають у двох аспектах: безпосередня пошкоджувальна дія речовини на імунну систему і участь імунної системи в реалізації механізмів їх токсичної дії [24]. Реакція імунної системи може бути на саму речовину, її метаболіти, комплексні антигени, що утворились в організмі при інтоксикації. Токсична дія ксенобіотиків на імунну систему є неоднаковою за інтенсивністю і спрямована на різні етапи імуногенезу [24, 25]. При надходженні в організм ксенобіотики можуть викликати зміни показників неспецифічної резистентності й імунологічної реактивності, розвиток вторинного імунодефіциту, наслідками яких є зниження антиінфекційного, протипухлинного імунітету, формування алергійних, аутоімунних реакцій і патологій (див. рисунок) [25]. В основі імунологічних зрушень за дії токсичних речовин лежать різні механізми – від грубого пошкодження стовбурових клітин кісткового мозку (порушення їх проліферації та диференціювання) до зміни продукції цитокінів, модуляції рецепторів на мембранах імунокомпетентних клітин, кількісних і якісних порушень клітин імунної системи [25, 34].

**Особливості імунної системи риб.** Імунна система риб являє собою сукупність клітинних і гуморальних факторів імунітету і складається з клітин лімфоїдно-макрофагального комплексу (лімфоцитів, гранулоцитів, клітин Купфера, Лангерганса і т.п.) і гуморальних компонентів (імуноглобуліни, система компонентів комплементу, лізоцим, інтерферон, лізин, гемолізину, гемаглютиніни і т.п.). Клітинні елементи імунної системи організовані в тканинні й органні структури. До них належать: тимус, селезінка, печінка, лімфоїдна тканина головного і тулубного відділів нирок, скупчення лімфоїдної тканини черепної коробки, кишківника, перикарда. Значна частина імунокомпетентних клітин є складовою частиною крові та лімфи [21].

З огляду на структурну організацію імунної системи, риби займають чільне місце серед безхребетних і вищих хребетних тварин. Організація імунної системи більшості риб



уже багато в чому передбачає організацію імунної системи вищих хребетних, і риби здатні до прояву всіх форм імунної відповіді, властивої для ссавців. Проте імунна система риб більш лабільна і сприйнятлива до зміни зовнішніх умов. Так, у несприятливих умовах у риб знижується стійкість до умовно-патогенних і непатогенних симбіонтів, зумовлюючи ризик захворювання інфекційними та інвазійними хворобами, викликаними цими організмами [28]. Таким чином, імунітет риб значною мірою залежить від зовнішніх впливів, і умови середовища існування становлять собою активні регулятори імунореактивності риб.

Риби належать до пойкилотермних нижчих хребетних. Органи, тканини і клітини імунної системи риб представлені в об'ємі, достатньому для функціонування всіх механізмів природного і набутого імунітету. Однак імунна система риб має низку особливостей порівняно з вищими хребетними. По-перше, у риб кровотворні та імунні функції суміщені в одних і тих же органах – у нирці, селезінці, тимусі. По-друге, досі немає об'єктивних даних, які б давали змогу розділити імунні органи риб на центральні та периферичні. Зрештою, в імунітеті риб значно більше значення мають слизові покриви шкіри, дихальних шляхів і травного тракту. Слиз не тільки виконує функцію механічного захисту, але й має антимікробну дію, бо містить лізоцим, антитіла й інші гуморальні фактори, які забезпечують негайний захист організму від наявних у воді шкідливих речовин [4, 17].

Існує значна кількість оглядів і монографій про роль механізмів природженого і набутого імунітету у риб [3, 5, 16, 22, 30, 32, 35, 37, 43, 49]. Виділяють три філогенетичних рівні еволюції імунної системи: квазіімунне розпізнавання, гуморальний і клітинний імунітет [23]. Фактори захисту від субстанцій, котрі несуть чужорідну інформацію, поділяють на специфічні та неспецифічні (вроджені). Співвідношення цих захисних реакцій у тварин різних систематичних груп неоднакове [45]. Неспецифічні фактори захисту охоплюють певні бар'єри і механізми захисту. За даними літератури, для риб характерним є домінування неспецифічних факторів захисту, а на ранніх етапах онтогенезу вони є визначальними [31, 46, 48]. У риб виявлено низку філогенетично закріплених неспецифічних гуморальних факторів, які мають протимікробну дію: лізоцим, фібриноген, бактеріцидна активність сироватки крові [17].

Перші роботи з вивчення імунобіологічної реактивності деяких хребетних тварин були проведені одним із основоположників сучасної імунології І.І. Мечниковим (1883, 1913, 1947, 1950). У риб були відзначені фагоцитарні та запальні явища, описані регенеративні процеси [19]. Імунологічна реактивність організму визначається його здатністю розпізнавати та **знешкоджувати генетично чужорідне**. Клітинну ланку неспецифічної резистентності організму риб, як і ссавців, характеризує фагоцитарна активність крові. Фагоцитоз вважається основним процесом неспецифічної резистентності. Фагоцитоз – це процес активного поглинання клітинами організму патогенних живих чи мертвих мікроорганізмів, а також інших чужорідних часток із подальшим перетравленням їх за допомогою внутрішньоклітинних ферментів. Основними клітинами, які беруть участь у процесі фагоцитозу, є нейтрофільні гранулоцити [4].

Дослідження неспецифічних механізмів реакції імунної системи риб, які забезпечують захист від інфекцій та збереження індивідуальної цілісності організму, становить як теоретичний, так і практичний інтерес при визначенні ролі імунної системи в реалізації процесів адаптації до токсичних і біотичних факторів, при оцінці причин зниження напруженості природного імунітету в умовах середовища та розробці проблем біотестування, визначення норми і патології тощо [20].

**Імунокомпетентні клітини крові.** За даними літератури, одним із найважливіших завдань еколого-імунологічних досліджень є з'ясування загальних закономірностей

перебудов імунологічної реактивності риб під дією факторів зовнішнього середовища, можливість прогнозування цих змін і управління ними. Це завдання не можна вирішити без ретельного вивчення головної основи імунної відповіді організму – імунокомпетентних клітин, до яких належать, насамперед, лімфоцити, а також макрофаги / моноцити і гранулоцити [27].

Клітини крові риб представлені високоорганізованими, постійно функціонуючими комплексами і є морфологічною основою імунної системи. Характерною особливістю крові риб є те, що у них в периферичній крові, поряд зі зрілими лейкоцитами, містяться і молоді форми лейкоцитів, які відрізняються за низкою ознак: розміром, формою і будовою ядер; кількістю цитоплазми і наявністю зернистості в них; здатністю зафарбовуватися кислими і основними барвниками [4]. Так, у крові коропа розрізняють 7 груп лейкоцитів на різних стадіях цитогенезу: 5 груп гранулоцитів – нейтрофіли, еозинофіли, псевдоеозинофіли, базофіли, псевдобазофіли та 2 групи агранулоцитів – моноцити і лімфоцити [9]. Крім того, у крові трапляються бластні форми: гемоцитобласти, мієлобласти, промієлоцити, мієлоцити і метамієлоцити. Дані літератури стосовно особливостей складу периферичної крові риб вказують на суттєві сезонні, вікові та навіть статеві особливості [26]. Склад периферичної крові значно коливається в межах виду, на що вказують більшість авторів [1]. Деякі автори встановили сезонні коливання [15], інші автори це заперечують [26].

Так, в імунній системі риб представлені всі типи клітин, які беруть участь в імунних реакціях у вищих хребетних тварин. Це не тільки клітини, що опосередковують реакції вродженого імунітету, – гранулоцити, моноцити і макрофаги, неспецифічні цитотоксичні клітини, але й лімфоцити, відповідальні за реакції системи, що розпізнає антиген [39]. Популяція лімфоцитів у риб здійснює функцію адаптивного імунітету, що характерно для лімфоцитів ссавців. У ній розрізняють субпопуляції, подібні за поверхневими маркерами і функціями до Т- і В-лімфоцитів ссавців [38, 48]. **В останні роки за допомогою моноклональних антитіл, специфічних до поверхневих маркерів тимоцитів риб, було підтверджено, що в імунній системі риб існує субпопуляція Т-лімфоцитів, яка поділяється на Т-хелпери і Т-кілери [44].**

Імунна система риб, яка здійснює захист внутрішнього середовища від вторгнення чужорідних антигенів, є досить чутливим показником стану як самого організму, так і середовища існування [33]. У цьому плані дослідження різних складових імунної системи риб досить важливі для оцінки імунотоксичності різних сполук. Із літературних даних відомо, що гематологічні показники – це найважливіші параметри для оцінки імунного статусу риб [47]. В основі усіх варіантів захисту організму лежить взаємодія клітин імунної системи [18]. Вивчення лейкоцитарної системи дає можливість скласти уявлення про загальний фізіологічний стан організму [1], його стійкість, здатність адаптуватись до умов середовища і, зокрема, до токсичних речовин, які забруднюють водойми [13]. Дослідження, що стосуються реакції лімфоцитів на екотоксиканти, нечисленні, а стосовно впливу сполук важких металів – поодинокі [33]. У літературних джерелах трапляються повідомлення про те, що в основі імунологічних порушень за дії важких металів можуть лежати порушення проліферації та диференціювання імунокомпетентних клітин, продукції захисних антитіл і регуляторних цитокінів [8, 14, 40, 41]. Виявлення незадовільного рівня функціонування клітин може свідчити про імунотоксичність металу і необхідність всебічного дослідження стану водойм [51].

Таким чином, імунна система як система захисту організму від чужорідного впливу є надзвичайно чутливою до токсичної дії хімічних речовин, які присутні в дуже

низьких концентраціях у навколишньому середовищі. На сьогодні, в результаті експансії людської діяльності практично на всі природні зони і нерационального ставлення людини до навколишньої природи, багато імунологічних параметрів риб почали використовувати як біомаркери для моніторингу імунотоксичності хімічних забруднювачів середовища існування і для передбачення токсикологічного ризику, пов'язаного із забрудненням водних середовищ. Найширше використовуються такі імунні параметри, як концентрація лізоциму, антитіл і лейкоцитів у крові риб, а також тести функціональної активності комплементу, макрофагів і лімфоцитів. Дослідження показників імунної системи риб можуть бути використані при розробці ефективних способів імунологічного моніторингу стану риб і вирішенні завдань з оцінки якості навколишнього середовища, а також слугувати основою для вирішення практичних завдань, таких як ефективне промислове розведення риби, екологічне моделювання та достовірне передбачення змін екологічної обстановки біогеоценозів.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Аминева В. А., Яржомбек А. А.* Физиология рыб. М.: Легкая и пищевая пром-сть, 1984. 200 с.
2. *Винарська О. І., Черниченко І. О., Ніконова Н. О.* та ін. Вплив комбінованої дії хімічних сполук на імунну систему // Довкілля та здоров'я. 1999. № 3 (10). С. 25–27.
3. *Вихман А. А.* Иммунофизиологический статус рыб-объектов аквакультуры: автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.10. М., 1994. 48 с.
4. *Вищур О. І., Кичун І. В., Лешовська Н. М.* та ін. Природна резистентність деяких видів риб // Наук.-техн. бюл. Ін-ту біології тварин УААН і ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок. Львів, 2008. Вип. 9. № 3. С. 343–348.
5. *Грищенко Л. І., Рудиков Н. І.* Проблемы патологии и иммунитета при инфекционных болезнях рыб // Итоги науки и техники ВИНТИ. Сер. ихтиология. М.: ВИНТИ, 1985. Т. 1. С. 190–211.
6. *Данилів С. І., Мазена М. А.* Вплив ацетату свинцю на гуморальні фактори неспецифічної резистентності коропа // Совр. пробл. токсикологии. К.: Медицина Украины, 2009. № 3/4. С. 53–56.
7. *Данилів С. І., Мазена М. А.* Реакція кровотворних органів та зябер *Surginus carpio* L. на надлишкові концентрації іонів шестивалентного хрому // Галицький лікарський вісн. 2009. Т. 16. № 4. С. 39–42.
8. *Дмитруха Н. М.* Експериментальне дослідження впливу важких металів (свинцю та кадмію) на неспецифічну резистентність організму білих щурів // Совр. пробл. токсикологии. 2004. № 4. С. 27–31.
9. *Дрогомирецька І. З., Мазена М. А.* Сезонні та вікові особливості лейкоцитів периферійної крові коропа (*Surginus carpio* L.) // Біологія тварин. 2008. Т. 10. № 1–2. С. 116–122.
10. *Дрогомирецька І. З., Мазена І. В., Мазена М. А.* Імунотоксичність нікелю та його сполук // Совр. пробл. токсикологии: Науч.-практ. журн. 2009. № 3/4. С. 25–31.
11. *Дрогомирецька І. З., Мазена М. А.* Особливості фагоцитарної активності лейкоцитів крові *Surginus carpio* L. під впливом іонів кадмію та нікелю // Природничий альманах. Біол. науки. 2008. Вип. 10. С. 53–60.
12. *Жминько П. Г.* Нарушение функции системы иммунитета под воздействием пестицидов и некоторые задачи иммунотоксикологии на современном этапе (обзор) // Совр. пробл. токсикологии. 1998. № 2. С. 53–58.

13. *Заботкина Е. А., Лапирова Т. Б.* Влияние тяжелых металлов на иммунофизиологический статус рыб // Успехи современной биологии. 2003. Т. 123. № 4. С. 401–408.
14. *Забродский П. Ф.* Механизмы токсического действия металлов и их влияние на иммунную систему // Токсиколог. вестн. 1998. № 6. С. 9–15.
15. *Иванова Н. Т.* Атлас клеток крови рыб. М.: Легкая и пищевая пром-сть, 1983. 179 с.
16. *Киташова А. А.* Реакции врожденного и приобретенного иммунитета у рыб в естественных и экспериментальных условиях: дис. канд. биол. наук: 03.00.10, 14.00.36. М., 2002. 186 с.
17. *Кондратьева И. А., Киташова А. А., Ланге М. А.* Современные представления об иммунной системе рыб. Ч. I. Организация иммунной системы рыб // Вестн. Москов. ун-та. Сер. биол. 2001. № 4. С. 19–28.
18. *Кондратьева И. А., Киташова А. А.* Современные представления об иммунной системе рыб. Функционирование и регуляция иммунной системы рыб // Иммунология. 2002. № 2. С. 97–101.
19. *Лукьяненко В. И.* Иммунобиология рыб. Врожденный иммунитет. М.: Агропромиздат, 1989. 269 с.
20. *Макарская Г. В., Тарских С. В., Лопатин В. Н.* Особенности функциональной активности иммунокомпетентных клеток крови рыб Красноярского водохранилища // VIII съезд Гидробиол. об-ва РАН, (Калининград, 2001). Т. 1. С. 118–119.
21. Методические указания по определению уровня естественной резистентности и оценке иммунного статуса рыб / ИБВВ РАН и ВНИИПРХ. 25.11.99. № 13-4-2/1795.
22. *Микряков В. Р.* Закономерности функционирования иммунной системы пресноводных рыб: автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.10. М., 1984. 37 с.
23. *Минченко Е. Е.* Защитные клеточные и тканевые реакции у семги и горбуши на ранних стадиях онтогенеза: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.10. М., 2007. 24 с.
24. Общая токсикология / под ред. Б.А. Курляндского, В.А. Филова. М.: Медицина, 2002. 608 с.
25. Основы токсикологии: науч.-метод. изд. / под ред. С.А. Куценко. Пб: ООО «Изд-во Фолиант». 2004. 720 с.
26. *Серпунин Г. Г.* Гематологические показатели сеголеток карпа во время зимовки // Сб. тр. Калинингр. техн. ин-т рыб. пром. хоз-ва. 1980. Вып. 91. С. 66–69.
27. *Степанова В. М.* Влияние экологических факторов различной природы на клеточное звено иммунной системы рыб: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.16. Борок, 2003. 23 с.
28. *Юнчис О. Н.* Инфекционные болезни морских аквариумных рыб // Проблемы аквакультуры. М.: Московский зоопарк, ООО «АКВА ЛОГО». 2005. С. 115–126.
29. *Agbede S. A., Adeyemo O. K., Adedeji O. B., Junaid A. U.* Ultrastructural study of the phagocytic activities of splenic macrophages in tilapia (*Oreochromis niloticus*) // *African J. Biotechnol.* 2006. Vol. 5. N 22. P. 2350–2353.
30. *Alexander J. B.* Noncellular nonspecific defense mechanisms of fish // *Ann. Rev. Fish Dis.* 1992. Vol. 2. P. 249–279.
31. *Anderson D. P., Zeeman M. G.* Immunotoxicology in fish // *Fundamentals of aquatotoxicology* (2th ed.) / Ed. by Rand G. M., Talor and Fransis. USA. 1995. P. 371–405.
32. *Asbakk K.* Elimination of foreign material by epidermal malpighian cells during wound healing in fish skin // *J. Fish Biol.* 2001. Vol. 58 (4).P. 953–966.
33. *Bols N. C., Brubacher J. L., Ganassin R. C.* et al. Ecotoxicology and innate immunity in fish // *Developmental and Comparative Immunol.* 2001. Vol. 25. P. 853–873.

34. Berlin A., Dean J., Draper M. N. et al. Immunotoxicology. Geneva. 1987. 495 p.
35. Dalmo R. A. Non-specific defence mechanisms in fish, with particular reference to the reticuloendothelial system (RES) // J. Fish Diseases. 1997. N 20. P. 241–273.
36. Dunier M., Siwicki A. K., Demael A. Effects of organophosphorus insecticides: effects of trichlorfon and dichlorvos on the immune response of carp (*Cyprinus carpio*). III. In vitro effects on lymphocyte proliferation and phagocytosis and in vivo effects on humoral response // Ecotoxicol. Environmental Safety. 1991. Vol. 22. N 1. P. 79–87.
37. Ellis A. E. The leucocytes of fish: a review // J. Fish Biol. 1977. №11. P. 435–491.
38. Huttenhuis H. B. T., Grou C. P. O., Taverne-Thiele A. J. et al. Carp (*Cyprinus carpio* L.) innate immune factors are present before hatching // Fish Shellfish Immunol. 2005. N 20. P. 586–596.
39. Huttenhuis H. B. T., Huising M. O., Van der Meulen T. et al. Rag expression identifies B and T cell lymphopoietic tissues during the development of common carp (*Cyprinus carpio* L.) // Dev. Comp. Immunol. 2005. N 29. P. 1033–1047.
40. Lawrence D. A., McCabe M. J. Immunomodulation by metals // Immunopharmacol. 2002. N 2. P. 293–302.
41. Ohsawa M. Heavy metal-induced immunotoxicity and its mechanisms // Yakudaku Zassha. 2009. Vol. 129. N 3. P. 305–319.
42. Pfeifer J., Richter I., Rodova V., Kral V. Иммунитет и влияние окружающей среды попытка обобщения связей // Журн. гигиены, эпидемиологии, микробиологии и иммунологии. 1989. Т. 33. № 2. С. 135–140.
43. Press C. McL., Evensen O. The morphology of the immune system in teleost fishes // Fish & Shellfish Immunol. 1999. N 9. P. 309–318.
44. Scapigliati G., Romano N., Abelli L. Monoclonal antibodies in fish immunology: identification, ontogeny and activity of T- and B-lymphocytes // Aquaculture. 1999. N 172. P. 3–28.
45. Siwicki A. K., Anderson D. P. Nonspecific defence mechanisms assay in fish. II. Potential killing activity of neutrophils and macrophages, lysozyme activity in serum and organs and total immunoglobulin (T- Ig) levels in serum. Fish Diseases Diagnosis and Prevention's Methods. FAO-Project GCP/INT/526/JPN, IFI Olsztyn: 1993. P. 105–112.
46. Studnicka M., Siwicki A. K., Kazun K. Nonspecific defence barriers and mechanisms in fish // Fish diseases diagnosis and preventious methods. Olsztyn: Wydawnictwo IRS. 1993. P. 105–111.
47. Vosylienié M. Z. The effect of heavy metals on hematological indices of fish // Acta Zoologica Lituanica. Hydrobiologia. 1999. Vol. 9. N 2. P. 76–82.
48. Weyts F. A. A., Rombout J. H. W. M., Flik G., Verburg-Van Kemenade B. M. L. A common carp (*Cyprinus carpio* L.) leucocyte cell line shares morphological and functional characteristics with macrophages // Fish Shellfish Immunol. 1997. N 7. P. 123–133.
49. Zapata A. Phylogeny of the fish immune system // Bull. de L. Inst. Pasteur. 1983. Vol. 81. P. 165–186.
50. Zelikoff J. T., Carlson E., Li Y. et al. Immunotoxicity biomarkers in fish: development, validation and application for field studies and risk assessment // Human and Ecological Risk Assessment. 2002. Vol. 8. N 2. P. 253–263.
51. Zelikoff J. T. Biomarkers of immunotoxicity in fish and other non-mammalian sentinel species: predictive value for mammals? // Toxicology. 1998. Vol. 129. N 1. P. 63–71.

Стаття: надійшла до редакції 29.03.12

доопрацьована 07.06.12

прийнята до друку 03.07.12

## **PARAMETERS OF THE FISH IMMUNE STATUS IN THE BIOMONITORING OF ENVIRONMENTAL HEAVY METALS**

**M. Onyskovets**

*Lviv National Agrarian University  
1, Volodymyr Velykyj St., Dubliany 80381, Ukraine  
e-mail: Onyskovets\_M@mail.ru*

The article analyzes and summarizes data existing in foreign and home literature concerning characteristics of the fish immune system and immune responses in the conditions of anthropogenic stress. It was noted that the often cause of immune disorders in fish are toxic for immune system heavy metals. Article describes a necessity of further studies of the immune parameters of fish as bioindicators of environmental pollution by heavy metals.

*Keywords:* immune system, blood cells, fish, heavy metals, monitoring.

## **ПОКАЗАТЕЛИ ИММУННОГО СТАТУСА РЫБ В БИОМОНИТОРИНГЕ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ В ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЕ**

**М. Онисковец**

*Львовский национальный аграрный университет  
ул. Владимира Великого, 1, Дубляны 80381, Украина  
e-mail: Onyskovets\_M@mail.ru*

В статье проанализированы и обобщены имеющиеся в зарубежной и отечественной литературе данные об особенностях иммунной системы и иммунологических реакций рыб в условиях повышенного антропогенного воздействия. Отмечено, что часто причиной иммунологических нарушений у рыб является иммунотоксичность тяжелых металлов. Обоснована необходимость дальнейших исследований иммунных показателей рыб в качестве биоиндикаторов загрязнения окружающей среды тяжелыми металлами.

*Ключевые слова:* иммунная система, клетки крови, рыбы, тяжелые металлы, мониторинг.

## ПЕРЕДУМОВИ ВТРАТИ ЖИТТЄЗДАТНОСТІ ПОПУЛЯЦІЇ ТРАВ'ЯНИХ РОСЛИН

В. Гісовський

*Інститут екології Карпат НАН України  
вул. Козельницька, 4, Львів 79026, Україна  
e-mail: gnovina@gmail.com*

У роботі представлена комп'ютерна модель динаміки віталітетного спектра популяції трав'яних рослин з урахуванням мультиагентного підходу. На підставі проведених числових експериментів описані передумови втрати життєздатності популяції трав'яних рослин. Визначені як кількісні, так і якісні їх оцінки.

*Ключові слова:* популяція трав'яних рослин, життєздатність, комп'ютерна модель, числовий експеримент.

Довготривале функціонування популяцій трав'яних рослин супроводжується реалізацією її популяційних функцій – відновлення, утримання, експансія території, розселення та збереження еволюційних перспектив. Тільки за умови життєздатності популяції вони проявляються повною мірою. Зрозуміло, що життєздатність такої біосистеми має певні межі, які суттєво залежать від структури популяції, зокрема віталітетності, тобто від наявності у популяції особин різної життєвості. Нагадаємо, що під поняттям *життєвість* ми розуміємо біотично обумовлену різноякісність особин, яка визначає їхні потенції до розвитку. *Життєвий стан* – це ознака реалізації біотичних властивостей особин, їхньої життєвості в конкретних умовах. Під терміном *життєздатність* розуміємо інтегральний ефект, який підтримує рівень системної організації популяції та реалізує основні популяційні функції [5]. Умовно рівні життєвості особин, які формують віталітетний спектр, розділимо на три категорії. Вища категорія *Ж-1*, проміжна – *Ж-2* та нижча категорія – *Ж-3*.

Провести дослідження динаміки розвитку трав'яних рослин емпіричними методами надзвичайно важко, оскільки процес функціонування рослинних популяцій є складним і йому властиві незворотність розвитку та значний часовий діапазон динаміки. Моніторинг популяції в умовах польових досліджень рідко перевищує 3–5 років, що не порівнянне з часовим масштабом інтервалу великого життєвого циклу популяцій. Ці труднощі вимагають застосування нових технологій у популяційних дослідженнях. До них можна віднести метод комп'ютерного імітаційного моделювання популяцій із подальшим проведенням на моделях числових експериментів [2].

Метою роботи було визначити принципи комп'ютерного імітаційного моделювання функціонування популяцій трав'яних рослин у просторі та часі, базуючись на концепції життєздатності популяції. Окрім можливості візуалізувати на моніторі саму віталітетну структуру популяції та визначити співвідношення особин різної життєвості, модель враховує синонтогенез як узагальнення онтогенезу особин та її репродуктивні функції – насінневе і вегетативне розмноження [3]. На цій основі розроблено моделюючий алгоритм, який враховує мультиагентний підхід (МА) [9]. **Визначається агент – особина як елемент системи.** А особливістю МА систем та її архітектури є окреслення простору, в якому функціонує агент, його тип, встановлення взаємозв'язків між різними типами агентів та їх взаємодія з простором, у якому вони проживають. Таким чином, кожному агенту притаманні властивість автономності, взаємодія з іншими агентами на засадах визначених аксіом, адекватна

реакція на зміну середовища і множина методів, у рамках яких відбувається допустима зміна властивостей самого агента [4]. За характером свого функціонування модель імітує динаміку розвитку популяцій трав'яних багаторічників із явно поліцентричним характером. Первинні дані базуються на матеріалах, отриманих відділом популяційної екології ІЕК НАН України [8]. Проведено низку числових експериментів для дослідження поведінки віталітетного спектра і просторового розвитку модельної популяції. У загальному функціонування системи можна записати таким чином:

$$x(t+1)=F(x(t),\alpha(t),\beta(t)), \quad (1)$$

де  $x(t)$  – стан системи в момент  $t$ ;  $\alpha(t)$  і  $\beta(t)$  – внутрішні та зовнішні чинники, які впливають на динаміку системи, а  $F(*)$  – оператор переходу з одного стану системи у наступний. З точки зору дослідження життєздатності популяції, до внутрішніх факторів слід віднести динаміку рівнів життєвості з урахуванням їх життєвого стану, а до зовнішніх чинників слід віднести такі антропогенні втручання як випас, косовиця, збирання ягід, виривання та виотпування рослин [7].

Розглянемо більш детально внутрішні чинники. У моделі ми враховували три рівні життєвості – Ж-1, Ж-2, Ж-3. Віталітетний стан особини, яка належить до однієї з груп життєвості, можна записати таким чином:  $f_{ij}(t)$  – особина в момент  $t$ ;  $j \in J$  – множина особин, що належить групі життєвості  $i$ ;  $i \in I=\{\text{Ж-1, Ж-2, Ж-3}\}$  – групи життєвості. Для кожного  $j$  її життєвий стан можна записати таким виразом:

$$f_i(t, \lambda_j) = \lambda_j * f_i^b(t) + (1 - \lambda_j) * f_i^m(t), \quad (2)$$

де  $[b, m]$  – діапазон потенцій особини, який залежить від групи життєвості, а  $\lambda$  – параметр життєвого стану, який приймає значення з відрізка  $[0, 1]$ . Нехай для всіх  $j$  визначимо функцію  $G_i(t)$  наступним чином:

$$G_i(t) = \max_j \{f_i(t, \lambda_j)\}, \quad i \in I \quad (3)$$

Розглянемо два можливі варіанти виконання умов (4) та (5):

$$G_i(t) \neq G_j(t) \neq G_k(t), \quad j \in J \quad (4)$$

$$G_i(t) \cong G_j(t) \cong G_k(t), \quad j \in J \quad (5)$$

При виконанні умови (4) сформулюємо таке твердження – динамічні характеристики популяції набувають ознак життєздатності, а при виконанні умови (5) настає передумова її втрати.

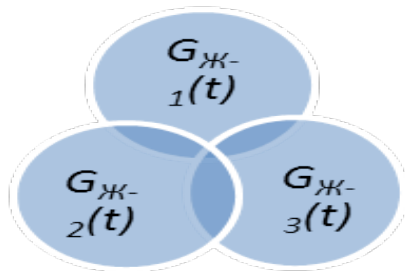


Рис. 1. Стійкий стан розвитку популяції.

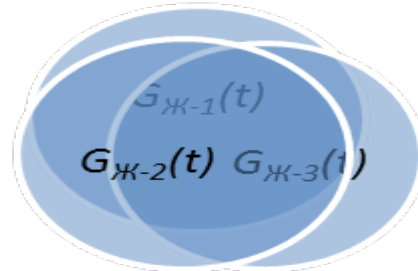


Рис. 2. Умова втрати стійкості.

З точки зору теоретико-множинної інтерпретації умови (4) та (5) можна представити як на рис. 1 та рис. 2, відповідно. При цьому логістична крива популяції у разі виконання умови (4) представляється графіком на рис. 3, а у разі виконання умови (5) – графіком на рис. 4. Очевидно, що динаміка системи, зображена на рис. 3, має стійкий характер, а на рис. 4 – ні, оскільки у цьому випадку демографічна крива має велику амплітуду коливань, яка містить інформацію про можливу втрату стійкості системи. Причиною цього явища



може бути ефект когерентності, тобто здатності системи до інтерференції – взаємного підсилення або ослаблення коливних процесів віталітетного спектра при накладанні хвиль одна на одну за умови рівності їх довжин [6], що обумовлюється виконанням умови (5).

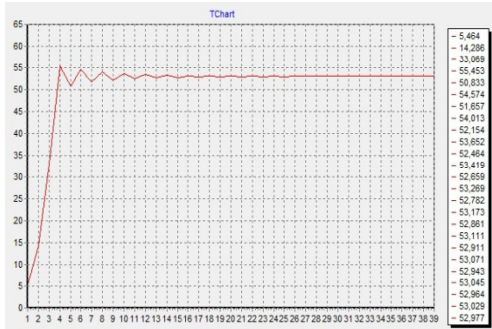


Рис. 3. Логістична крива при стійкій динаміці.

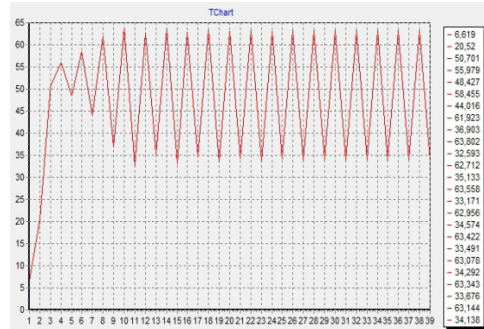


Рис. 4. Логістична крива при можливій втраті стійкості.

Окрім дослідження якісних характеристик динаміки стійкості популяції, важливим є визначення їх кількісної оцінки. На нашу думку, одним із підходів розв’язку поставленого завдання є перехід від аналізу стану системи до аналізу її фазового портрету. В результаті проведення комп’ютерного експерименту ми отримаємо значення множин віталітетного спектра *Ж-1*, *Ж-2*, *Ж-3*. Відклавши ці значення по вісі абсцис, наприклад, *Ж-2*, а по вісі ординат *Ж-1* у один і той самий модельний час, отримаємо зображення, яке представлено на рис. 5 і називається фазовим портретом. У даному випадку цей портрет відповідає логістичній кривій, яка представлена на рис. 3, а в теоретико-множинному варіанті в інтерпретації віталітетних груп *Ж-1* та *Ж-2* – на рис. 1. Ми бачимо, що на початковому етапі розвитку відбувається стрімке захоплення популяцією території, яке має нелінійний характер. У подальшому набуває чинності процес освоєння території, що на фазовому портреті представлено формуванням ділянки конденсації. Власне кількісна оцінка цієї ділянки дає числове значення, яке характеризує ступінь життєздатності популяції. У загальному випадку можна застосувати формулу (6), як у [1].

$$S = \int_{-\infty}^{\infty} l(t) dt = \int_a^b f(t) dt, \tag{6}$$

де  $[a, b]$  – інтервал проєкції області конденсації, а  $y=f(t)$  – графік неперервної функції, яка оконтурює цю область. Характер функції  $y$  може мати складний вигляд.

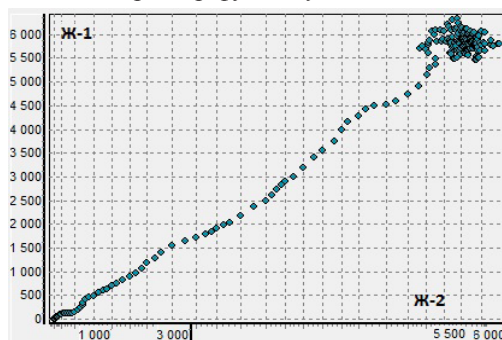


Рис. 5. Фазовий портрет динаміки *Ж-1*, *Ж-2*.

Отже, чим більше значення величини  $S$ , тим менша життєздатність популяції. У частковому випадку, коли ділянка конденсації покривається функцією виду

$$S = \pi r^2,$$

де  $r$  – радіус кола, визначений з формули  $\min_r (x^2 + y^2 \leq r^2)$ ,  $x \in \mathcal{J}-1$ ,  $y \in \mathcal{J}-2$ , ми можемо кількісно оцінити життєздатність популяційного розвитку.

Таким чином, необхідною та достатньою передумовою втрати життєздатності популяції є збіг зовнішніх і внутрішніх чинників. До перших належать випас, косовиця, збирання ягід, виривання та витоптування рослин, до других – збіг життєвих станів по всіх групах життєвості. Застосовуючи метод комп’ютерного експерименту, можна побудувати фазовий портрет динаміки популяції та визначити чисельну характеристику життєздатності розвитку популяції й оцінити її стан. Отримані результати можуть бути використані при плануванні та проведенні природоохоронних заходів для запобігання колапсичним ефектам у розвитку популяцій трав’яних рослин.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Берс Л. Математический анализ. М.: Высшая школа, 1975. Т. II. 519 с.
2. Гиссовський В. Б. Модель динаміки розвитку експлерентів на основі аналізу їхнього віталітетного спектра // Матеріали міжнар. наук. конф., присвяченої 50-річчю функціонування високогірного біологічного стаціонару «Пожижевська» (Львів-Пожижевська, 2008). С. 86–87.
3. Гиссовський В. Б. Аналіз динаміки віталітетного спектру трав’яних рослин засобами візуального комп’ютерного моделювання // Наукові основи збереження біотичної різноманітності, 2010. Т. 1(8). № 1. С. 53–67.
4. Гиссовський В. Б. Мультиагентные системы, как инструментарий построения визуальных имитационных моделей популяций травянистых // Принципы и способы сохранения биоразнообразия: Материалы IV Всерос. науч. конф. (Йошкар-Ола, 22–26 сентября 2010 г.). Йошкар-Ола, 2010. С. 1130–1134.
5. Жиляев Г. Г. Жизнеспособность популяций растений. Львів: НАН України, Інститут Екології Карпат, 2005. 450 с.
6. Карери Дж. Порядок и беспорядок в структуре материи. М.: Мир, 1985. 229 с.
7. Царик Й. В. Найімовірніші фактори загрози існуванню біосистем високогір’я Українських Карпат // Наук. зап. НТШ. Екологічний зб. – 4. Львів: Вид-во НТШ, 2008. Т. XXI-ІІ. С. 258–263.
8. Царик Й., Жиляев Г., Кияк В. та ін. Життєздатність популяцій рослин високогір’я Українських Карпат / За ред. Й. Царика. Львів: Меркатор, 2009. 172 с.
9. Cetnarowicz K., Nawarecki E., Zabinska M. M-Agent Architecture and its Application to the Agent Oriented Technology // Proc. of the DAIMAS’97. “International workshop Distributed Artificial Intelligence and Multi-Agent Systems”. St. Petersburg, Russia. 1997. P. 1022–1024.

Стаття: надійшла до редакції 28.03.12

доопрацьована 05.06.12

прийнята до друку 11.06.12

**PRECONDITIONS FOR LOSS OF VIABILITY OF POPULATION  
DEVELOPMENT OF HERBAL PLANTS****V. Gissofsky**

*Institute of Ecology of the Carpathians of NAS of Ukraine  
4, Kozelnytska St., Lviv 79026, Ukraine  
e-mail: gnovina@gmail.com*

This work presents visual computer simulation model of a plant population. The model uses tools of multiagent systems located on a plane based on analysis of viability of populations. The article describes serials of statements which provides the appearance of a preconditions for loss of viability of population development of herbal plants.

*Keywords:* viability, plant population, visual simulation, multiagent systems, loss of viability.

**ПРЕДПОСЫЛКИ ПОТЕРИ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ ПОПУЛЯЦИЙ РАСТЕНИЙ****В. Гиссовский**

*Институт экологии Карпат НАН Украины  
ул. Козельницкая, 4, Львов 79026, Украина  
e-mail: gnovina@gmail.com*

В работе представлена компьютерная модель популяции травяных растений, учитывающая их жизнеспособность и базирующаяся на принципах мультиагентных систем. Исследования динамики виталитетного спектра травянистых растений дают возможность установить как качественные, так и количественные критерии потери свойств жизнеспособности популяций растений.

*Ключевые слова:* жизнеспособность, популяции травяных растений, компьютерная модель, критерии потери свойств жизнеспособности.

## ОСЕЛИЩА ДЕЯКИХ ПРЕДСТАВНИКІВ РОДИНИ FORMICIDAE У РІВНИННІЙ ЧАСТИНІ ЗАХОДУ УКРАЇНИ

І. Царик

*Інститут екології Карпат НАН України  
вул. Козельницька, 4, Львів 79026, Україна  
e-mail: itsaryk@yahoo.com*

Вказаний видовий склад мірмекокомплексів лучних природних і антропогеннозмінених оселищ рівнинної частини Заходу України. Встановлено, що для природних оселищ притаманний більш різноманітний видовий склад мурашок, на відміну від антропогеннозмінених. Зроблено висновок щодо доцільності охорони як природних, так і антропогеннозмінених оселищ.

*Ключові слова:* Formicidae, мірмекокомплекс, оселище, лучні системи, антропогенна трансформація.

Збереження біотичного різноманіття можливе за умови вивчення поширення, приуроченості, особливостей функціонування біотичних систем у певних умовах середовища. Як складова частина біотичного різноманіття на особливу увагу заслуговують соціальні групи комах, зокрема представники родини Formicidae, які є важливими компонентами гетеротрофних блоків майже всіх наземних екосистем Землі, крім полярних регіонів [4, 8, 9].

Мурашки (Formicidae) беруть активну участь у ґрунтових процесах, є облігатними консортами багатьох автотрофно-детермінантних консорцій, а зміна структури та функціонування їхніх мірмекокомплексів вказує на процеси, які відбуваються в характерних для них екосистемах [5, 7, 10].

Слід вказати, що даних про систематичну різноманітність, а також про оселищну приуроченість мурашок в Україні, а особливо в західній її частині, є обмаль. Власне це й зумовило підготовку даної роботи з надією на поштовх у вивченні приуроченості окремих видів Formicidae до характерних типів оселищ.

Під терміном “оселище” ми розуміємо ділянки земної або водної поверхні, які визначаються географічними, кліматичними й біологічними ознаками та забезпечують можливість існування видів рослин і тварин та їх сукупностей. Конкретний тип оселища забезпечує особливі умови “проживання” для конкретної, чітко визначеної сукупності видів [6].

Метою нашої роботи було дослідити різноманіття представників Formicidae в деяких оселищах рівнинної частини Заходу України.

### Матеріал та методика

Матеріалом для написання цієї статті послужили дані про систематичну різноманітність і приуроченість представників родини Formicidae до окремих оселищ, що були отримані нами впродовж 2010–2011 рр.

Дослідження були проведені на кількох дослідних ділянках.

*Перша дослідна ділянка – урочище “Парипси” (околиці смт Немаїрів Яворівського р-ну Львівської обл.). Вона розташована в західній частині Українського Розточчя і становить масив сухих і пустищних лук із фрагментами насаджень сосни європейської (Pinus sylvestris L.) на слабозвинутих піщаних ґрунтах. Дослідна ділянка лежить на периферії великого безлісного масиву вододільної частини пасма Розточчя. Її ми відносимо до типу*

псамофітних остепнено- і пустишно-лучних оселищ, для яких характерні рослинні угруповання класу *Koelerio-Corynephorethea* Klika in Klika et Novak 1941 та *Nardo-Callunetea* Prsg 1949 у поєднанні з ксеротермною рослинністю екотонів (клас *Trifolio-Geranietea sanguinei* Th. Müller 1962) і ксерофільними рудеральними ценозами (клас *Artemisietea vulgaris* Lohm., Prsg et R. Tx. in R. Tx. 1950) [11].

Друга дослідна ділянка – “Лиса Гора” (пам’ятка природи “Гора Лиса” і гора “Ситуха” розташовані в околиці с. Вільшаниця Золочівського р-ну Львівської обл.). Вона представлена одним із найкраще збережених фрагментів лучно-степової рослинності Гологоро-Вороняцького пасма. Тут на стрімких схилах зовнішнього краю пасма з дерново-карбонатними ґрунтами формується характерний фізіономічний аспект різнотравно-злаково-низькоосокового лучного степу з фрагментарним покривом із чагарників – куртин терену (*Prunus spinosa* L.), шипшини (*Rosa* sp.), глоду (*Crataegus* sp.) та сосни європейської (*Pinus sylvestris*). Згідно з класифікацією рослинних угруповань, ця ділянка належить до типу кальцефітних лучно-степових і остепнено-лучних біотопів, які формують рослинні угруповання класу *Festuco-Brometea* Br.-Bl. et R. Tx. 1943 в поєднанні з рослинністю ксеротермних лісостепових екотонів (клас *Trifolio-Geranietea sanguinei*) [11].

Третя дослідна ділянка – урочище “Записочне” (околиці озера Пісочне Шацького р-ну Волинської обл.). Ця ділянка є перелогом, який вже довгий час використовується під випас худоби (корів). Травостій сформований оліготрофними ксерофітами, а зокрема *Verbascum thapsus* L., *V. nigrum* L., *Anchusa officinalis* L., *Elytrigia repens* (L.) Nevski, *Rumex acetosella* L., *Helichrysum arenarium* (L.) Moench, *Sedum acre* L., *Convolvulus arvensis* L., *Corynephorus canescens* (L.) Beauv., *Hypericum perforatum* L., *Potentilla argentea* L. (угруповання класу *Koelerio-Corynephorethea*).

Четверта дослідна ділянка – “Звенигород” (околиці с. Звенигород Пустомитівського р-ну Львівської обл.). Ця ділянка характеризується мезофільно-рудеральною рослинністю класу *Artemisietea vulgaris*. Типовими видами рослин є: *Daucus carota* L., *Centaurea jacea* L., *Equisetum arvense* L., *E. pratense* L., *Artemisia vulgaris* L., *Dactylis glomerata* L., *Elytrigia repens*, *Vicia cracca* L., *Melilotus officinalis* (L.) Pall., *M. albus* Medik., *Trifolium repens* L., *T. pratense* L. Ділянка належить до закинутих перелогів Грядового Побужжя та Давидівського пасма, де випас тварин здійснюється спорадично.

Встановлено, що вибрані нами для вивчення Formicidae ділянки належать до тих типів оселищ, які потребують охорони. Зокрема, це стосується: ділянок “Парипси” – класифікаційний код 6210 (4) (для степів і остепнених лук), “Лиса гора” – 6210 (1) (напівприродні лучні степи, остепнені луки й чагарникові зарості), “Записочне” – 2330 (континентальні дюни з незімкненим угрупованням *Corynephorus*) і “Звенигород” – 6510 (низинні викошувані луки) [6].

Під час дослідження Formicidae були використані загальноприйняті мірмекологічні методики [1–3].

### Результати і їхнє обговорення

На дослідній ділянці “Лиса гора” серед представників Formicidae переважає *Lasius niger* Linnaeus, 1758. Особини цього виду є надзвичайно невибагливими до вибору місця для гніздування, завдяки високій здатності пристосовуватися до найрізноманітніших умов існування. На закинутих орних площах цей вид домінує над усіма іншими, й коли не перешкоджати його поширенню, то за незначний період (2–5 роки) він захоплює площу, яка може досягти десятків гектарів. Часто також трапляється *Lasius flavus* Fabricius, 1782 – геобіонт-трофобіонт, особини якого поширені на відкритих просторах, живиться переважно за рахунок попелиць. Стосовно цих двох видів *Lasius*, то домінантне положення займає

*L. niger*: Так, на площі у 50 м<sup>2</sup> гнізда *L. niger* трапляються з частотою 60%, *L. flavus* – 40%. Наступною групою мурашок є група видів роду *Formica*, а саме ті види, які мають здатність охороняти кормову ділянку. Зокрема, це стосується *Formica cunicularia* Latreille 1798 – теплолюбний вид, його особини будують земляні купини над гніздами, можуть заселяти мезофітні стації, ксерофітні й остепнені ділянки. Вони уникають незадернованих піщаних ділянок, а в живильних уподобаннях надають перевагу полюванню на комах. Порівняно з *F. cunicularia* часто трапляється *Formica fusca* Linnaeus, 1758. Ця мурашка надає перевагу затіненим біотопам, зокрема екотонним ділянкам. *Formica pratensis* Retzius, 1783 заселяє остепнені ділянки, де буде невеликі гнізда. Цей вид не є активним хижаком, надає перевагу мертвій здобичі, а також досить охоче споживає виділення попелиць.

У процентному співвідношенні за чисельністю гнізд на площі 50 м<sup>2</sup> спостерігається такий розподіл: *F. cunicularia* – 60%, *F. fusca* – 30% і *F. pratensis* – 10%. Очевидним домінантом у цьому міркеоугрупованні є *F. cunicularia*.

На цій же пробній площі виявлений також *Tetramorium caespitum* Linnaeus, 1758 – найбільш масовий вид, завдяки здатності утворювати дифузні гнізда. Упродовж літа можна спостерігати процес пошуку колонами однієї сім'ї місць для закладання нових гнізд.

На екотонній ділянці виявлений *Camponotus vagus* Scopoli, 1763. Особини цього виду на схилах горбів роблять нори в землі та під камінням. Особливо цікавою є знахідка *Messor structor* Latreille, 1798. Ця мурашка гніздиться в землі, а на поверхні ґрунту є лише отвір, оточений кратеруватим валом із винесеної землі та фрагментів нанесених сухих плодів і насіння злаків (*Festuca* та ін.).

Сформований на цій ділянці міркеокомплекс діє злагоджено, що впливає на біоценоз в цілому, і в той же час має пристосувальний характер як до природних трансформаційних процесів (заростання лісовими видами), так і до антропогенного навантаження досліджуваного оселища.

Ділянка “Парипси” характеризується таким видовим складом Formicidae: *L. niger*; *L. flavus*, *T. caespitum*, *F. cunicularia*, *Formica cinerea* Mayr, 1853, *Formica rufa* Linnaeus, 1761, *Myrmica rugulosa* Nylander, 1849, *Myrmica schencki* Emery, 1895, *Solenopsis fugax* Latreille, 1798. Серед виявлених видів найбільш активним хижаком є *F. rufa*. Гніздо особин цього виду було виявлене на узліссі. *F. cinerea* будує гнізда під землею, не формуючи надземних надбудов. Сім'ї мурашок цього виду формують великі громади, які складаються з багатьох гнізд, між якими існують комунікаційні дороги. Перевагу у живленні особини цього виду надають екскрементам попелиць. *S. fugax* – мурашка-паразит, яка поселяється поруч з гніздами інших видів мурашок. Робочі особини соленопсиса проривають тонкі ходи між камерами виду-хазяїна і викрадають яйця та личинки, які потім використовують як поживу для своїх личинок. Сім'ї соленопсиса є дуже численними. *M. rugulosa* – стратобіонт, який пристосовується до різних умов існування, формує підземні гнізда із зовнішніми отворами, біля яких є невеличка купка винесеної землі. *M. schencki* – хортобіонт, помірний ксерофіл, який будує гнізда у ґрунті на відкритих територіях. Переважно в одну асоціацію *Myrmica* входять види, які належать до різних життєвих форм і яким властиві різні системи фуражування.

На основі видового складу мурашок проаналізованих вище двох дослідних ділянок можна зробити припущення, що екологічні умови оселищ є подібними.

Наступні дві ділянки, де вивчали видовий склад мурашок, – це **закинуті перелог**и Грядового Побужжя та Давидівського пасма “Звенигород” і старооранка “Записочне” Шацького національного природного парку.

Ділянка “Звенигород” за видовим складом Formicidae представлена *L. niger*, *L. flavus*, *F. cunicularia*, *S. fugax* і *Myrmica rubra* Linnaeus, 1758. *M. rubra* – хортобіонт, є досить

звичайною земляною мурашкою, що будує гнізда без явних горбиків, а також може поселятися в мертвій деревині. У живленні надає перевагу дрібним членистоногим, як живим, так і мертвим, а також розводить попелиць.

Небагатий видовий склад мурашок, виявлений на цій ділянці, вказує на те, що на закинутих землях відбуваються вторинні сукцесійні процеси, які ще не завершилися, і в кінцевому результаті ці землі трансформуються у напівприродні (трохи змінені людиною). На цій ділянці частота виявлення гнізд-мурашників різних видів у процентах така: *S. fugax* – 45%, *L. niger* – 23%, *L. flavus* – 22%, *F. cunicularia* – 2%, *M. rubra* – 8%. Можна зробити припущення, що в міру подальших сукцесійних змін на цій ділянці процентне співвідношення мурашників, як і кількість їх видів, будуть іншими.

На дослідній ділянці ”Запісочне” було встановлено такий видовий склад Formicidae: *F. cinerea*, *F. fusca*, *T. caespitum* (утворює федерацію, 10 гнізд на 10 м<sup>2</sup>), *L. niger*, *Lasius fuliginosus* Latreille, 1798, *M. rubra*. Цікавим є явище співіснування на відносно малій площі 10 м<sup>2</sup> трьох видів, а саме *F. fusca* (3 гнізда), *L. niger* (9 гнізд), *F. cinerea* (2 гнізда). У процентному співвідношенні за кількістю гнізд на дослідній ділянці переважають *T. caespitum* – 45%, *L. niger* – 25%, *F. cinerea* – 20%, *F. fusca* – 5%, *M. rubra* – 5%.

Аналіз видового багатства угруповань мурашок на досліджуваних ділянках вказує на вищі його значення в урочищі ”Парипси” та на ”Лисій Горі”, які можна вважати природними малотрансформованими ділянками, порівняно з відчутно нижчими показниками з ділянок ”Звенигород” і ”Запісочне”, які є закинутими орними землями і перебувають на певних етапах вторинних сукцесійних змін. Єдиним видом, особини якого трапляються на усіх ділянках, незалежно від рівня їхньої трансформації, був *L. niger*. У той же час *M. rubra* був притаманний лише трансформованим ділянкам.

Отже, у природних і порушених умовах мурашки формують угруповання, які є стабільними завдяки постійній координації дій та міцності зв'язків між ними, і таким чином можуть слугувати індикаторами змін екологічних умов оселищ. Одночасно зміни видового багатства мурашок вказують і на зміни міркеокомплексів та їхньої функціональної ролі у відповідних їм екосистемах.

На основі отриманих даних щодо видового різноманіття мурашок умовно природних і антропогенно трансформованих оселищ можна зробити висновок про необхідність їхньої охорони як осередків різноманіття мурашок.

Безумовно, при подальших дослідженнях будуть отримані більш фундаментальні дані щодо складу міркеокомплексів, їхньої індикаційної цінності, реакції на дію чинників різної природи походження.

Висловлюю щире подяку д.б.н., с.н.с. О. Г. Радченку (Інститут зоології НАНУ) за допомогу у визначенні зібраних під час дослідження видів мурашок.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Арнольди К. В. Зональные зоогеографические экологические особенности мирмекофауны и населения муравьев Русской равнины // Зоол. журн. 1968. Т. 47. Вып. 8. С. 1155–1178.
2. Длусский Г. М. Методы количественного учета почвообитающих муравьев // Зоол. журн. 1965. Т. 44. № 5. С. 716–727.
3. Длусский Г. М. Муравьи из рода Формика. М.: Наука, 1967. 236 с.
4. Захаров А. А. Муравьи как модельный объект изучения динамики биоразнообразия // Динамика разнообразия животного мира: Материалы Всерос. совещ. М.: ИПЭЭ РАН, 1997. С. 139–143.
5. Зрянин В. А. Влияние муравьев рода *Lasius* на почвы луговых биогеоценозов // Успехи современной биологии. 2003. Т. 123. № 3. С. 278–288.

6. Оселишна концепція збереження біорізноманіття: базові документи Європейського Союзу / Ред. О.О. Кагало, Б.Г. Проць. Львів: ЗУКЦ, 2012. 278 с.
7. Путьянина Т. С. Выбор стратегии фуражировки как механизм сосуществования видов (Hymenoptera, Formicidae) в многовидовой ассоциации муравьев // Зоол. журн. 2007. Т. 86. № 6. С. 701–708.
8. Радченко А. Г. Муравьи (Hymenoptera, Formicidae) Палеарктики (эволюция, систематика, фауногенез): автореф. дис. ... д-ра биол. наук. К., 1998. 47 с.
9. Резникова Ж. И. Межвидовые отношения у муравьев. Новосибирск: Наука, 1983. 206 с.
10. Царик І. Й. Значення соціальних комах (Formicidae) для збереження біоти антропогенно трансформованих екосистем // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2010. Вип. 54. С. 138–144.
11. Matuszkiewicz W. Przewodnik do oznaczania zbiorowisk roślinnych Polski. Warszawa: PWN. 1981. 300 s.

Стаття: надійшла до редакції 09.07.12

доопрацьована 20.09.12

прийнята до друку 21.09.12

## THE SPATIAL RESTRICTION OF SOME REPRESENTATIVES OF FAMILY FORMICIDAE IN THE HABITATS OF LOWLAND PART OF WESTERN UKRAINE

I. Tsaryk

*Institute of Ecology of the Carpathians, NAS of Ukraine  
4, Kozelnytska St., Lviv 79026, Ukraine  
e-mail: itsaryk@yahoo.com*

Species composition of ant communities in natural and human-transformed meadow habitats on the lowlands of Western Ukraine is shown. It is found out that natural habitats are characterized by more diverse species composition of ants compare to human-transformed ones. There is drawn a conclusion about the protection advisability of both natural and human transformed habitats.

*Keywords:* Formicidae, ant community, habitat, meadow systems, human transformation.

## ПРИУРОЧЕННОСТЬ НЕКОТОРЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ СЕМЕЙСТВА FORMICIDAE К МЕСТООБИТАНИЯМ В РАВНИННОЙ ЧАСТИ ЗАПАДНОЙ УКРАИНЫ

И. Царик

*Институт экологии Карпат НАН Украины  
ул. Козельницкая, 4, Львов 79026, Украина  
e-mail: itsaryk@yahoo.com*

Указан видовой состав мирмекокомплексов луговых естественных и антропогенноизмененных местообитаний равнинной части Западной Украины. Установлено, что для естественных местообитаний свойственен более разнообразный видовой состав муравьев, в отличие от антропогенноизмененных. Сделан вывод о целесообразности охраны как естественных, так и антропогенноизмененных местообитаний.

*Ключевые слова:* Formicidae, мирмекокомплекс, местообитание, луговые системы, антропогенная трансформация.



## ВПЛИВ КОМБІНАЦІЙ МЕЛІОРАНТІВ І ТЕРМІНІВ ЇХНЬОЇ ДІЇ НА ФІТОТОКСИЧНІСТЬ СУБСТРАТІВ ШАХТНИХ ХВОСТОСХОВИЩ КРИВОРІЖЖЯ

**В. Савосько**

*Криворізький педагогічний інститут ДВНЗ  
«Криворізький національний університет»  
пр. Гагаріна, 54, Кривий Ріг 50086, Україна  
e-mail: savosko@list.ru*

У лабораторних умовах вивчали вплив сумісної дії меліорантів крейди та Трилону Б, крейди та води на зміну фітотоксичності техногенних субстратів. Встановлено, що для детоксикації молодих хвостів більш перспективним є промивання водою та внесення крейди. У той же час, для лежалих хвостів доцільним є промивання розчином Трилону Б та внесення крейди при максимальних термінах їхньої попередньої дії.

*Ключові слова:* комбінована хімічна детоксикація, шахтні хвостосховища, кореневий індекс, Криворіжжя.

Оптимізація порушених і девастрованих земель є актуальною проблемою сучасних гірничих та гірничорудних регіонів [4, 7]. При цьому впровадження повноцінної рекультиваци гальмується фінансовими причинами та відсутністю достатньої кількості пухких гірських порід і родючих ґрунтів [4, 6, 9]. Тому вважається перспективним створення культурфітоценозів безпосередньо на техногенних субстратах. Однак у більшості випадків такі субстрати характеризуються високими рівнями фітотоксичності, що негативно впливає на ріст і розвиток рослин [7, 11, 12]. У зв'язку з цим так важлива розробка інноваційних технологій попередньої детоксикації субстратів девастрованих і порушених земель.

Незважаючи на численні публікації з проблем хімічної детоксикації забруднених земель, один важливий аспект цього питання залишився поза увагою наукової спільноти. Так, у більшості випадків обґрунтовуються заходи санації виключно природних ґрунтів [3, 8, 14]. У той же час оздоровлення субстратів порушених земель мінімально відображено в наукових публікаціях. Також слід відзначити, що до сих пір немає однозначної відповіді щодо безальтернативності використання того чи іншого меліоранта, їхньої комбінації, а також строків їхньої попередньої дії [4, 8, 14].

Серед техногенних ландшафтів Криворізького регіону особливе місце, з наукової точки зору, займають шахтні хвостосховища [7]. У 50-60-х роках минулого сторіччя майже при кожному залізрудному руднику були збудовані Польові збагачувальні фабрики (ПЗФ). Робота цих фабрик зумовила утворення відходів збагачення (хвостів) і будівництво гідротехнічних споруд для їхнього збереження – хвостосховищ. Однак після початку експлуатації потужних гірничозбагачувальних комбінатів робота ПЗФ була припинена, а їхні хвостосховища були залишені поза увагою без проведення рекультивацийних робіт. У подальшому вони були частково знищені (внаслідок повторного використання їх території або потрапляння до зони обвалення), а частково залишилися та самозаростають. Із цих причин шахтні хвостосховища Криворіжжя – це унікальні наукові полігони з дослідження регенерації екосистем і розробки інноваційних технологій оптимізації порушених земель.

**Мета роботи** – встановити ефективність хімічної детоксикації субстратів шахтних хвостосховищ Криворіжжя залежно від комбінації меліорантів і термінів їх дії.

#### **Матеріали та методи**

Об'єктами дослідження були субстрати хвостосховищ шахт ім. Леніна та ім. Артема. Зразки субстратів відбирали методом конверта з поверхневого шару 0–20 см на ділянках із типовими еколого-едафічними умовами [10].

Хімічну детоксикацію субстратів проводили в умовах модельного експерименту за програмою: 1) внесення меліорантів; 2) попередня дія меліорантів; 3) оцінка фітотоксичності субстратів. Як меліоранти використовували: водогінну воду (застосована кількість відповідає польовій нормі 10, 20, 30 м<sup>3</sup>/га), 0,0001 н розчин Трилону Б (10, 20, 30 м<sup>3</sup>/га), крейду (1, 3, 5 т/1 га). Меліоранти застосовували в комбінаціях: Крейда–вода, Крейда–Трилон Б. Спочатку до субстратів додавали крейду та ретельно перемішували до отримання однорідної суміші. Після цього вносили розчини і також перемішували. Контрольні зразки зрошували водою до рівня повної польової вологи. Дослідні та контрольні зразки для з'ясування ефекту попередньої дії меліорантів витримували в лабораторних умовах 14, 28, 56 днів.

Оцінку токсичності субстратів проводили методом прямого фітотестування [2, 13]. Для цього зразки переносили у чашки Петрі, змочували дистильованою водою до отримання «водного дзеркала» та накривали фільтрувальним папером. Як тест-об'єкт використовували люцерну посівну (*Medicago sativa* L.) сорту «Надія». Насіння попередньо замочували при температурі +27–28°C. У подальшому проростки переносили на фільтрувальний папір і вирощували при природному рівні освітленості й температурі +25°C. На сьому добу вимірювали приріст головного кореня [1]. На основі отриманих результатів розраховували кореневий індекс (КІ) [15] і проводили статистичну обробку даних на 95% рівні значимості [5].

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

За архівними даними хвостосховище шахти ім. Леніна активно експлуатували до середини 60-х років минулого сторіччя та використовували виключно для складування відходів. У наш час на території хвостосховища утворився спонтанний рослинний покрив. Едафотопи хвостосховища шахти ім. Леніна характеризуються [11, 12]: відсутністю гумусового шару; лужною реакцією (рН<sub>H2O</sub> – 7,5–7,8, рН<sub>KCl</sub> – 7,8–8,0); несформованістю ґрунтового вбірного комплексу (сума обмінних основ – 6–8 мг – екв/100 г ґрунту).

Аналіз результатів лабораторного моделювання показав, що меліоранти позитивно впливають на морфометричні показники тест-об'єктів (табл. 1).

Встановлено, що при мінімальних строках дії меліорантів (14 днів) найбільш ефективною виявилася комбінація меліорантів «Крейда–вода». Відзначену закономірність підтверджують статистично значима відмінність довжини головного кореня порівняно з контролем, а також показники кореневих індексів. При середніх термінах дії меліорантів (28 днів) також у всіх варіантах дослідження виявлений статистично достовірний ефект детоксикації. Порівняння числових значень кореневих індексів показало, що комбінація меліорантів «Крейда–вода» та «Крейда–Трилон Б» характеризується приблизно однаковим впливом на зменшення рівнів фітотоксичності субстратів хвостосховища шахти ім. Артема.

Отримані результати проведення модельних дослідів показують, що максимальний вплив комбінацій меліорантів на детоксикацію субстратів має місце за умов найбільших строків їхньої попередньої дії. Так, показники КІ при 56 днях попередньої дії меліорантів на 8–12% вищі за КІ при 14 і 28 днях. Також слід відзначити, що в даному випадку

найбільший вплив на фітотоксичність субстратів хвостосховища ім. Леніна був виявлений при дії комбінації меліорантів «Крейда–Трилон Б» – КІ=1,24.

Таблиця 1

Вплив комбінацій меліорантів і термінів їхньої дії на фітотоксичність субстратів хвостосховища шахти ім. Леніна

Меліорант і норма застосування			Терміни дії, дні	Довжина головного кореня, мм					КІ
Крейда	Вода	Трилон Б		Min	Max	M	m	V%	
	Контроль			19	42	18	1,02	21,32	–
1 т/га	10 м <sup>3</sup> /га	–		22	42	31,52	0,86	15,64	1,15*
3 т/га	20 м <sup>3</sup> /га	–		17	40	31,91	0,91	16,36	1,16*
5 т/га	30 м <sup>3</sup> /га	–	14	21	47	33,33	1,05	18,12	1,21*
1 т/га	–	10 м <sup>3</sup> /га		19	42	28,45	0,95	19,16	1,04
3 т/га	–	20 м <sup>3</sup> /га		17	55	30,15	1,08	20,60	1,10
5 т/га	–	30 м <sup>3</sup> /га		20	52	33,30	1,21	20,81	1,21*
	Контроль			21	35	17	0,77	18,45	–
1 т/га	10 м <sup>3</sup> /га	–		20	37	27,45	0,60	12,60	1,15*
3 т/га	20 м <sup>3</sup> /га	–		21	38	28,27	0,74	15,10	1,19*
5 т/га	30 м <sup>3</sup> /га	–	28	21	42	28,79	0,89	17,75	1,21*
1 т/га	–	10 м <sup>3</sup> /га		20	35	27,21	0,70	14,74	1,14*
3 т/га	–	20 м <sup>3</sup> /га		21	44	28,88	1,01	20,12	1,21*
5 т/га	–	30 м <sup>3</sup> /га		23	39	29,15	0,73	14,48	1,22*
	Контроль			20	39	14	0,93	21,54	–
1 т/га	10 м <sup>3</sup> /га	–		21	37	29,09	0,73	14,37	1,17*
3 т/га	20 м <sup>3</sup> /га	–		22	39	29,73	0,80	15,37	1,20*
5 т/га	30 м <sup>3</sup> /га	–	56	18	41	30,18	0,76	14,51	1,22*
1 т/га	–	10 м <sup>3</sup> /га		21	39	28,97	0,66	13,01	1,17*
3 т/га	–	20 м <sup>3</sup> /га		19	41	30,73	0,89	16,56	1,24*
5 т/га	–	30 м <sup>3</sup> /га		25	38	30,82	0,62	11,62	1,24*

**Примітка.** Min – мінімальне значення вибірки, Max – максимальне значення вибірки, M – середнє арифметичне, m – абсолютна похибка, V% – коефіцієнт варіації, КІ – кореневий індекс, \* – відмінність з контролем статистично значима (P<0,05).

Проведені кореляційні розрахунки підтвердили наявність зв'язку між ефективністю детоксикації субстратів хвостосховища шахти ім. Леніна та нормами меліорантів і термінів їхньої попередньої дії (табл. 2). Знаки коефіцієнтів кореляції ( $r>0$ ) вказують на наявність у всіх варіантах дослідів прямого зв'язку, тобто при збільшенні показників застосування меліорантів значення кореневих індексів зростало. Слід відзначити, що лише у трьох випадках виявлено сильний зв'язок ( $0,7<|r|<0,9$ ), а в інших випадках зв'язок може бути оцінений як дуже сильний ( $|r|>0,9$ ). Отримані в результаті розрахунків рівняння регресії статистично значимо описують залежність між ефектом детоксикації та комбінаціями і умовами дії меліорантів, про що свідчать встановлені коефіцієнти детермінації. Так, показники кореневого індексу на 83–98% обумовлюються нормами меліорантів і на 77–98% терміном їх дії. Тому розроблені нами еколого-математичні моделі можуть бути використані у практичній діяльності.

За літературними даними, хвостосховище шахти ім. Артема почало діяти з кінця 50-х років ХХ ст. та перебувало в активній експлуатації до початку 90-х років того ж сторіччя. Слід відзначити, що територія цього хвостосховища використовувалася у двох напрямках: як місце накопичення не лише відходів збагачування, а й також і високомінералізованих шахтних вод [7]. Як наслідок, субстрати хвостосховища шахти ім. Артема характеризуються максимально несприятливими для рослин фізико-хімічними властивостями [12]: відсутністю гумусового шару; дуже лужною реакцією ( $pH_{H_2O} - 7,5-7,8$ ,  $pH_{KCl} - 7,8-8,0$ ); несформованим ґрунтово-вбирним комплексом (сума обмінних основ – 6–8 мг-екв/100 г ґрунту).

Таблиця 2

Еколого-математична модель залежності ефективності детоксикації субстратів хвостосховища шахти ім. Леніна від норми внесення меліорантів і термінів їх дії

Комбінація меліорантів	Умови дії меліорантів	Кореляційний аналіз		Регресійний аналіз		
		r	P	Рівняння регресії	D	P
Модель системи «Кореневий індекс (Y)–норма меліорантів (X)»						
Крейда–вода	14 днів	0,93	<0,001	$Y = 1,1285 + 0,1500 \cdot X$	0,86	<0,05
	28 днів	0,98	<0,001	$Y = 1,1382 + 0,1500 \cdot X$	0,96	<0,001
	56 днів	0,99	<0,001	$Y = 1,1591 + 0,0125 \cdot X$	0,98	<0,001
Крейда–Трилон Б	14 днів	0,97	<0,001	$Y = 0,9829 + 0,04635 \cdot X$	0,94	<0,001
	28 днів	0,91	<0,001	$Y = 1,1300 + 0,0200 \cdot X$	0,83	<0,05
	56 днів	0,91	<0,001	$Y = 1,1592 + 0,0175 \cdot X$	0,83	<0,05
Модель системи «Кореневий індекс (Y)–строк інкубації меліорантів (X)»						
Крейда–вода	мінімальна норма	0,95	<0,001	$Y = 1,1400 + 0,00051 \cdot X$	0,90	<0,001
	середня норма	0,89	<0,05	$Y = 1,1550 + 0,00087 \cdot X$	0,79	<0,05
	максимальна норма	0,95	<0,001	$Y = 1,2050 + 0,00026 \cdot X$	0,90	<0,001
Крейда–Трилон Б	мінімальна норма	0,88	<0,05	$Y = 1,0250 + 0,00281 \cdot X$	0,77	<0,05
	середня норма	0,87	<0,05	$Y = 1,0850 + 0,00301 \cdot X$	0,76	<0,05
	максимальна норма	0,99	<0,001	$Y = 1,2100 + 0,00071 \cdot X$	0,98	<0,001

**Примітки:** r – коефіцієнт кореляції, D – коефіцієнт детермінації, P – статистична значущість.

Результати досліджень свідчать, що застосовані нами меліоранти (комбінації, норми й терміни їхньої дії) зумовлюють зменшення рівнів фітотоксичності субстратів хвостосховища шахти ім. Артема (табл. 3). Так, протягом 14 днів попередньої дії меліорантів значення корневих індексів було в межах 1,10–1,33. При цьому, за винятком одного варіанта дослідів (комбінація «Крейда–Трилон Б» мінімальна норма), довжина головного кореня статистично достовірно відмінна щодо контролю. Також слід відзначити, що комбінація «Крейда–вода» виявилася більш ефективною порівняно з парою меліорантів «Крейда–Трилон Б». Так, кореневі індекси у варіантах дослідів першої пари меліорантів на 5–13% вищі, ніж у варіантах дослідів другої пари меліорантів.

Збільшення термінів попередньої дії меліорантів до 28 днів не виявило істотних змін у загальній тенденції зменшення фітотоксичності шахтних субстратів: для всіх варіантів дослідів був встановлений статистично достовірний позитивний ефект. Однак мали місце певні тактичні зміни: порівняно з мінімальним терміном інкубації ефект детоксикації комбінації «Крейда–вода» зменшився, а комбінації «Крейда–Трилон Б» – збільшився. Незважаючи на це, перша пара меліорантів є більш перспективною, ніж друга. Наведену думку підтверджують числові значення корневих індексів.

Аналіз отриманих даних показав, що при максимальних термінах попередньої дії меліорантів (56 днів) виявлені загальні й тактичні закономірності детоксикації шахтного хвостосховища, аналогічні тим, що були встановлені для варіантів дослідів з 24 днями дії. Тобто для всіх варіантів дослідів спостерігали зменшення фітотоксичності субстратів, а комбінація «Крейда–вода» є більш ефективною, ніж «Крейда–Трилон Б». Відзначена закономірність може бути зумовлена рядом причин, одна з яких – відносний вік хвостів. Як нами раніше відзначалося, хвостосховище шахти ім. Артема діяло до початку 90-х років ХХ ст. Тому його хвости є більш молодими, порівняно зі субстратами хвостосховища ім. Леніна. Ось чому для детоксикації таких хвостів більш актуальним є «м'який варіант»: мінімальний термін попередньої дії комбінації «Крейда–вода».

Результати кореляційного аналізу показали (табл. 4), що в модельному досліді з детоксикації субстратів хвостосховища шахти ім. Артема між корневими індексами та нормами меліорантів і термінами їхньої попередньої дії статистично достовірними є 11 коефіцієнтів кореляції (при 12 теоретично можливих). При цьому в 10 випадках коефіцієнти

кореляції вказують на наявність прямого зв'язку ( $r > 0$ ). Лише в одному випадку, навпаки, має місце зворотний кореляційний зв'язок ( $r < 0$ ). Оцінюючи силу кореляційного зв'язку, слід відзначити, що в шести випадках виявлено сильний зв'язок ( $0,7 < |r| < 0,9$ ), а у п'яти – дуже сильний ( $|r| > 0,9$ ). Враховуючи коефіцієнти кореляції та детермінації, слід зазначити, що найбільш практично важливим регресійним рівнянням є те, що було розраховане для системи «Кореневий індекс – норма меліорантів» (комбінація «Крейда–вода» мінімальний термін дії).

Таблиця 3

Вплив комбінацій меліорантів і термінів їхньої дії  
на фітотоксичність субстратів хвостосховища шахти ім. Артема

Крейда	Меліорант		Термін дії, дні	Довжина головного кореня, мм					КІ
	Вода	Трилон Б		Мін	Мах	М	m	V%	
	Контроль			16	36	24,91	0,94	21,76	–
1 т/га	10 м <sup>3</sup> /га	–		17	42	28,33	0,89	18,07	1,14*
3 т/га	20 м <sup>3</sup> /га	–		21	46	32,18	1,07	19,08	1,29*
5 т/га	30 м <sup>3</sup> /га	–	14	20	45	33,12	1,03	17,78	1,33*
1 т/га	–	10 м <sup>3</sup> /га		16	37	27,52	0,87	18,17	1,10
3 т/га	–	20 м <sup>3</sup> /га		20	47	29,15	1,04	20,51	1,17*
5 т/га	–	30 м <sup>3</sup> /га		18	39	29,49	1,05	20,41	1,18*
	Контроль			15	36	22,82	0,89	22,48	–
1 т/га	10 м <sup>3</sup> /га	–		18	36	26,33	0,78	17,09	1,15*
3 т/га	20 м <sup>3</sup> /га	–		21	43	28,85	0,99	19,72	1,26*
5 т/га	30 м <sup>3</sup> /га	–	28	22	36	28,33	0,64	13,06	1,24*
1 т/га	–	10 м <sup>3</sup> /га		18	38	26,09	0,65	14,33	1,14*
3 т/га	–	20 м <sup>3</sup> /га		18	36	27,00	0,72	15,26	1,18*
5 т/га	–	30 м <sup>3</sup> /га		21	42	27,79	0,85	17,49	1,22*
	Контроль			16	26	21,58	0,42	11,21	–
1 т/га	10 м <sup>3</sup> /га	–		14	35	24,73	0,92	21,39	1,15*
3 т/га	20 м <sup>3</sup> /га	–		21	37	27,09	0,71	15,02	1,26*
5 т/га	30 м <sup>3</sup> /га	–	56	18	38	27,91	0,87	17,99	1,29*
1 т/га	–	10 м <sup>3</sup> /га		18	34	24,55	0,80	18,66	1,14*
3 т/га	–	20 м <sup>3</sup> /га		16	37	25,36	0,88	19,91	1,18*
5 т/га	–	30 м <sup>3</sup> /га		17	36	26,33	0,95	20,70	1,22*

**Примітка.** Мін – мінімальне значення вибірки, Мах – максимальне значення вибірки, М – середнє арифметичне, m – абсолютна похибка, V% – коефіцієнт варіації, КІ – кореневий індекс, \* – відмінність з контролем статистично значима ( $P < 0,05$ ).

Таблиця 4

Еколого-математична модель залежності ефективності детоксикації субстратів  
хвостосховища шахти ім. Артема від норми внесення меліорантів і термінів їх дії

Комбінація меліорантів	Умови дії меліорантів	Кореляційний аналіз		Регресійний аналіз		
		r	P	Рівняння регресії	D	P
Модель системи «Кореневий індекс (Y)–норма меліорантів (X)»						
Крейда–вода	14 днів	0,95	<0,001	$Y = 1,1108 + 0,475 * X$	0,90	<0,001
	28 днів	0,85	<0,05	$Y = 1,1417 + 0,025 * X$	0,72	<0,05
	56 днів	0,95	<0,001	$Y = 1,1283 + 0,035 * X$	0,90	<0,05
Крейда–Трилон Б	14 днів	0,92	<0,001	$Y = 1,0900 + 0,002 * X$	0,85	<0,05
	28 днів	0,99	<0,001	$Y = 0,1200 + 0,021 * X$	0,98	<0,001
	56 днів	0,99	<0,001	$Y = 0,1210 + 0,020 * X$	0,98	<0,001
Модель системи «Кореневий індекс (Y)–строк інкубації меліорантів (X)»						
Крейда–вода	мінімальна норма	0,76	<0,05	$Y = 1,1400 + 0,0002 * X$	0,58	<0,05
	середня норма	-0,76	<0,05	$Y = 1,2900 + 0,0006 * X$	0,58	<0,05
	максимальна норма	-0,27	>0,01	$Y = 1,3050 - 0,0006 * X$	0,07	>0,01
Крейда–Трилон Б	мінімальна норма	0,76	<0,05	$Y = 1,1000 + 0,00082 * X$	0,58	<0,05
	середня норма	0,76	<0,05	$Y = 1,1700 + 0,0002 * X$	0,58	<0,05
	максимальна норма	0,76	<0,05	$Y = 1,1800 + 0,00082 * X$	0,58	<0,05

**Примітки:** r – коефіцієнт кореляції, D – коефіцієнт детермінації, P – статистична значущість.

Таким чином, запропоновані нами комбінації, норми і терміни попередньої дії меліорантів зумовлюють статистично достовірне зменшення рівнів фітотоксичності субстратів шахтних хвостосховищ Криворіжжя.

Отже, ефект детоксикації залежить від відносного віку хвостів. Так, для молодих хвостів (таких, що лежать на денній поверхні до 25 років) перспективним є використання «м'якого» варіанта оздоровлення: комбінація меліорантів «Крейда–вода» при мінімальних термінах їхньої попередньої дії. У той час, як для лежалих хвостів (термін перебування яких на денній поверхні перевищує 25 років) більш важливим є застосування «суворого» варіанта санації: комбінація меліорантів «Крейда–Трилон Б» при максимальних термінах їх інкубації.

Отримані результати, на нашу думку, можуть бути використані при розробці технології оптимізації дегазованих і порушених земель. Позитивний ефект таких заходів може бути збільшений за рахунок попередньої детоксикації субстратів таких земель. У подальших дослідженнях доцільно перевірити результати лабораторного моделювання безпосередньо в польових умовах.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Гавриленко Д. Ф., Ладьгіна М. Е., Хандобина Л. П.* Большой практикум по физиологии растений. М.: Высш. школа, 1975. С. 392.
2. *Гродзинский А. М.* Аллелопатия растений и почвоутомление. К.: Наук. думка, 1991. 430 с.
3. *Егорова Е. В.* Эколого-биологическая оценка мелиорантов для детоксикации почв, загрязненных тяжелыми металлами // Проблемы агрохимии и экологии. 2010. № 1. С. 55–62.
4. *Кучерявий В. П.* Фітомеліорація: навч. посібн. Львів: Світ, 2003. 540 с.
5. *Лакін Г. Ф.* Биометрия. М.: Высшая школа, 1990. 352 с.
6. *Мазур А. Е.* Создание травянистых фитоценозов на эдафотопках отвалов угольных шахт Донбасса: автореф. дис. ... канд. биол. наук 03.00.16. Днепропетровск, 1981. 26 с.
7. *Малахов І. М.* Техногенез у геологічному середовищі. Кривий Ріг: Октант-Принт, 2003. 252 с.
8. *Минкина Т. М., Мотузова Г. В., Назаренко О. Г.* и др. Влияние различных мелиорантов на подвижность цинка и свинца в загрязненном черноземе // Агрохимия. 2007. № 10. С. 67–75.
9. *Панас Р. Н.* Агроэкологические основы рекультивации земель. Львов: Світ, 1989. 160 с.
10. Практикум по почвоведению / под ред. И.С. Кауричева. М.: Агропромиздат, 1986. 246 с.
11. *Савосько В. М.* Оцінка фітотоксичності субстратів шахтних хвостосховищ Криворіжжя // Промышленная ботаника. 2011. Вып. 11. С. 19–25.
12. *Савосько В. М., Невядомский М. А., Кудрявая П. Ю.* Физико-химические свойства субстратов шахтных хвостохранилищ Кривбасса // Питання біоіндикації та екології. Запоріжжя: ЗНУ, 2010. Вип. 15. № 1. С. 88–97.
13. *Терек О. І.* Ріст рослин: навч. посібник. Львів: Вид. центр ЛНУ ім. І. Франка, 2007. 247 с.
14. *Харитонов М. М.* Эффективность детоксикации загрязненных тяжелыми металлами грунтов за допомогою мінералів // Вісн. держ. аграрного ун-ту. 2004. № 2. С. 32.
15. *Wilkins D. A.* The measurement of tolerance to edaphic factors by means of root growth // New Phytol. 1978. Vol. 80. N 3. P. 623–633.

---

Стаття: надійшла до редакції 27.08.12

доопрацьована 14.09.12

прийнята до друку 18.09.12

## THE EFFECT OF COMBINATIONS RECLAMATION AND THEIR PERIOD OF INCUBATION ON PHYTOTOXICITY SUBSTRATES MINE TAILING IN KRYVYI RIH ORE MINING REGION

**B. Savosko**

*Kryvyi Rih Educational Institute SHEO "National University of Kryvyi Rih"  
54, Gagarin Ave., Kryvyi Rih 50086, Ukraine  
e-mail: savosko@list.ru*

In laboratory experiments studied the effect of the combined action of chalk and Trilon B, chalk and water to change the phytotoxicity of man-made substrates. Found that for the detoxification of fresh tailings is a promising irrigation water and make chalk. At the same time, it is advisable for the stale tailings washing with a solution of Trilon B and chalk making at the highest terms of their previous actions.

*Keywords:* combined chemical detoxification, mine tailings, the root index, Kryvyi Rih ore mining region.

## ВЛИЯНИЕ КОМБИНАЦИЙ МЕЛИОРАНТОВ И СРОКОВ ИХ ДЕЙСТВИЯ НА ФИТОТОКСИЧНОСТЬ СУБСТРАТОВ ШАХТНЫХ ХВОСТОХРАНИЛИЩ КРИВОРОЖЬЯ

**В. Савосько**

*Криворожский педагогический институт ГВУЗ «Криворожский  
национальный университет»  
пр. Гагарина, 54, Кривой Рог 50086, Украина  
e-mail: savosko@list.ru*

В лабораторных условиях изучали влияние совместного действия мела и трилона Б, мела и воды на изменение фитотоксичности техногенных субстратов. Установлено, что для детоксикации свежих хвостов более перспективным является промывание водой и внесения мела. В то же время, для лежалых хвостов целесообразно промывание раствором трилона Б и внесения мела при максимальных сроках их предыдущего действия.

*Ключевые слова:* комбинированная химическая детоксикация, шахтные хвостохранилища, корневой индекс, Криворожье.

## ПАЗАРИТАРНА СИСТЕМА: ЇЇ ЕКОЛОГІЧНА СУТНІСТЬ

**Н. Волошина**

*Національний педагогічний університет імені М.П. Драгоманова  
вул. Пирогова, 9, Київ 01601, Україна  
e-mail: VoloshynaN@rambler.ru*

У статті подано коротку характеристику паразитарних систем. Проаналізовано особливості їх функціонування в умовах антропогенно трансформованих екосистем та формування особливої форми біологічного забруднення – паразитарного, яке супроводжується зростанням ролі людини як хазяїна паразита і поширенням інвазійних хвороб. Боротьба з паразитогами на сучасному етапі базується на законах екології, епідеміології та новітніх наукових уявленнях про сутність процесів у системі «паразит-хазяїн», які нерозривно пов'язані з популяцією людини і суспільством загалом.

*Ключові слова:* паразитарна система, антропогенно трансформована екосистема, паразитарне забруднення.

Останнім часом проблеми екології та охорони навколишнього природного середовища набули особливого значення і актуальності. Дестабілізуючий вплив діяльності людини на довкілля, який потужно проявився у ХХ ст., зумовив незворотні зміни в структурно-функціональній організації водних і наземних екосистем. Зокрема, такі зміни стосуються систем типу «паразит-хазяїн», екології збудників інвазійних хвороб, результатом яких є зростання інвазованості хазяїв, забруднення довкілля пропативними стадіями паразитів і загострення паразитарної ситуації на окремих територіях [21].

Екологічному підходу до вивчення явища паразитизму тривалий час не приділялася належна увага, хоча для вирішення низку теоретичних і практичних завдань паразитології найбільш важливими є саме екологічні ознаки паразитарної системи – здатність виникати й існувати у різних біоценозах природного або штучного середовища [15, 18]. Сьогодні, в умовах глобальної трансформації навколишнього середовища різко порушуються структура та функції еволюційно сформованих паразитарних систем, виникають нові закономірності їхнього існування, змінюються екологічні властивості компонентів паразитоценозу, епідемічна і епізоотична значущість паразитів й інші актуальні аспекти, які вивчає сучасна екологічна паразитологія.

Паразитарна система – структурна одиниця, яка характеризує особливий тип екологічних систем. Це складно організована стійка саморегульована структура, що об'єднує сукупність паразитів, які заселяють організми людини, тварин або рослин і характеризуються певними векторами та певною швидкістю їх змін, залежно від факторів середовища існування [21].

Введення в обіг еколого-паразитологічних досліджень терміна «паразитарна система» створило необхідність досконалого вивчення її структурної та функціональної організації, класифікації, цілісності, стійкості, мінливості, впорядкованості й інших, ще не розкритих аспектів вивчення явища паразитизму в цілому і його місця в біосфері [20].

Конструкція паразитарної системи містить набір абіотичних і біотичних складових як основних системоутворювальних елементів, між якими виникають набори зв'язків різної екологічної природи (гостальні, трофічні, фізичні, хімічні та ін.). Ключову позицію в них займають паразитичні організми, яким притаманні морфологічні й екологічні



адаптації, що дають змогу утворювати просторово-часові й інформаційні зв'язки з вільно-існуючими особинами та іншими елементами системи. Властивістю паразитарних систем є структурно-функціональна неоднозначність їх організації та закономірна (від простого до складного) ієрархічна підпорядкованість рівнів. Утворюючи складний комплекс у структурі біогеоценозу паразитарні системи ускладнюють організацію природних екосистем і є їх обов'язковими структурними елементами [2, 15, 21].

**Концепція паразитарної системи** є ключовою в сучасній екологічній паразитології. Поняття паразитарної системи вперше було проаналізоване німецьким паразитологом Є. Мартіні в 1931 р. при вивченні епідемічного процесу трансмісивних хвороб [26]. Вчення про паразитарні системи як структурну одиницю і особливий тип екологічних систем заклали В. Н. Беклемишев у 1945 р., визначивши її як популяцію паразита разом з усіма популяціями хазяїв. Він вважав, що паразитарна система належить до поняття популяції паразита, а не до поняття виду, при цьому популяція паразита визначалася не лише локальними, пов'язаними з хазяїном його життєвими стадіями, але й пропативними. Враховуючи різноманітність паразитів і їхні взаємовідносини з хазяями, а також багатофункціональність паразитизму в природних процесах, цим дослідником було закладено основи системного підходу до аналізу паразитарних систем і запропоновано їхню класифікацію на основі аналізу структури їхніх життєвих циклів (прості, складні дво- і тричленні, а також множинні типи паразитарних систем). Системоутворюючим чинником В. Н. Беклемишев визначив кількість видів хазяїв, необхідних для проходження паразитом його життєвого циклу [6].

Ідеї вченого, в основу яких покладено популяційний і біогеоценотичний аспекти паразитарних систем, знайшли широке визнання і подальший розвиток у роботах інших науковців: Ю. С. Балашова, А. І. Грановича, А. А. Добровольського, В. А. Ройтман, Е. П. Ієшко та ін. [3, 11, 13, 14, 21].

На сьогодні вчення про паразитарні системи має біологічне та епідеміологічне трактування і тривалу історію їхнього вивчення.

**Епідеміологічні аспекти** розуміння вчення про паразитарні системи були розвинуті в роботах В. Н. Беклемишева, Л. В. Громашевського, В. Д. Беякова, Г. П. Краснощокі та інших вчених [5, 8, 12, 16]. Вони визначали паразитарну систему як структурний елемент епідемічного (епізоотичного) процесу. Незалежно від життєвого циклу паразита, завжди має місце інфікування (інвазування) хазяїна, тобто перебіг інфекційного процесу. За твердженням Б. Л. Черкаського (1986), на всіх рівнях організації інфекційного процесу виявляються закономірності, які лише частково відображають інфекційний або епідемічний процеси, і їхнє вивчення неможливе без порівняння між собою [23].

Фундаментальні дослідження механізмів епідемічного й епізоотичного процесів, їх реалізація в популяції людини та домашніх тварин, накопичення і аналіз наукових та практичних даних дали змогу визначити епідеміологічну значущість паразитарних систем і сформулювати **вчення про природну вогнещевість трансмісивних хвороб** [19].

**Біологічні аспекти** вчення паразитарних систем базуються на уявленнях про рівні організації (переважно популяційний та екосистемний). Системний підхід в аналізі їхньої структури і функцій почали застосовувати пізніше, однак ці ідеї також належать В. Н. Беклемишеву [4]. Необхідність паралельного вивчення взаємовідносин у системі «паразит-хазяїн» на індивідуальному, популяційному та екосистемному рівнях почали розвивати наприкінці ХХ ст. у своїх працях А. П. Маркевич, А. І. Гранович, А. А. Добровольський, Е. П. Ієшко та інші вчені. Ці праці не втратили своєї актуальності до сьогодні [11, 13, 14, 17].

З екологічних позицій паразитарні системи різних рівнів є відкритими, циклічними біологічними системами, компоненти яких пов'язані між собою різними типами зв'язків, що забезпечують їхню складність, цілісність і функціонування в діапазоні умов довкілля. Універсальною властивістю паразитарних систем є їхня здатність до саморегуляції [15, 21].

Стійкість паразитарної системи, тобто її здатність протидіяти зовнішнім впливам, зберігаючи при цьому свою структуру і характер функціонування, є еволюційно набутою властивістю, яка забезпечується такими факторами:

- 1) структурно–ієрархічні рівні організації живого як цілісного явища: організмий, популяційний, екосистемний;
- 2) гнучкість паразитарної системи, або екологічна пластичність паразита, здатного до формування паразито-хазяїнних взаємовідносин різних типів та до змін у разі необхідності;
- 3) гетерогенність популяцій паразита і хазяїна та їх коадаптація;
- 4) резервація паразита (паратенічний паразитизм) забезпечує збереження паразитарної системи в несприятливих умовах;
- 5) полігостальність паразита створює можливість для його активної циркуляції в різних екосистемах і в умовах високої чисельності й різноманітності хазяїв [15, 21, 25].

**Теорія саморегуляції паразитарних систем акад. В. Д. Белякова** стала одним із важливих загальнобіологічних узагальнень другої половини ХХ ст. у галузі медицини та ветеринарії. Вона базується на здатності збудника до мінливості, яка настає у різних фазах епідемічного процесу. Популяції, які не здатні до адаптивних змін під впливом екологічних чинників, приречені на загибель. Зниження вірулентності збудника, зростання його стійкості до хіміотерапевтичних препаратів, забруднення навколишнього середовища відображають здатність паразитарної системи до саморегулювання і забезпечують збереження збудника у природі як виду, а іноді активізують епідемічний процес у нових умовах.

**Основні принципи цієї теорії:**

- гено- та фенотипова неоднорідність популяції паразита проявляється у властивості окремих циркулюючих видів різних біологічних властивостей (вірулентності, імуногенності, патогенності, резистентності та ін.), водночас неоднорідність популяції хазяїна проявляється у варіабельності сприйнятливості до хвороби у окремих особин;
- динамічна взаємодія і мінливість системи «паразит-хазяїн» під впливом один одного;
- динаміка епідемічного процесу в часі складається з таких фаз: резервації збудника; становлення епідемічного штаму; розповсюдження епідемічного процесу [7].

**Сучасна теоретико-системна концепція структурно-функціональної організації паразитарних систем** базується на уявленні про гомеостаз і сутність паразито-хазяїнних взаємовідносин, в основі яких лежить взаємодія патогенного впливу паразита і механізму захисту організму хазяїна. Її автор Е. А. Черникова пропонує розглядати паразитарну систему не з морфологічної точки зору, а як елементи системи, елементарні причинно-наслідкові зв'язки якої мають ключове значення для функціонування системи, тобто власне патогенез хвороби [24].

Формування і функціонування паразитарних систем перебувають у процесі постійних трансформацій. Водночас у природних і антропогенно змінених екосистемах закономірності процесів в системі «паразит-хазяїн» значно різняться.

У локальних, історично сформованих біогеоценозах зі своїми хазяями паразити пов'язані еволюційно налагодженими паразито-хазяїнними взаємовідносинами, де паразит і хазяїн виступають як елементи стійкої та стабільної структури, кількісні зміни складових якої відновлюються за рахунок саморегуляції [21].

У сучасних умовах дедалі частіше реєструють вплив антропогенного чинника на природні процеси, що нерозривно пов'язано зі зміною біотичного різноманіття і екологічного статусу паразитичних організмів як невід'ємного компонента біоти. У спрощених або штучних біогеоценозах, до яких належать урбанізовані території великих міст, виникають глобальні деструкційні зміни у структурі та функціонуванні екосистем. Штучні екосистеми, створені людиною, поєднують у собі екологічні та соціальні компоненти, які характеризуються розірваністю трофічних ланцюгів, що створює умови для масового розмноження окремих видів організмів. Порушення екологічної рівноваги паразитарних систем в умовах антропогенно трансформованого середовища супроводжується дестабілізуючим впливом середовища як на самих паразитів, так і на всіх їхніх хазяїв і супроводжується процесами паразитарних експансії, експресії та сукцесії [9, 21].

*Причинами порушення балансу в паразитарній системі є наслідки діяльності людини:*

- 1) урбанізація та формування мегаполісів;
- 2) зростання чисельності специфічних і неспецифічних хазяїв паразита;
- 3) зміна взаємовідносин між паразитом і хазяїном унаслідок погіршення санітарних умов, посилення міграційних потоків, посилення антропогенного навантаження на біоценози та інших чинників;
- 4) комплекс чинників, пов'язаних з інтенсифікацією виробництва і споживання різноманітних продуктів харчування та питної води;
- 5) зміна форм господарювання при одночасному зниженні рівня санітарного, ветеринарного і фітосанітарного контролю;
- 6) соціально-психологічні чинники – недовіра державних цільових і соціальних програм, спрямованих на захист населення, домашніх тварин і рослин від збудників паразитарних хвороб, відсутність спеціально відведених територій для вихову домашніх тварин, культури прибирання тваринних екскрементів, доступ домашніх та диких тварин до смітників, місць торгівлі продуктами харчування, недостатня кількість і низька ефективність функціонування притулків для безпритульних тварин.

За таких умов на певних територіях окремі види паразитів набувають епідемічного та епізоотичного значення, виникають нові раніше не зафіксовані на даній території хвороби, змінюються шляхи їх передачі, якісний склад хазяїв, до яких паразит адаптований у процесі коєволюції.

В антропогенно трансформованому середовищі паразитарне забруднення доцільніше аналізувати з позиції *соціо-екосистемної концепції*, запропонованої Б. Л. Черкаським (1988). Автор пропонував розглядати структуру взаємовідносин між паразитом і людиною як одним із хазяїв, з урахуванням соціальних особливостей розвитку суспільства. Застосовуючи системний підхід для аналізу існування, відтворення і розповсюдження збудників інвазії серед населення було запропоновано розглядати епідемічний процес як соціально-екологічну систему, основним структурним компонентом якої є паразитарна система (паразит-переносник-хазяїн). Ця система утворена двома ієрархіями: соціогеосистемою, до складу якої входять екосистемні рівні організації паразитарної системи, та ієрархією інфекційних процесів [1, 23].

Окремі науковці вважають перспективність розвитку даної концепції для формування якісно нового рівня оцінки і контролю стану паразитарних систем на сучасному історичному етапі з використанням теорії системного аналізу.

Сутність *концепції паразитарного забруднення довкілля* полягає в сумарному ефекті антропоічного й антропогенного впливів на природу, що проявляється в інвазуванні людини, тварин і рослин та забрудненні середовища їхнього існування пропативними стадіями паразитів у межах, що значно перевищують природний фон. Роль людини у процесах паразитарного забруднення необхідно оцінювати з двох позицій: 1) як хазяїна паразитів у більшості паразитарних систем; 2) антропоічного й антропогенного впливів, у результаті яких відбуваються структурно-функціональні зміни на всіх рівнях організації паразитарної системи. Закономірність формування паразитарного забруднення середовища в урбанізованих екосистемах була розкрита колективом авторів і запатентована у 1994 р. Міжнародною Асоціацією Авторів Наукових Відкриттів. Сутність відкриття полягає в тому, що паразитарне забруднення проявляється лише в урбанізованих екосистемах під впливом комплексу антропогенних та соціально-економічних чинників і характеризується певними закономірностями функціонування, в основі яких лежать трансформація еволюційно сформованих механізмів регуляції паразитарних систем та зміна напруженості епідемічних та епізоотичних процесів за паразитозів [20–22].

Наслідками надзвичайних ситуацій природного, техногенного і конфліктного характерів, соціально-економічними змінами й іншими чинниками, в тому числі глобального масштабу, є втручання у функціонування паразитарних систем потужних антропогенних чинників, наслідками яких є активізація місцевих вогнищ природних інфекцій, підвищення патогенності паразитів з одного боку і зниження стійкості хазяїв – з іншого. Водночас самі паразити вже можуть виступати як індикатори загального забруднення навколишнього середовища.

Формування специфічних паразитарних систем, які майже не обмежені природними механізмами саморегуляції, реально загрожують здоров'ю людини і домашніх тварин та завдають значних економічних збитків сільському господарству країни. Така ситуація потребує свідомого і цілеспрямованого контролю з боку людини. Ефективне вирішення проблеми профілактики паразитарного забруднення, першочерговим серед яких є мінімізація поширення соціально небезпечних паразитів, має бути зорієнтоване на вивчення питань, пов'язаних зі структурно-функціональною організацією паразитарних систем в умовах антропогенно трансформованого середовища та впровадження сучасної стратегії охорони довкілля від паразитарного забруднення [10].

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Антоненко А. Д. Формирование отечественных концепций эпидемиологии в целях обеспечения эпидемиологической безопасности населения // Вестн. Ставрополь. ун-та. 2005. № 42. С. 133–139.
2. Астафьев Б. А., Яроцкий Л. С., Лебедева М. Н. Экспериментальные модели паразитозов в биологии и медицине. М.: Наука, 1989. 279 с.
3. Балашов Ю. С. Значение идей Н.В. Беклемишева о паразитарных системах и жизненных циклах в развитии паразитологии // Паразитология. 1991. Т. 25. Вып. 3. С. 185–195.
4. Беклемишев В. Н. Биоценологические основы сравнительной паразитологии. М.: Наука, 1970. 446 с.
5. Беклемишев В. Н. Возбудители болезней как члены биоценозов // Зоол. журн. 1956. Т. 35. Вып. 12. С. 1765–1779.

6. *Беклемишев В. Н.* О принципах сравнительной паразитологии в применении к кровососущим членистоногим // *Мед. паразитология.* 1945. Т.14. №1. С. 4–11.
7. *Беляков В. Д., Голубев Д. Б., Каминский Г. Д.* и др. Саморегуляция паразитарных систем. Л.: Медицина, 1987. 240 с.
8. *Беляков В. Д.* Проблема саморегуляции паразитарных систем и механизм развития эпидемического процесса // *Вестн. АМН СССР.* 1983. № 5. С 3–9.
9. *Волошина Н. О.* Екологічні аспекти профілактики паразитарного забруднення на антропогенно трансформованих територіях (на прикладі нематод): автореф. дис. ... д-ра біол. наук: 03.00.16. Чернівці, 2011. 40 с.
10. *Волошина Н. О.* Стратегія еколого-раціонального контролю паразитарного забруднення // *Наук. доп. НУБіП України.* 2012. № 2 (31): Режим доступу до журналу: <http://www.nbu.gov.ua/e-journals/Nd/2012-2/12vno.pdf>.
11. *Гранович А. И.* Паразитарные системы и структура популяций паразитических организмов // *Паразитология.* 1996. Т. 30. № 4. С. 343–356.
12. *Громашевский Л. В.* Механизм передачи инфекции. К.: Госмедиздат УССР, 1962, 446 с.
13. *Добровольский А. А., Евланов И. А., Шульман С. С.* Паразитарные системы: анализ структуры и стратегии, определяющие их устойчивость. Экологическая паразитология. Петрозаводск: Карельский науч. центр РАН, 1994. С. 5–45.
14. *Иешко Е. П.* Паразитарные системы и пространственная структура популяции гельминтов рыб // *Экологическая паразитология.* Петрозаводск: Карельский науч. центр РАН, 1994. С.178–190.
15. *Кеннеди К.* Экологическая паразитология. М.: Мир, 1978. 230 с.
16. *Краснощеков Г. П.* Паразитарная система: среда обитания и особенности адаптации паразитов. Тольятти. 1996. 50 с.
17. *Маркевич А. П.* Паразитология: становление, предмет, теоретические основы и задачи // *Паразитология: теоретические и прикладные проблемы.* К.: Наук. думка, 1985. С. 16–47.
18. *Одум Ю.* Основы экологии. М.: Мир, 1975. 740 с.
19. *Павловский Е. Н.* О природной очаговости инфекционных и паразитарных болезней // *Вестн. АН СССР.* 1939. №10. С. 98–108.
20. *Ройтман В. А., Беэр С. А.* Паразитарные системы: понятия, концепции, структуры, свойства, функции в экосистемах // *Успехи общ. паразитологии.* Тр. ИНПА РАН. М.: Наука, 2008. С. 273–319.
21. *Ройтман В. А., Беэр С. А.* Паразитизм как форма симбиотических отношений. М.: РАН, 2008. 310 с.
22. *Сонин М. Д., Беэр С. А., Ройтман В. А.* и др. Закономерность формирования паразитарного загрязнения среды в урбанизированных экосистемах // *Мед. паразитология и паразитарные болезни.* 2000. № 1. С. 7–11.
23. *Черкасский Б. Л.* Методологические основы социально-экологической концепции эпидемического процесса. Эпидемиологический процесс как социо-экологическая система. М.: ЦНИИЭ МЗ СССР, 1986. С. 3–10.
24. *Черникова Е. А.* Теоретико-системная концепция в изучении структурно-функциональной организации паразитарных систем. Интегративно-функциональный подход // *Ветеринарная патология.* 2004. № 4. С. 102–107.
25. *Шестопалов А. М.* Экологический полиморфизм и территориальная значимость различных вирусных патогенов: автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 06.02.02. Новосибирск, 2010. 40 с.
26. *Martini E.* *Der Biologie.* 1931/1932. 1 // Jg. Hft. 10. P. 225–228.

*Стаття: надійшла до редакції 02.07.12*

*доопрацьована 18.09.12*

*прийнята до друку 19.09.12*

## **PARASITIC SYSTEM: ITS ECOLOGICAL ESSENCE**

**N. Voloshyna**

*National Pedagogical Dragomanov University  
9, Pirogov St., Kiev 01601, Ukraine  
e-mail: VoloshynaN@rambler.ru*

The short characteristic of parasitic systems is stated in article. Features of their functioning in conditions anthropogenic transformation ecosystem and formation of a special form of biological pollution – parasitic one which is accompanied by increasing a role of the person as host of a parasite and emergence of invasion diseases are analysed. Parasites control at the present stage is based on laws of ecology, epidemiology and the latest scientific concepts about essence of processes in parasite-host system which are inseparably linked with a human population and society as a whole.

*Keywords:* parasitic system, anthropogenic transformation ecosystem, parasitic contamination.

## **ПАЗАРИТАРНАЯ СИСТЕМА: ЕЕ ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ СУЩНОСТЬ**

**Н. Волошина**

*Национальный педагогический университет имени М.П. Драгоманова  
ул. Пирогова, 9, Киев 01601, Украина  
e-mail: VoloshynaN@rambler.ru*

В статье изложена краткая характеристика паразитарных систем. Проанализированы особенности их функционирования в условиях антропогенно трансформированной экосистемы и формирования особой формы биологического загрязнения – паразитарного, которое сопровождается увеличением роли человека как хозяина паразита и возникновением инвазионных болезней. Борьба с паразитами на современном этапе базируется на законах экологии, эпидемиологии и на новейших научных понятиях о сущности процессов в системе «паразит-хозяин», которые неразрывно связаны с популяцией человека и общества в целом.

*Ключевые слова:* паразитарная система, антропогенно трансформированная экосистема, паразитарное загрязнение.

**ВПЛИВ ТРЕМАТОДНОЇ ІНВАЗІЇ ТА РІЗНИХ КОНЦЕНТРАЦІЙ СУЛЬГІНУ  
НА ВМІСТ ГЕМОГЛОБІНУ В ГЕМОЛІМФІ *PLANORBARIUS CORNEUS*  
(MOLLUSCA, GASTROPODA, PULMONATA, BULINIDAE)**

**А. Стадниченко**

*Житомирський державний університет імені Івана Франка  
вул. Велика Бердичівська, 40, Житомир 10008, Україна  
e-mail: stadnychenko@yandex.ru*

Досліджено особливості впливу трематоли *Haematolaechus similis* і різних концентрацій сульгину (0,02, 0,2, 2,0 мг/дм<sup>3</sup>) на вміст гемоглобіну в гемолімфі *Planorbarius corneus*. З'ясовано, що в усіх розчинах сульгину вміст гемоглобіну в гемолімфі незаражених *P. corneus* не змінюється. У інвазованих особин вміст гемоглобіну в їх внутрішньому середовищі у розчинах, які містять 0,02 і 0,2 мг/дм<sup>3</sup> сульгину, падає, натомість при 2 мг/дм<sup>3</sup> – різко зростає.

*Ключові слова:* *Planorbarius corneus*, *Haematolaechus similis*, гемоглобін, сульгін.

Сульгін – сульфаніламідний препарат, який застосовують у медицині при гострих інфекційних захворюваннях кишкового тракту.

Згідно з прийнятими наразі [6] нормами вмісту сульгину у відходах підприємств хімічної та фармацевтичної промисловості вміст його в них не повинен перевищувати 0,2 мг/дм<sup>3</sup>, а у водах санітарно-гігієнічного призначення – 0,01 мг/дм<sup>3</sup> (ГДК). У місцях скидання неочищених або недостатньо очищених виробничих відходів у природні води гідробіоти, що в них перебувають, піддаються дії цієї токсичної для них речовини. Особливо небезпечна ситуація складається там, де чимало видів тварин прив'язана у своєму поширенні до невеличких водойм астатичного типу, котрі утворюються внаслідок спадання високої води, після весняних або осінніх повеней. І об'єм води, і глибина таких тимчасових водойм незначні, тому вода в них швидко прогривається й інтенсивно випаровується, що спричиняє прогресуюче різке зростання в ній концентрації токсиканта – в кілька разів, а часом і на порядок або й більше. У частково пересихаючих водоймах, що містяться у заплавах рівнинних річок України, нерідко трапляються витушки рогові *Planorbarius corneus* (Linnaeus, 1758) – звичайні для України червононогі легеневі молюски. Відомо [1, 5], що на токсичний вплив середовища ці тварини відповідають зміною рівня їх загального метаболізму. Одним із показників, який дає змогу оцінити ступінь напруженості згаданого процесу, є інтенсивність споживання ними кисню. Про це можна судити за вмістом гемоглобіну (Hb) в їхній гемолімфі (рівень споживання кисню і вміст його у гемолімфі молюсків перебувають у обернено пропорційній залежності). Саме цим показником ми і скористалися при виконанні даного дослідження.

**Матеріали та методи**

**Метою дослідження** було з'ясувати характер впливу трьох різних концентрацій сульгину на вміст гемоглобіну в гемолімфі витушки рогової *P. corneus* у нормі і за зараження її трематодами. Відомості такого роду в науковій літературі відсутні. Наразі відомо лише те, що у вільних від інвазії витушок концентрація Hb в гемолімфі становить у середньому 1,3 г%, коливаючись у межах 1,1–1,92 г% [7, 8]. За наявності трематодної інвазії амплітуда коливання цього показника – 1,4–1,9 г% при середньому його значенні 1,6 г% [3, 8].

Матеріал: 219 екз. *P. corneus*, зібраних вручну в околицях Житомира в невеличких стоячих водоймах (хутір Затишшя) і в заплаві р. Гуйва (сел. Гуйва Житомирської обл.)

До лабораторії тварин транспортували партіями (15–20 екз.) в поліетиленових пакетах (без води). Враховуючи те, що будь-яким лабораторним дослідженням тварин має передувати аклімация їх до умов лабораторного утримання, здійснювали таку, як належить, протягом 15 діб. Молюсків утримували в ємностях об'ємом 3 л, заповнених дехлорованою відстоюванням (1 доба) водопровідною водою (рН 6,5–7,5, вміст кисню – 8,8–9,0 мгО<sub>2</sub>/л, температура – 19–21°C). Щільність посадки тварин – 3 екз./л. Щодоби воду заміняли.

Ставлячи токсикологічний дослід (тривалість його – 2 доби), ми використали ті ж самі ємності за такої самої щільності посадки в них молюсків. Розчини сульфгіну (4-*ami*-*no*-N-[*amino* (*imino*) methyl] benzenes ulfonamide – C<sub>7</sub>H<sub>10</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>S) концентрацією 0,02, 0,2 і 2,0 мг/дм<sup>3</sup> готували на дехлорованій воді. Через добу середовища заміняли свіжими. По закінченні експозиції молюсків піддавали повному знекровленню. Отриману при цьому гемолімфу використовували для встановлення в ній рівня вмісту Нб. Його визначали соляно-нокисло-гематиновим методом за Салі. Оскільки концентрація його в гемолімфі молюсків дуже низька, а кольорові еталони розраховані на показники вмісту Нб у крові хребетних, через що вони при дослідженні молюсків «не працюють», ми брали для аналізу втричі більший об'єм досліджуваного матеріалу, ніж це передбачено означеною вище методикою. В остаточному результаті наведено значення, отримані при відповідному перерахунку.

Зараженість *P. corneus* партенітами і церкаріями трематод встановлювали мікроскопіюванням тимчасових гістологічних препаратів, виготовлених із тканин їх гепатопанкреаса – звичайного місця оселення цих паразитів. Вміст Нб визначали лише у тих особин, у яких було виявлено партеніти і розповсюджувальні личинки (церкарії) «жаб'ячої» трематоди *Haematolaechus similis* Looss, 1899 (родина Plagiorchiidae).

Кількісні результати опрацьовано методами базової статистики [4]. У збиранні, транспортуванні, аклімации *P. corneus* взяла участь Т.П. Ющенко, за що висловлюємо їй щире подяку.

#### Результати і їхнє обговорення

З'ясовано, що у нормі (контрольна група *P. corneus*) вміст Нб у внутрішньому середовищі цих молюсків – їх гемолімфі становить 1,30±0,05 г%. Дуже близькі для цього значення знаходимо в роботах інших дослідників [10, 11]. Такого ж рівня є вони і в наших більш ранніх повідомленнях [7].

У тварин, інтенсивно інвазованих партенітами і церкаріями *H. similis*, концентрація Нб в гемолімфі статистично вірогідно (P>99,9%) вища (на 24%) (табл. 1) і коливається у межах 1,37–1,92 г%. Піднесення рівня вмісту Нб у гемолімфі заражених трематодами особин зумовлене, на нашу думку, значною інтенсивністю їх інвазії, за якої послаблюються захисно-приспосувальні властивості організму тварин-хазяїв. Це проявляється зниженням рівня інтенсивності загального обміну у молюсків, а відтак – зростанням концентрації Нб в їхньому внутрішньому середовищі. Варто відзначити, що така реакція на інвазію спостерігається лише тоді, коли у хазяїв трематод буває уражено цими паразитами не менше 50% об'єму гепатопанкреаса.

Результати токсикологічних досліджень свідчать про те, що усі використані в них концентрації сульфгін у *P. corneus* витримують без появи у них будь-яких видимих морфологічних зрушень. Тому можна стверджувати, що їхній стан відповідає тій стадії патологічного процесу, викликаного отруєнням, яку називають [8] «байдужістю» або стадією (фазою) байдужих концентрацій [2]. Про це переконливо свідчать дані табл. 1. Вони по-



казують, що зі збільшенням у середовищі концентрації сульфгину від 0,02 до 2,0 мг/дм<sup>3</sup> вміст Нб у гемолімфі інвазованих трематодами *P. corneus* залишається на рівні норми. Отже, за обговорюваним показником у них зберігається щодо вмісту Нб гомеостатична рівновага і залишається стабільним загальний обмін речовин.

Таблиця 1

Вплив різних концентрацій (мг/дм<sup>3</sup>) сульфгину на вміст Нб (г%) у гемолімфі *P. corneus* в нормі та в інвазованих трематоною *H. similis*

Інвазія	Контроль $x \pm m_x$ V	Концентрація сульфгину		
		0,02 $x \pm m_x$ V	0,2 $x \pm m_x$ V	2,0 $x \pm m_x$ V
Немає	1,30±0,05 26,92	1,22±0,07 36,07	1,15±0,13 61,74	1,36±0,04 19,81
Є	1,61±0,02 8,07	0,83±0,19 14,46	0,90±0,03 16,67	1,45±0,04 16,35

Інвазовані партенітами трематою *H. similis* особини, незважаючи на високу інтенсивність зараження, за 0,02 і 0,2 мг/дм<sup>3</sup> сульфгину в середовищі виявляються все ж таки здатними до задіювання компенсаційних процесів, які полягають, зрештою, у підвищенні рівня загального метаболізму. Про це можна судити за показником вмісту Нб в їхній гемолімфі. За 0,02 мг/дм<sup>3</sup> токсиканта в середовищі концентрація Нб падає порівняно з нормою майже наполовину, а за 0,2 мг/дм<sup>3</sup> – на 56%. Це однозначно свідчить про те, що за найменшої та середньої з використаних у токсикологічних експериментах концентрацій сульфгину інвазовані трематоною *H. similis* молоски протиставляють його шкодочинному впливові піднесення рівня загального обміну речовин. Відтак для заражених трематодами *P. corneus* особин стадія байдужих концентрацій повинна мати місце за перебування їх у розчинах, які містять менше 0,02 мг/дм<sup>3</sup> сульфгину. Розчини ж його з концентраціями 0,02 і 2,0 мг/дм<sup>3</sup> токсиканта викликають в організмі інвазованих тварин зрушення, що відповідають наступній стадії викликаного отруєнням *P. corneus* патологічного процесу – стадії стимуляції.

Сульфгін у концентрації 2,0 мг/дм<sup>3</sup> діє пригнічуюче на інвазованих трематодами *P. corneus*. Вміст Нб у їхній гемолімфі різко зростає: порівняно з особинами, підданими дії розчину, що містить 0,02 мг/дм<sup>3</sup> токсиканта, – в 1,75, а 0,2 мг/дм<sup>3</sup> – в 1,6 разу (P>99,9%). Очевидно, за наявності високої інтенсивності інвазії процеси декомпенсації у молосків заходять дуже далеко. Саме через це сульфгін у концентрації 2 мг/дм<sup>3</sup>, який виступає у ролі байдужого чинника для вільних від трематодної інвазії особин, у разі зараження їх цими паразитами викликає у них наступну стадію процесу отруєння – депресію.

Таблиця 2

Вживання (%) *P. corneus* у нормі та за інвазії трематоною *H. similis* під дією різних концентрацій сульфгину

Інвазія	Контроль	Концентрація сульфгину, мг/дм <sup>3</sup>		
		0,02	0,2	2,0
Немає	100	76,69	68,29	99,57
Є	100	71,23	61,48	44,26

Визначальну роль у зростанні концентрації Нб в гемолімфі, крім паразитарного чинника, відіграє ще один чинник – вплив токсичного середовища. Відомо [1, 5], що на дію затруєного середовища прісноводні безхребетні відповідають частковим або повним «перемиканням» аеробного обміну речовин на анаеробний. Це дає змогу цим тваринам, у тому числі і молоскам, при перебуванні в умовах дефіциту кисню зберігати життєздат-

ність протягом досить тривалого часу. У нашому досліді, гадаємо, зниження рівня вмісту Hb в гемолимфі *P. corneus* здійснюється не стільки за рахунок «перемикання» аеробного обміну на анаеробний, скільки за рахунок впливу паразитарного чинника. На користь цього припущення свідчить висока смертність інвазованих тварин (табл. 2).

Отже, за дії однакових значень токсичного середовища *P. corneus*, заражені партенітами і церкаріями *H. similis*, не здатні протидіяти йому такою мірою, як вільні від інвазії особини. Паразитарний чинник є обтяжуючою обставиною, котра прискорює розвиток у моллюсків декомпенсаційних процесів. Через це у заражених *P. corneus* такі процеси виявляють за нижчих концентрацій токсиканта, ніж у вільних від інвазії особин.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Биргер Т. И. Метаболизм водных беспозвоночных в токсической среде. К.: Наук. думка, 1979. 190 с.
2. Веселов Е. А. Основные фазы действия токсических веществ на гидробионтов // Тез. докл. Всесоюз. научн. конф. по вопр. водн. токсикологии (30 января – 2 февраля 1968 г.). М.: Наука, 1968. С. 15–16.
3. Киричук Г. Е., Стадниченко А. П. Влияние трематодной инвазии и ионов цинка водной среды на гемоциты и некоторые гематологические показатели *Planorbium purpuratum* (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata, Bulinidae) // Гидробиол. журн. 2010. Т. 46. № 5. С. 111–120.
4. Лакин Г. Ф. Биометрия. М.: Высш. шк., 1973. 343 с.
5. Маляревская А. Я. Биохимические механизмы адаптации гидробионтов к токсическим веществам // Гидробиол. журн. 1985. № 21. Вып. 3. С. 70–82.
6. Справочное пособие для выбора промышленных отходов. Л.: Химия, 1975. 456 с.
7. Стадниченко А. П., Иваненко Л. Д., Бургомистренко Л. Г. Изменение физико-химических свойств гемолимфы *Planorbium corneus* (Gastropoda, Pulmonata) при инвазии партенитами *Cotylurus cornutus* (Trematoda, Strigeidae) // Паразитология. 1980. Т. 14. Вып. 1. С. 66–70.
8. Строганов Н. С., Пожитков А. Т. Действие сточных промышленных вод на водные организмы (новые пути решения проблемы). М.: МГУ, 1941. 88 с.
9. Стадниченко А. П., Ющенко Т. П. Влияние растворов сульгина на содержание гемоглобина в гемолимфе роговых катушек в норме и при инвазии партенитами трематод // Деп. в УкрНИИТИ 09.04.91, № 478-Ук 91. 10 с.
10. Borden M. A. A study of the respiration and of the function of haemoglobin in *Planorbium corneus* and *Arenicola marina* // J. Mar. Biol. Assoc. U. K., 1931. Vol. 71. P. 709–738.
11. Leitch J. The function of haemoglobin in invertebrates with special referense to Planorbis // J. Physiol. 1976. P. 370–373.

Стаття: надійшла до редакції 09.07.12

прийнята до друку 10.09.12

**INFLUENCE OF A TREMATODOUS INFECTION AND VARIOUS  
CONCENTRATION SULGINUM ON THE CONTENT OF HAEMOGLOBIN  
AT *PLANORBARIUS CORNEUS* HAEMOLYMPH**

**A. Stadnychenko**

*Ivan Franko State University of Zhytomyr  
40, V. Berdychivska St., Zhytomyr 10008, Ukraine  
e-mail: stadnychenko@yandex.ru*

Peculiarities of influence of trematode *Haematolaechus similis* and various concentration sulginum (0,02; 0,2; 2,0 mg/dm<sup>3</sup>) on the content of haemoglobin in *Planorbarius corneus* haemolymph are investigated. It is found out that in all sulginum solutions the content of haemoglobin in a haemolymph of uninfected *Planorbarius corneus* doesn't change. It is investigated that in infected individuals the content of haemoglobin in their internal environment in solutions, which contain 0,02 and 0,2 mg/dm<sup>3</sup> sulginum, falls, and at 2,0 mg/dm<sup>3</sup> – sharply raises.

*Keywords: Planorbarius corneus, Haematolaechus similis, haemoglobin, sulginum.*

**ВЛИЯНИЕ ТРЕМАТОДНОЙ ИНВАЗИИ И РАЗЛИЧНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ  
СУЛЬГИНА НА СОДЕРЖАНИЕ ГЕМОГЛОБИНА В ГЕМОЛИМФЕ  
*PLANORBARIUS CORNEUS*  
(MOLLUSCA, GASTROPODA, PULMONATA, BULINIDAE)**

**A. Стадниченко**

*Житомирский государственный университет имени Ивана Франко  
ул. Большая Бердичевская, 40, Житомир 10008, Украина  
e-mail: stadnychenko@yandex.ru*

Исследованы особенности влияния трематоды *Haematolaechus similis* и различных концентраций сульгина (0,02, 0,2, 2,0 мг/дм<sup>3</sup>) на содержание гемоглобина в гемолимфе *Planorbarius corneus*. Выяснено, что во всех растворах сульгина содержание гемоглобина в гемолимфе незараженных *P. corneus* не меняется. У инвазированных особей содержание гемоглобина в их внутренней среде в растворах, содержащих 0,02 и 0,2 мг/дм<sup>3</sup> сульгина, падает, зато при 2 мг/дм<sup>3</sup> – резко возрастает.

*Ключевые слова: Planorbarius corneus, Haematolaechus similis, гемоглобин, сульгин.*

## ВМІСТ СПОЛУК НІТРОГЕНУ У ВОДІ МАЛИХ РІЧОК ЯК ПОКАЗНИК РІВНЯ АНТРОПОГЕННОГО НАВАНТАЖЕННЯ ТЕРИТОРІЙ

**І. Грюк, І. Суходольська**

*Тернопільський національний педагогічний університет  
імені Володимира Гнатюка  
вул. М. Кривоноса, 2, Тернопіль 46027, Україна  
e-mail: grjuk@inbox.ru*

Наведено результати дослідження динаміки вмісту нітрогену амонійного, нітритів, нітратів і їхнього співвідношення у воді малих річок із різним рівнем антропогенного навантаження Рівненського Полісся впродовж 2005–2010 рр. Показано, що рівень антропогенного навантаження змінює співвідношення в системі амоній-нітрити-нітрати в бік накопичення нітритів через прискорене перетворення амонію та гальмування окислювального перетворення нітритів у нітрати. Суттєвими факторами регуляції вмісту і трансформації неорганічних сполук Нітрогену є вміст розчиненого кисню та рН води, показники яких змінюються залежно від рівня антропогенного навантаження.

*Ключові слова:* нітрати, нітрити, нітроген амонійний, розчинений кисень, рН.

У зв'язку зі зростанням антропогенного навантаження на водойми особливо загострилася проблема якості води та водного середовища, що зумовлює необхідність з'ясування механізмів формування екотоксикологічних ситуацій у водних екосистемах з метою їх уникнення та подолання [3, 13, 14]. Значний інтерес при цьому становить кругообіг Нітрогену. Від кількісного та якісного складу нітрогеновмісних речовин залежать ступінь трофності й загальна продуктивність водойм, а також якість води в них [7, 14, 15]. Сполуки Нітрогену характеризуються високою біологічною активністю, беруть участь у метаболічних процесах гідробіонтів та істотно погіршують органолептичні властивості води [1, 13, 15, 19].

Головними джерелами нітратів у воді є органічні речовини, а також промислові та сільськогосподарські викиди [28]. Додаткова кількість нітратів потрапляє у воду з оксидами Нітрогену, що утворюються при грозових розрядах. Оскільки Нітроген є компонентом білків, при їх розкладанні також утворюються неорганічні нітрогеновмісні сполуки – аміак, нітрити і нітрати. Деяка кількість нітратів, що утворилися таким шляхом, вимивається водою, що просочується і досягає підземних вод, але велика частина нітратів, імовірно, використовується рослинами одразу ж після їх утворення бактеріями. Надлишок нітратів, що перевищує потребу рослин, вимивається водою.

Вміст нітратів, нітритів і нітрогену амонійного є важливими показниками хімічного складу води, що використовуються при проведенні екологічної оцінки та нормуванні якості природних вод [2, 21, 25]. Крім оцінки якості води, інформація про вміст у водоймах різних форм Нітрогену потрібна при вирішенні питань про баланс біогенних елементів, взаємозв'язок між процесами життєдіяльності водних організмів і хімічним складом води тощо [24, 25]. Тому дослідження стану забруднення малих річок  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$  та  $\text{NH}_4^+$  є актуальним і першочерговим завданням на шляху до відновлення стану водного середовища.

Метою дослідження є визначення динаміки вмісту нітратів, нітритів, нітрогену амонійного та їх співвідношення у поверхневих водах малих річок Рівненщини на територіях із різним рівнем антропогенного тиску.

### Матеріали та методи

Під час дослідження у Рівненській обл. було умовно виділено 4 типи територій, що відрізняються за рівнем антропогенного навантаження: рекреаційна, аграрна, урбанізована та техногенно трансформована.

З огляду на те, що до основних об'єктів природно-заповідного фонду Рівненщини належить Рівненський природний заповідник, який складається з чотирьох масивів, один із яких розташований у Рокитнівському р-ні, та регіональний ландшафтний парк «Прип'ять-Стохід», що розташований у Зарічненському р-ні, до рекреаційної території було віднесено Зарічненський і Рокитнівський р-ни Рівненської обл. Оскільки найбільш розореними є південні райони області (Радивилівський, Дубенський, Млинівський та Демидівський), їх було віднесено до аграрної території. За урбанізовану територію було обрано м. Рівне, за техногенно трансформовану – Здолбунівський р-н, у якому зосереджено найбільші підприємства Рівненщини (ВАТ «Укрцемремонт» і ВАТ «Здолбунівський ремонтно-механічний завод»).

Для оцінки якості водних об'єктів використано результати аналізів хімічного складу води [8–10]. Крім того, проаналізовано проби води з 17 річок, відібрані впродовж 2005–2010 рр. Для визначення масової концентрації нітрогеновмісних сполук зразки води були відібрані по різних контрольних створах Рівненщини відповідно до рівня антропогенного навантаження території (рис. 1).



Рис. 1 Локалізація на карті Рівненської області досліджених територій з різним рівнем антропогенного навантаження.

Було досліджено 167 зразків води із 56 контрольних створів 8 районів Рівненської обл. та м. Рівне, розміщених на територіях із різним рівнем антропогенного забруднення. Зокрема, з малих річок рекреаційної території було досліджено 34 проби води, аграрної – 56, урбанізованої та техногенно трансформованої, відповідно, 48 та 29 проб.

У досліджуваних точках відбирали по 200 см<sup>3</sup> води, консервували, додаючи на 1 дм<sup>3</sup> досліджуваної води 2–4 см<sup>3</sup> хлороформу. Вміст нітратів визначали колориметрично з фенолдісульфокислотою з утворенням нітрофенолу жовтого кольору [4]. При цьому хлориди видаляли додаванням аргентум сульфату. Визначення вмісту нітритів здійснювали діазотуванням реактиву Грісса з утворенням діазосполуки з 1-нафтиламіном червоно-фіолетового кольору [4]. У разі мутності воду освітлювали алюміній гідроксидом. Вміст іона амонію визначали фотометричним методом за якісною реакцією з реактивом Несслера.

Одержані дані піддавали статистичній обробці [17].

### Результати і їхнє обговорення

Гідрологічна характеристика Рівненщини. У Рівненській обл. налічується 170 річок, загальна довжина яких становить 4,45 тис. км, та протікає 1204 невеликих водотоків – струмків (довжиною від 0,5 до 10 км) загальною протяжністю понад 3,29 тис. км. Усі вони належать до басейну ріки Прип'ять, що протікає по північно-західній околиці області впродовж 20 км. Найбільші її притоки – Горинь, Случ, Замчисько, Устя, Стир та Іква. Всі вищезазначені річки, крім Замчиська та Усті, транзитні [8].

Основний напрямок течії річок з півдня на північ зумовлений загальним зниженням у цьому напрямку висотних відміток поверхні. У межах Полісся похили річок невеликі та змінюються від 0,3 до 0,6%. Тут річки мають широкі, зі заболоченими заплавами, долини, в яких є багато стариць, озер. На півдні, в межах Волинської височини, похили водотоків значно більші та становлять 1,0–1,5%, досягаючи 3,0–5,0%. Тут долини річок вузькі та глибокі, ширина заплави невелика. Густина річкової мережі становить 0,025–0,35 км/км<sup>2</sup> на півдні, знижуючись до 0,15–0,22 км/км<sup>2</sup> на півночі. Живлення річок змішане, з переважаючим сніговим, частина якого є більш значною для поліських річок і меншою для річок лісостепової частини області [6].

Стік води є найважливішою гідрологічною характеристикою, яка через систему різноманітних показників дає змогу оцінити водність певного водотоку та кількісно виразити умови водозбору. Стік річок Рівненщини впродовж року нерівномірний, що визначається як зональними факторами (опади й випарування), так і азональними (геоморфологічною будовою басейнів, гідрогеологічними умовами, характером ґрунтів, рослинного покриву, господарської діяльності) [6]. Розподіл стоку річок Рівненської обл. за сезонами подано в табл. 1.

Таблиця 1

Розподіл стоку річок Рівненської області за сезонами, % (за Геренчук К.І. [6])

Водність року	Пора року			
	Весна ІІІ–V	Літо VI–VIII	Осінь IX–XI	Зима XII–II
Річки поліської частини Рівненської області				
Багатоводний	51,0	8,3	11,7	29,0
Середній	62,1	3,9	7,6	26,4
Маловодний	79,2	3,2	7,6	10,0
Дуже маловодний	83,2	3,3	5,0	8,5
Річки лісостепової частини Рівненської області				
Багатоводний	50,3	13,8	12,4	23,5
Середній	52,4	10,6	15,1	21,8
Маловодний	55,0	10,1	16,2	18,7
Дуже маловодний	59,6	8,7	15,2	16,5

На основних водних артеріях Рівненщини максимальні витрати води спостерігаються під час весняної повені, тоді як малі річки найбільше води несуть під час зливових паводків літньо-осіннього періоду. Такі паводки здебільшого мають локальний характер, оскільки зливи охоплюють порівняно невеликі площі. Проте в окремі роки паводки набувають катастрофічного характеру [6, 18]. При розрахунках природного потенціалу водних ресурсів необхідно враховувати велику групу антропогенних факторів, що призводять до зміни у формуванні стоку [14, 20]. Наслідки осушення басейнів малих річок постійно впливають на режим стоку і структуру річкової сітки [5, 26].

Джерела забруднення водойм численні та різноманітні. Основними з них є: атмосферні опади, що містять забруднюючі речовини промислового походження, які вимиваються з атмосфери; міські стічні води (побутові, каналізаційні стоки, що містять шкідливі для здоров'я синтетичні миючі засоби та ін.); сільськогосподарські стічні води (відходи тваринницьких комплексів, змив з полів добрив і пестицидів дощами та весняними талими водами та ін.); неочищені або недостатньо очищені промислові стічні води [16].

Найбільшого антропогенного впливу зазнають поверхневі води, які виступають приймачами неочищених відпрацьованих вод, побутових відходів та іншого різноманітного сміття. Якісні та кількісні характеристики поверхневих вод залежать від місця розташування басейнів річок, їх еколого-економічних особливостей і рівня антропогенного тиску [15].

Обговорення результатів. У пробах досліджуваної води нами було виявлено такий середній вміст нітратів, нітритів і нітрогену амонійного (табл. 2).

*Нітрати.* Підвищення концентрації нітратів у воді свідчить про забруднення [29]. Присутність нітратних іонів у природних водах пов'язана з внутрішньоводойменними процесами під дією нітрифікуючих бактерій; атмосферними опадами, які розчиняють оксиди нітрогену, що утворюються при атмосферних електричних розрядах; промисловими та господарчо-побутовими стічними водами, особливо після біологічного очищення. Концентрація нітратів у поверхневих водах схильна до помітних сезонних коливань: мінімальна у вегетаційний період, вона збільшується восени і досягає максимуму взимку, коли при мінімальному споживанні азоту відбувається розкладання органічних речовин і перехід азоту з органічних форм у мінеральні. Амплітуда сезонних коливань може бути одним із показників евтрофікації водного об'єкта [12, 22.]

За середнім вмістом нітратів у воді малих річок Рівненщини найгіршим виявився 2005 р. На всіх досліджуваних територіях впродовж 2005 р. вміст  $\text{NO}_3^-$  у воді був найвищим порівняно з подальшими роками і перевищував їх у 15–150 разів. Найбільші концентрації нітратів у воді були зафіксовані на аграрній (11,13 мг/дм<sup>3</sup>), та урбанізованій (12,24 мг/дм<sup>3</sup>), територіях, обидві у межах ГДК (ГДК<sub>( $\text{NO}_3^-$ )пробосп.</sub> = 40,0 мг/дм<sup>3</sup> [11]), проте співвідношення  $[\text{NH}_4^+]:[\text{NO}_2^-]:[\text{NO}_3^-]$  у першому випадку становило 1 : 0,24 : 14,57, а у другому – 1 : 0,08 : 27,83.

У 2006–2007 рр. показник вмісту нітратів на всіх досліджуваних територіях був майже однаковий і коливався від 0,04 мг/дм<sup>3</sup> на рекреаційній території до 0,13 мг/дм<sup>3</sup> на техногенно трансформованій території. У 2008 р. на техногенно трансформованій території спостерігається підвищення вмісту нітратів до 0,26 мг/дм<sup>3</sup> (у межах ГДК), а на інших досліджуваних територіях концентрація нітратів залишилася на постійному рівні й становила від 0,06 до 0,15 мг/дм<sup>3</sup>. У 2009 р. на рекреаційній території була виявлена найменша за період дослідження концентрація нітратів, що становила 0,02 мг/дм<sup>3</sup>, найбільша – на техногенно трансформованій (0,16 мг/дм<sup>3</sup>), причому співвідношення  $[\text{NH}_4^+]:[\text{NO}_2^-]:[\text{NO}_3^-]$  становило, відповідно, 1:0,17:0,17 та 1:1,45:0,13. У 2010 р. спостерігається зростання вмісту нітратів у воді вдвічі порівняно з 2009 р. на рекреаційній і урбанізованій територіях,

а на аграрній виявлено зменшення концентрації нітратів. Проте, як збільшення, так і зменшення вмісту нітратів у воді малих річок Рівненщини на всіх досліджених територіях упродовж періоду дослідження у ваговому вимірі було несуттєвим, а рівень концентрацій  $\text{NO}_3^-$  не перевищував ГДК.

Таблиця 2

Динаміка середньорічного вмісту розчинних сполук Нітрогену у воді малих річок екосистем із різним характером антропогенного навантаження в період 2005–2010 рр. (мг/дм<sup>3</sup>;  $M \pm m$ ;  $n=3-12$ )

Характер антропогенного навантаження території	Форми Нітрогену				
	Концентрація, мг/дм <sup>3</sup>			Кількісне співвідношення	Якісне співвідношення
	[NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ]	[NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ]	[NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ]		
	2005 рік				
Рекреаційна	0,33±0,09	0,07±0,01	2,06±0,42	1 : 0,21 : 6,24	[NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ] > [NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ] > [NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ]
Урбанізована	0,40±0,08	0,43±0,14	11,13±1,64	1 : 0,08 : 27,83	[NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ] > [NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ] > [NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ]
Аграрна	0,84±0,19	0,20±0,02	12,24±4,67	1 : 0,24 : 14,57	[NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ] > [NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ] > [NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ]
Техногенно трансформована	0,46±0,07	0,12±0,04	4,08±0,57	1 : 0,26 : 8,87	[NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ] > [NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ] > [NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ]
	2006 рік				
Рекреаційна	0,16±0,03	0,03±0,00	0,06±0,01	1 : 0,19 : 0,38	[NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ] > [NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ] > [NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ]
Урбанізована	0,41±0,05	0,38±0,07	0,10±0,01	1 : 0,93 : 0,24	[NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ] > [NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ] > [NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ]
Аграрна	1,03±0,12	0,32±0,10	0,10±0,01	1 : 0,31 : 0,10	[NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ] > [NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ] > [NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ]
Техногенно трансформована	1,03±0,40	2,70±0,81	0,13±0,02	1 : 2,62 : 0,13	[NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ] > [NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ] > [NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ]
	2007 рік				
Рекреаційна	0,09±0,01	0,02±0,00	0,04±0,00	1 : 0,22 : 0,44	[NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ] > [NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ] > [NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ]
Урбанізована	0,21±0,03	0,37±0,14	0,11±0,01	1 : 1,76 : 0,52	[NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ] > [NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ] > [NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ]
Аграрна	0,44±0,07	0,18±0,05	0,12±0,01	1 : 0,41 : 0,27	[NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ] > [NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ] > [NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ]
Техногенно трансформована	0,59±0,07	1,10±0,41	0,09±0,02	1 : 1,86 : 0,15	[NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ] > [NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ] > [NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ]
	2008 рік				
Рекреаційна	0,12±0,01	0,02±0,00	0,06±0,01	1 : 0,17 : 0,50	[NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ] > [NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ] > [NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ]
Урбанізована	0,18±0,02	0,20±0,07	0,15±0,06	1 : 1,11 : 0,83	[NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ] > [NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ] > [NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ]
Аграрна	0,21±0,03	0,18±0,02	0,08±0,01	1 : 0,85 : 0,38	[NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ] > [NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ] > [NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ]
Техногенно трансформована	0,60±0,34	1,30±0,28	0,26±0,08	1 : 2,17 : 0,43	[NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ] > [NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ] > [NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ]
	2009 рік				
Рекреаційна	0,12±0,03	0,02±0,00	0,02±0,00	1 : 0,17 : 0,17	[NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ] > [NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ] = [NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ]
Урбанізована	0,48±0,05	0,43±0,07	0,13±0,01	1 : 0,90 : 0,27	[NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ] > [NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ] > [NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ]
Аграрна	0,69±0,06	0,38±0,07	0,07±0,01	1 : 0,55 : 0,10	[NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ] > [NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ] > [NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ]
Техногенно трансформована	1,26±0,61	1,83±0,55	0,16±0,03	1 : 1,45 : 0,13	[NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ] > [NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ] > [NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ]
	2010 рік				
Рекреаційна	0,59±0,10	0,14±0,03	1,59±0,29	1 : 0,24 : 2,70	[NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ] > [NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ] > [NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ]
Урбанізована	0,09±0,01	0,01±0,00	9,91±0,51	1 : 0,11 : 110,11	[NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ] > [NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ] > [NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ]
Аграрна	0,24±0,03	0,10±0,02	1,69±0,27	1 : 0,41 : 7,04	[NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ] > [NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ] > [NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ]
Техногенно трансформована	0,26±0,06	1,11±0,25	2,45±0,52	1 : 4,27 : 9,42	[NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ] > [NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ] > [NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ]

Отже, у воді малих річок усіх досліджених територій концентрація нітратів, починаючи з 2006 р., є величиною відносно сталою і налічує в середньому 0,045 мг/дм<sup>3</sup>, коливаючись від 0,02 до 0,26 мг/дм<sup>3</sup>.

*Нітрими.* Підвищення концентрації нітритів зазвичай свідчить про свіже забруднення [29]. Нітрими є проміжним ступенем у ланцюзі бактеріальних процесів окислення амонію до нітратів (нітрифікація відбувається тільки в аеробних умовах) і,



навпаки, відновлення нітратів до азоту й аміаку (денітрифікація відбувається за нестачі кисню). Сезонні коливання вмісту нітритів характеризуються відсутністю їх узимку та появою навесні. Найбільша концентрація нітритів спостерігається наприкінці літа. Восени концентрація нітритів зменшується.

Вміст нітритів у воді малих річок Рівненщини лише на окремих територіях перевищує ГДК (ГДК  $_{(\text{NO}_2^-)\text{рибгосп.}} = 0,08 \text{ мг/дм}^3$  [11]). Зокрема, у 2005 році концентрація нітритів у воді річок на аграрній території була найвищою ( $0,43 \text{ мг/дм}^3$ ), на рекреаційній – найменшою ( $0,07 \text{ мг/дм}^3$ ), причому співвідношення між ними становило 6:1. У наступному 2006 р. спостерігалася така тенденція: середні показники вмісту нітритів у воді порівняно з 2005 р. зменшилися на рекреаційній території у 2 рази (до  $0,03 \text{ мг/дм}^3$ ) та на аграрній території – від  $0,43$  до  $0,38 \text{ мг/дм}^3$ , а на урбанізованій і техногенно трансформованій територіях, навпаки, збільшилися, відповідно, в першому випадку в 1,6 разу (від  $0,20$  до  $0,32 \text{ мг/дм}^3$ ), у другому – в 22,5 разу (від  $0,12$  до  $2,70 \text{ мг/дм}^3$ ), що перевищує ГДК у 33 рази. У 2007 р. найменший вміст  $\text{NO}_2^-$  було виявлено у воді рекреаційної території ( $0,02 \text{ мг/дм}^3$ ), найбільший – техногенно трансформованої ( $1,10 \text{ мг/дм}^3$ ), що перевищує ГДК у 13 разів, співвідношення між ними становило 1:55. У 2008–2010 рр. найменший вміст нітритів у воді малих річок Рівненщини також був зафіксований на рекреаційній території ( $0,02 \text{ мг/дм}^3$ ), найбільший – на техногенно трансформованій території ( $1,93 \text{ мг/дм}^3$ ), що перевищує ГДК у 24 рази, співвідношення між ними становило 1:96.

Отже, впродовж усього періоду спостережень вміст нітритів перевищував показник ГДК інколи у десятки разів, що разом із багаторазовим переважанням вмісту  $\text{NO}_2^-$  над вмістом  $\text{NO}_3^-$  свідчить про зміщення балансу нітратного нітрогену в бік нітритів, можливо, у зв'язку з затримкою окислення нітрит-іона в нітрат-іон у конкретних фізико-хімічних умовах та завдяки специфічному бактеріальному складу води, які визначають швидкість такого окислення.

Нітроген амонійний. Підвищення концентрації нітрогену амонійного зазвичай свідчить про свіже забруднення й активну деструкцію органічних речовин (гниття) [29]. Основними джерелами потрапляння у водойми іонів амонію є тваринницькі ферми, господарські побутові стічні води, стічні води підприємств харчової та хімічної промисловості.

У 2005 р. концентрація нітрогену амонійного була в межах ГДК (ГДК  $_{(\text{NH}_4^+)\text{рибгосп.}} = 0,5 \text{ мг/дм}^3$  [11]) у воді річок усіх досліджуваних територій, крім урбанізованої, і коливалася в межах від  $0,33$  до  $0,46 \text{ мг/дм}^3$ . На урбанізованій території спостерігали незначне (в 1,5 разу) перевищення ГДК нітрогену амонійного і вміст  $\text{NH}_4^+$  становив  $0,84 \text{ мг/дм}^3$ . У 2006 р. найменші концентрації нітрогену амонійного спостерігались у воді річок рекреаційної території ( $0,16 \text{ мг/дм}^3$ ), найбільші – техногенно трансформованої та урбанізованої ( $1,03 \text{ мг/дм}^3$ ), останні перевищували ГДК у 2 рази. У 2007–2008 рр., як і у 2006 р., найменша концентрація нітрогену амонійного була виявлена у воді річок рекреаційної території ( $0,09$ – $0,12 \text{ мг/дм}^3$ ), найбільша – техногенно трансформованої ( $0,59$ – $0,60 \text{ мг/дм}^3$ ). Співвідношення між ними становило, відповідно, 1:6,5 та 1:5. У 2009 р. найбільший вміст нітрогену амонійного виявлено також на техногенно трансформованій території, і його значення перевищувало ГДК  $_{(\text{NH}_4^+)}$  у 2,5 разу.

Підвищений вміст іонів амонію свідчить про погіршення санітарного стану не лише поверхневих вод, але й водних джерел Рівненської обл. Значне зростання концентрації  $\text{NH}_4^+$  може бути зумовлене надходженням у ґрунтові води господарсько-побутових стічних вод, нітратних та органічних добрив.

*Співвідношення  $[NH_4^+]:[NO_2^-]:[NO_3^-]$ .* У воді річок практично всіх досліджених територій, крім техногенно трансформованої, вміст нітрогену амонійного найчастіше є найвищим, практично у 3–5 разів меншим є вміст нітритів, відповідно так само меншим є вміст нітратів. Така закономірність простежується у 2006 р. на урбанізованій, у 2006–2008 рр. – на аграрній, у 2009 р. – на всіх територіях, окрім техногенно трансформованої. Зазначена закономірність добре узгоджується з хімічним (біохімічним) ланцюгом окиснення досліджених сполук:  $NH_4^+ \rightarrow NO_2^- \rightarrow NO_3^-$ .

Виняток становлять 2005 і 2010 рр., коли у річковій воді усіх досліджених територій серед неорганічних сполук Нітрогену максимальна концентрація була зафіксована для нітратів, а мінімальна – для нітритів (крім техногенно трансформованої території, де найнижчою у 2010 р. виявилася концентрація нітрогену амонійного).

Близьке до рівномірного співвідношення розчинних сполук Нітрогену свідчить про природний стан перебігу їх окислення. Щодо його швидкості, то слід зауважити, що екосистеми водойм справляються з перетворенням і фіксацією цих сполук, оскільки перевищення значень ГДК для нітратного Нітрогену не виявлено. Проте у воді річок техногенно трансформованої території спостерігається інший характер співвідношення зі стійким переважанням серед усіх досліджених сполук концентрації нітритів, яка може перевищувати вміст нітратів у 5–20 разів, а амонію – більше ніж удвічі. Слабко виражена тенденція таких змін в окремі роки спостерігалася й у воді річок урбанізованої території. Фіксування в екосистемах Нітрогену переважно у складі нітритів свідчить як про інтенсивне окислення амонію, так і про блокування нітритоксидазного шляху утворення нітратів. Імовірно, що хімічний склад води техногенно забруднених річок блокує окислення завдяки зниженому вмісту кисню та зменшенню у складі бактеріального різноманіття мікроорганізмів з оксидоредуктазними властивостями. Зважаючи на те, що нітрити, які накопичуються у такій воді, мають найнижче серед неорганічних сполук Нітрогену значення ГДК, якість води в цих річках є найнижчою [11].

*Розчинений кисень.* У поверхневих водах вміст розчиненого кисню варіює в широких межах (від 0 до 14 мг/дм<sup>3</sup>) і схильний до сезонних та добових коливань, що залежать від інтенсивності його продукування і споживання [22]. Концентрація кисню визначає розмір окисно-відновного потенціалу і значною мірою спрямування та швидкість хімічного й біохімічного окислення органічних і неорганічних сполук. У свою чергу, при потрапленні у річку органічних речовин, що містять сполуки Нітрогену, з побутовими і промисловими стічними водами концентрація розчиненого кисню у воді зменшується [27]. Це викликано окисленням органічних речовин водними організмами.

Середньорічні концентрації розчиненого кисню у поверхневих водах малих річок Рівненщини на територіях різного рівня антропогенного навантаження наведені на рис. 2.

Середньорічний вміст розчиненого кисню у поверхневих водах малих річок усіх досліджених територій Рівненщини впродовж 2005–2010 рр. незначно відрізнявся і становив у середньому 8,84 мг/дм<sup>3</sup> (ГДК<sub>(O2)рибгосп.</sub> = 14 мг/дм<sup>3</sup>) [11]. Максимальна концентрація кисню (10,68 мг/дм<sup>3</sup>) спостерігалась у 2005 р. у водах річок техногенно трансформованої та у 2010 р. – аграрної територій, мінімальна (7,49 мг/дм<sup>3</sup>) – в 2009 р. у поверхневих водах рекреаційної території.

Збільшення вмісту розчиненого кисню означає поліпшення якості води [27]. Навпаки, зниження його концентрації свідчить про погіршення якості води в досліджуваному регіоні, що й спостерігалось впродовж 2005–2010 рр. у поверхневих водах рекреаційної, у 2005–2008 рр. – аграрної та урбанізованої, 2005–2006 рр. – техногенно трансформованої

територій Рівненської області. Найімовірніше, що погіршення кисненасичення води річок є результатом збільшення вмісту органічних відходів, які потрапляють у воду річок.

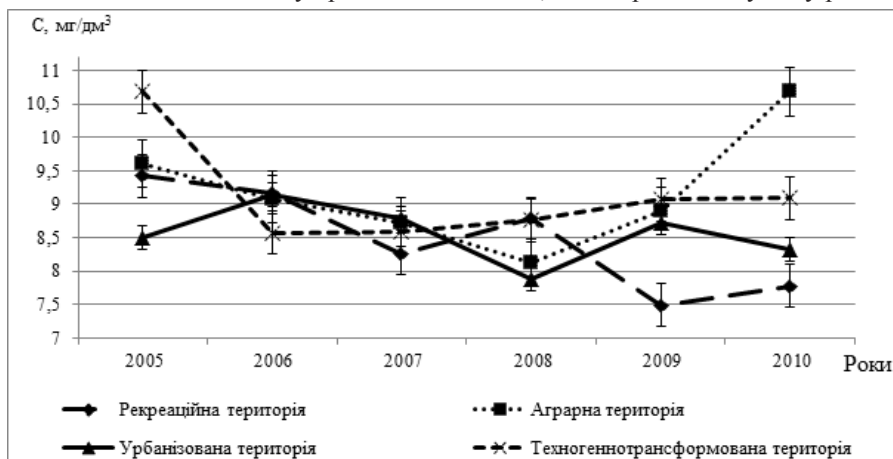


Рис. 2 Середньорічний вміст розчиненого кисню у воді малих річок Рівненщини з різним рівнем антропогенного навантаження в період 2005–2010 рр. (мг/дм³;  $M \pm m$ ;  $n=4-12$ ).

Проведений кореляційний аналіз дав змогу встановити зв'язок середньорічних концентрацій нітрогеновмісних сполук зі середньорічним вмістом розчиненого кисню у поверхневих водах Рівненської обл. упродовж 2005–2010 рр. (табл. 3). Отримані середні коефіцієнти кореляції  $r$  перебувають у межах:  $-0,204 \div 0,465$ .

Таблиця 3

Коефіцієнт кореляційного зв'язку між середньорічним вмістом розчинних форм Нітрогену та розчиненого кисню в поверхневих водах малих річок Рівненщини (2005–2010 рр.)

Характер антропогенного навантаження території	Коефіцієнт кореляційного зв'язку з вмістом розчиненого кисню, $r$		
	Нітроген амонійний	Нітроген нітритний	Нітроген нітратний
Рекреаційна	-0,135	-0,167	0,234
Аграрна	-0,266	-0,483	0,815
Урбанізована	0,791	0,575	-0,09
Техногенно трансформована	-0,321	-0,740	0,901
Середнє значення	0,017	-0,204	0,465

Високий позитивний кореляційний зв'язок між вмістом кисню та концентрацією амонію і нітритів виявлений у річках урбанізованої території, а між вмістом кисню і нітратним Нітрогеном – у річках аграрної та техногенно навантаженої території. Натомість в останніх є негативна кореляція між вмістом кисню і концентрацією нітритів. Отже, високий вміст кисню сприяє накопиченню нітратів і зменшенню вмісту нітритів та, частково, амонію. Високий вміст кисню супроводжується значною концентрацією амонійного Нітрогену тільки у воді урбанізованих територій, можливо, у зв'язку зі значними викидами амонію, що утворюється з сечовини комунально-побутових зливів.

Процесами хімічних (біохімічних) перетворень за участю кисню, в які вступають у поверхневих водах сполуки Нітрогену, є нітрифікація і денітрифікація. Нітрифікація – окислення аміаку до нітратів, через проміжну стадію утворення нітритів, супроводжується асиміляцією карбонатної кислоти; денітрифікація – відновлення нітриту до газоподібного азоту. Обидва процеси відбуваються за участю мікроорганізмів. Нітрифікуючі бактерії

перебувають в асоціації з гетеротрофною мікрофлорою. Посилене поглинання нею розчиненого кисню у процесі окислення органічних речовин створює умови, за яких нітрифікуючі мікроорганізми знаходяться у невідповідному положенні. Окислення амонійного нітрогену починається після того, як органічні речовини практично використані, діяльність гетеротрофної мікрофлори вийшла на стаціонарний режим й у водній екосистемі наявний розчинений кисень. Розчинений кисень гальмує денітрифікацію, виступаючи в ролі акцептора електронів і тим самим запобігаючи відновленню нітратів. Його концентрація у зоні денітрифікації не має перевищувати 0,5 мг/дм<sup>3</sup> [30]. Тому дослідження окисно-відновної здатності нітрифікуючих комплексів дасть можливість точніше визначити роль мікрофлори у формуванні нітрогенного балансу у водних екосистемах. Проте отримані дані свідчать про значну роль кисню в його регулюванні у річках із територій з високим антропогенним навантаженням.

Водневий показник (рН). На швидкість нітрифікації також значно впливає рН, оптимальне значення якого становить 8,4 [30]. Підвищення рН негативно впливає на процес нітрифікації, бо при цьому в середовищі збільшується вміст вільного аміаку, що є інгібітором нітрифікації. На відміну від нітрифікації, денітрифікація збільшує лужність середовища і викликає збільшення рН.

З витратою кисню на процеси окислення тісно пов'язане і зниження рН водного середовища [27]. Це достатньо впевнено представлено відповідними даними (табл. 4).

Таблиця 4

Середньорічні значення рН у воді малих річок Рівненщини з різним характером антропогенного навантаження в період 2005–2010 рр. (M±m; n=4–12)

Роки	Рівень антропогенного навантаження території			
	Рекреаційна	Аграрна	Урбанізована	Техногенно трансформована
2005	7,73±0,15	7,91±0,02	7,89±0,05	8,06±0,09
2006	7,81±0,11	7,64±0,01	7,84±0,04	7,83±0,03
2007	7,51±0,09	7,94±0,07	7,95±0,02	7,68±0,03
2008	8,19±0,41	7,72±0,03	7,89±0,02	7,94±0,06
2009	7,49±0,10	8,00±0,02	7,88±0,02	7,96±0,04
2010	7,22±0,03	7,94±0,01	7,72±0,05	7,60±0,09

Величина водневого показника визначає розвиток і життєдіяльність водних рослин, стійкість різних форм міграції елементів, змінює токсичність забруднюючих речовин. Нижче подано коефіцієнти кореляційного зв'язку між середньорічним вмістом розчинних форм Нітрогену та середньорічним рН у поверхневих водах малих річок (табл. 5).

Таблиця 5

Коефіцієнт кореляційного зв'язку між середньорічним вмістом розчинних форм Нітрогену та середньорічним значенням рН у водах малих річок Рівненщини (2005–2010 рр.)

Рівень антропогенного навантаження території	Коефіцієнт кореляційного зв'язку між рН води та вмістом сполук Нітрогену, r		
	Нітроген амонійний	Нітроген нітритний	Нітроген нітратний
Рекреаційна	-0,561	-0,595	-0,333
Аграрна	-0,028	0,027	0,356
Урбанізована	0,204	0,326	0,071
Техногенно трансформована	0,368	-0,183	0,219
Середнє значення	-0,004	-0,106	0,078

Проведений кореляційний аналіз дав змогу встановити зв'язок середньорічних концентрацій розчинних форм Нітрогену зі середньорічним значенням рН у поверхневих

водах Рівненської області впродовж 2005–2010 рр. Отримані середні коефіцієнти кореляції  $r$  у межах:  $-0,106,0,078$ .

У воді річок рекреаційної території зростання рН зменшує вміст усіх сполук Нітрогену, натомість у воді річок із антропогенним навантаженням простежується тенденція переходу до позитивної кореляції цієї залежності, хоча чіткої залежності між цими факторами не виявлено. Очевидно, кислотність води є результатом перебігу комплексу хімічних і біохімічних процесів, пов'язаних, насамперед, із вмістом кисню та окисно-відновним потенціалом води, що формується також за рахунок інших компонентів: спиртів, фенолів, органічних кислот тощо.

Дослідження вмісту нітритів, нітратів і нітрогену амонійного у воді малих річок екосистем із різним рівнем антропогенного навантаження Рівненщини показало, що найменший середній вміст нітратів було виявлено у воді малих річок рекреаційної території ( $0,02$  мг/дм<sup>3</sup>) у 2009 р., найбільший – урбанізованої ( $12,24$  мг/дм<sup>3</sup>) і аграрної ( $11,13$  мг/дм<sup>3</sup>) у 2005 р.

Найменші концентрації нітритів спостерігались у воді малих річок рекреаційної території ( $0,02$  мг/дм<sup>3</sup>), найбільші – техногенно трансформованої ( $2,70$  мг/дм<sup>3</sup>), при нормі ГДК  $0,08$  мг/дм<sup>3</sup>.

Високий вміст нітритів і нітратів у воді малих річок техногенно трансформованої території скоріше за все може бути пов'язаний із потраплянням у поверхневі води промислових і комунальних викидів, а урбанізованої – комунальних стоків.

Найбільші концентрації нітрогену амонійного спостерігались у воді малих річок техногенно трансформованої та урбанізованої територій і перевищували гранично-допустиму концентрацію, відповідно, у 2,5 і 2 рази. Найменший вміст нітрогену амонійного було виявлено в межах ГДК на рекреаційній території ( $0,09$  мг/дм<sup>3</sup>).

У воді річок техногенно трансформованої території у співвідношенні досліджених сполук спостерігається стійке переважання нітритів, які можуть перевищувати вміст нітратів у 5–20 разів, а амонію – більше ніж у 2 рази, що свідчить про накопичення в екосистемах Нітрогену переважно у складі нітритів та як про інтенсивне окиснення амонію, так і про блокування нітритоксидазного шляху утворення нітратів.

Суттєвими факторами регуляції вмісту і трансформації неорганічних сполук Нітрогену є вміст кисню та рН води, показники яких змінюються залежно від рівня антропогенного навантаження.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Бескровная М. В.* Оптимизация процесса биологического удаления минерального азота из сточных вод // Вода і водоочисні технології. 2008. № 3 (27). С. 44–48.
2. *Брагинский Л. П.* Некоторые принципы классификации пресноводных экосистем по уровням токсической загрязненности // Гидробиол. журнал. 1985. Т. 21. № 6. С. 65–73.
3. *Васильчук Т. О., Клоченко П. Д., Бусигіна О. В.* Компонентний склад розчинених органічних речовин р. Прип'ять та його зв'язок з розвитком фітопланктону // Наук. зап. Терноп. пед. ун-ту. Сер. біол. 2001. № 3(14). С. 182–184.
4. Вода питьевая. Методы анализа. Государственные стандарты СССР. М., 1984. 324 с.
5. *Водогрецкий В. Е.* Антропогенное изменение стока малых рек. Л.: Гидрометеоздат, 1990. 176 с.
6. *Геренчук К. І.* Природа Рівненської області. Львів: Вища школа, 1976. 156 с.
7. Гидрохимические показатели состояния окружающей среды: справочные материалы / под ред. Т.В. Гусева. М.: ФОРУМ; ИНФРА-М, 2007. 192 с.
8. Доповідь про стан навколишнього природного середовища в Рівненській області у 2003 р. Рівне: Державне управління охорони навколишнього природного середовища в

- Рівненській області, 2004. 187 с.
9. Доповідь про стан навколишнього природного середовища в Рівненській області у 2008 р. Рівне: Державне управління охорони навколишнього природного середовища в Рівненській області, 2009. 199 с.
  10. Екологічний паспорт Рівненської області за даними 2005–2010 року. Рівне: Держуправління охорони навколишнього природного середовища в Рівненській області, 2006; 2007; 2008; 2009; 2010; 2011.
  11. Загальний перелік ГДК і ОБРВ шкідливих речовин для води рибогосподарських водойм (№ 12-04-11 від 09.08.1990).
  12. *Зенин А. А., Белоусова Н. В.* Гидрохимический словарь. Л.: Гидрометеиздат, 1988. 240 с.
  13. *Клоченко П. Д.* Динамика неорганических соединений азота в загрязненных малых реках в связи с развитием фитопланктона (на примере некоторых притоков Днестра) // Гидробиол. журнал. 1995. Т. 31. № 1. С. 95–102.
  14. *Клоченко П. Д.* Содержание неорганических соединений азота и развитие фитопланктона в некоторых типах водоемов // Гидробиол. журнал. 1993. Т. 29. № 6. С. 88–95.
  15. *Колесник И. А.* Состояние химического загрязнения рек Украины и его динамика во второй половине XX столетия // Гідрологія, гідрохімія і гідроекологія. К.: Ніка-Центр, 2000. Т. 1. С. 72–77.
  16. *Коротун І. М., Коротун Л. К.* Географія Рівненської області. Рівне: Вид-во РІПК ПК, 1996. 274 с.
  17. *Лакін Г. Ф.* Биометрия. М.: Высш. школа, 1990. 352 с.
  18. *Мережко А. И.* Проблемы малых рек и основные направления их исследования // Гидробиол. журнал. 1998. Т. 34. №6. С. 66–71.
  19. *Опополь Н. И., Добрянская Е. В.* Нитраты: гигиенические аспекты, проблемы. Кишинев: Штиинца, 1986. 114 с.
  20. *Пластунов Б. А.* Про нормативне забезпечення моніторингу води водних об'єктів // Екологічна безпека: проблеми і шляхи вирішення : Міжнар. наук.-практ. конф. (Харків, 2005). Т. 1. С. 347–351.
  21. *Руденко Л. Г., Денісова О. І., Яцик А. В.* Екологічна оцінка сучасного стану поверхневих вод (методичні аспекти) // Укр. геогр. журнал. 1996. № 3. С. 35–38.
  22. Руководство по химическому анализу поверхностных вод суши / под ред. А. Д. Семенова. Л.: Гидрометеиздат, 1977. 541 с.
  23. *Собко Л. В.* Динаміка вмісту нітратів і нітритів у питній воді Кременецького району у весняно-літній період // Наук. зап. Терноп. нац. пед. ун-ту ім. В. Гнатюка. Сер. біол. Спец. вип. «Гідроекологія». 2010. № 2(43). С. 454–459.
  24. *Соколов О. А., Семенов В. М., Агаев В. А.* Нитраты в окружающей среде. Пушино: ОНТИ НЦБИ АН ССР, 1990. 317 с.
  25. *Стабникова Е. В., Телешева С. В., Малиш Н. А., Стабников В. П.* Изучение уровня содержания азотных соединений в подземных водах Украины // Науч. раб. Укр. гос. ун-та пищ. технологий. 2000. № 6. С. 85–87.
  26. *Хвесик М. А.* Региональный анализ формирования качества поверхностных вод // Экологические проблемы Украины и пути их решения. К.: СОПС Украины АН Украины, 1991. С. 39–45.
  27. Геоглобус.ру - Геолого-географическое и техно-экологическое обозрение [электронный ресурс]. Режим доступа – URL: <http://www.geoglobus.ru/info/review>.
  28. Гидрогеология: Курс лекций Стендсфордского университета [электронный ресурс]. Режим доступа – URL: <http://geohydrology.ru>.

29. ГПБУ «Мосэкомониторинг»: Глосарий [электронный ресурс]. Режим доступа – URL: <http://www.mosecom.ru>.
30. Инженерная энциклопедия: Очистка сточных вод от соединений азота [электронный ресурс]. Режим доступа – URL: <http://engineeringsystems.ru/o/ochistka-stochnih-vod-ot-soed-azota.php>.

*Стаття: надійшла до редакції 10.02.12*

*доопрацьована 25.10.12*

*прийнята до друку 08.11.12*

## CONTENTS OF NITROGEN COMPOUNDS IN THE WATER OF SMALL RIVERS AS AN INDICATOR OF ANTHROPOGENIC CAPACITY OF THE AREAS

**I. Gryuk, I. Sukhodolska**

*Volodymyr Gnatyuk Ternopil National Pedagogical University  
2, M. Kryvonis St., Ternopil 46027, Ukraine  
e-mail: grjuk@inbox.ru*

The results of the research of contents of ammonium nitrogen, nitrites, nitrates dynamics and their correlation in the water of small rivers with different levels of anthropogenic capacity of Rivne Polissya during 2005–2010 are given. It is shown that the level of anthropogenic capacity changes correlation in the system of ammonium-nitrites-nitrates towards nitrites accumulation through accelerated conversion of ammonium and inhibition of oxidative nitrites conversion into nitrates. The essential factor in the regulation of contents and transformation of inorganic nitrogen compounds is dissolved oxygen and pH water contents, which parameters vary depending on the level of anthropogenic capacity.

*Keywords:* ammonium nitrogen, dissolved oxygen, nitrates, nitrites, pH.

## СОДЕРЖАНИЕ СОЕДИНЕНИЙ АЗОТА В ВОДЕ МАЛЫХ РЕК КАК ПОКАЗАТЕЛЬ УРОВНЯ АНТРОПОГЕННОЙ НАГРУЗКИ ТЕРРИТОРИЙ

**И. Грюк, И. Суходольская**

*Тернопольский национальный педагогический университет имени  
Владимира Гнатюка  
ул. М. Кривоноса, 2, Тернополь 46027, Украина  
e-mail: grjuk@inbox.ru*

Приведены результаты исследования динамики содержания аммонийного азота, нитритов, нитратов и их соотношения в воде малых рек с разным уровнем антропогенной нагрузки Ровенского Полесья в течение 2005–2010 гг. Показано, что уровень антропогенной нагрузки изменяет соотношение в системе аммоний-нитриты-нитраты в сторону накопления нитритов из-за ускоренного превращения аммония и торможения окислительного превращения нитритов в нитраты. Существенными факторами регуляции содержания и трансформации неорганических соединений азота являются содержание растворенного кислорода и pH воды, показатели которых изменяются в зависимости от уровня антропогенной нагрузки территории.

Ключевые слова: азот аммонийный, нитраты, нитриты, растворимый кислород, pH.

МІКРОБІОЛОГІЯ

УДК 615.076.7

**ВИЗНАЧЕННЯ ТА НЕЙТРАЛІЗАЦІЯ АНТИМІКРОБНОЇ АКТИВНОСТІ  
КОМПОНЕНТІВ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ “ІНСПІРОН”**

**Я. Колісник, Н. Скочиляс**

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

На етапі фармацевтичної розробки нового лікарського засобу “Інспірон” вивчено антимікробну активність його компонентів і розроблено методи її нейтралізації. Сироп “Інспірон” і такі його складові, як екстракт кореня солодки, натрію сахаринат, ароматизатор мед-липа не проявляють ні антибактеріальної, ні протигрибової активності. Виявлено, що фенспіриду гідрохлорид повністю пригнічує ріст тест-мікроорганізмів *B. subtilis*, *A. brasiliensis* і змішаної культури мікроорганізмів. Антимікробну активність фенспіриду гідрохлориду можна нейтралізувати методом мембранної фільтрації. Встановлено, що сорбат калію проявляє бактерицидну та фунгіцидну активність щодо *S. aureus*, *A. brasiliensis* і змішаної культури мікроорганізмів. Показано, що інгібуючу активність даної сполуки можна нейтралізувати, використовуючи розведення 1:50, а щодо змішаної культури мікроорганізмів – шляхом збільшення об’єму середовища удвічі. Ванілін, пропілпарагідроксibenзоат, метилпарагідроксibenзоат проявляють антимікробну активність щодо всіх досліджуваних мікроорганізмів. Для нейтралізації антимікробної активності даних компонентів лікарського засобу слід використовувати комбінований метод: розведення та додавання інактивууючого розчину.

*Ключові слова:* антибактеріальна та протигрибова активність, нейтралізація.

На сучасному етапі розвитку фармацевтичної промисловості й у зв’язку із введенням на фармацевтичних підприємствах України правил належної виробничої (GMP) і лабораторної (GLP) практик змінюються підходи до контролю якості лікарських препаратів і субстанцій. Стерильність і мікробіологічна чистота ліків необхідні для їх безпечного застосування [6]. Потрапляння в продукт мікроорганізмів у процесі виробництва, зберігання чи використання спричиняє видиму втрату стабільності продукту (розшарування, утворення цвілі) або зниження терапевтичної ефективності лікарського препарату без наявних візуальних змін. Використання лікарських засобів, які містять мікроорганізми, може призвести не лише до зниження або відсутності терапевтичної дії препарату, а й до виникнення побічних реакцій і нових захворювань у пацієнта [1, 2].

Таким чином, починаючи з розробки нових фармацевтичних препаратів, на всіх етапах від виробництва до споживання необхідно оцінювати ймовірність ризику випуску неякісних засобів і удосконалювати систему контролю, яка забезпечить їхню якість. Особливе місце при цьому займають біологічні методи дослідження фармацевтичних препаратів, зокрема мікробіологічні. Враховуючи пряму залежність мікробіологічних показників з безпечністю лікарських засобів, результати дослідження фармацевтичної продукції повинні бути максимально точними та надійними.

Мікробіологічний контроль ліків є важливим для своєчасного виявлення контамінованих препаратів, а також для профілактики побічних реакцій, які можуть



виникати у разі їх використання. Лікарські засоби або окремі компоненти чи консерванти, які входять до їх складу, можуть пригнічувати ріст окремих видів мікроорганізмів – контамінантів, а це може вплинути як на терапевтичну ефективність і токсичність, так і на показники якості, наведені у специфікації [8, 10, 11].

Проблема розробки, обґрунтування і встановлення нормативів допустимого вмісту мікроорганізмів у лікарському засобі тісно пов'язана з вибором методів їх виявлення та ідентифікації, які обумовлюють ефективність аналізу. Однак такі дослідження можуть стримуватися низкою об'єктивних труднощів: якщо не розроблений системний і універсальний алгоритм мікробіологічного контролю різних категорій лікарських засобів, фармацевтичних субстанцій і допоміжних речовин, або відсутні адекватні до мети дослідження методики і схеми визначення мікробіологічної якості лікарських засобів [3, 5].

Зокрема, для уникнення хибних результатів при мікробіологічному контролі препаратів слід враховувати фактори, які можуть їх спричиняти. Наприклад, наявність антимікробної дії самих лікарських засобів або їх компонентів, а також наявність консервантів можуть перешкоджати виявленню мікроорганізмів [5].

Метою нашої роботи було визначити антибактеріальну та протигрибкову активність сиропу “Інспірон” і компонентів, які входять до його складу, а також розробити методи її нейтралізації для коректного визначення мікробіологічної чистоти цього лікарського засобу.

#### Матеріали та методи

Мікробіологічні дослідження лікарського засобу “Інспірон” проводилися методами, описаними в ДФУ [4]. У дослідженні використовували такі тест-штами мікроорганізмів: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Salmonella abony* CIP-8039, *Candida albicans* ATCC 885-653, *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404, одержаних із Державної колекції патогенних мікроорганізмів ВІСК ім. Л.А. Тарасевича, Москва; Чеської Колекції Мікроорганізмів та НДІ мед. мікології, Санкт-Петербург. Суспензію бактеріальних культур, що містили близько 100 КУО/мл, готували методом послідовних десятикратних розведень у буферному розчині з натрію хлоридом і пептоном (рН 7,0).

Підготовку досліджуваних зразків проводили таким чином: поміщали 1 г речовини у мірний посуд, доводили до 10 мл буферним розчином та інокулювали приготованою робочою суспензією тест-мікроорганізму із розрахунку 100 КУО/мл. Згідно з вимогами ДФУ (2.6.12) 1 мл підготованого зразка висівали на чашки Петрі зі соєво-казеїновим агаром (для бактерій) і сабуро-декстрозним агаром (для грибів) [4]. Для проведення експериментів використовували сухі поживні середовища фірми “Merck”. Для виявлення росту змішаної культури мікроорганізмів *E. coli*, *S. abony*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* 10 мл зразка, який містив по 100 КУО бактерій, вносили у відповідні поживні середовища (згідно з ДФУ п. 2.6.13) [4]. Вихідне мікробне навантаження визначали згідно з вищеописаною методикою, за винятком внесення досліджуваних зразків. Інкубацію посівів проводили при температурі (33±1)°С (бактерії), (23±1)°С (гриби).

З метою нейтралізації антимікробної дії компонентів сиропу “Інспірон” проводили подальші дослідження із застосуванням таких методів: збільшення об'єму розчинника (розведення), додавання до середовищ різних концентрацій неспецифічних інактиваторів (твін-80, соєвий лецитин, гістидину гідрохлорид), метод мембранної фільтрації з використанням різних об'ємів 0,9% розчину натрію хлориду [4, 7, 9, 12].

#### Результати і їхнє обговорення

Важливою частиною підготовчої роботи перед дослідженням препарату на мікробіологічну чистоту є визначення антибактеріальних і протигрибкових властивостей

лікарського засобу. Відповідно до вимог ДФУ 1.4. [4] кількість мікроорганізмів у зразках із додаванням досліджуваних сполук не повинна відрізнятися більше, ніж у два рази від вихідного мікробного навантаження. Також в умовах дослідження сполуки не повинні пригнічувати ріст змішаної культури мікроорганізмів.

Результати вивчення антимікробної активності лікарського сиропу “Інспірон” і його компонентів наведені у табл. 1, 2. Виявлено, що препарат “Інспірон” не має ні антибактеріальної, ні протигрибкової дії, оскільки у зразках із додаванням цього лікарського засобу спостерігався ріст досліджуваних мікроорганізмів, причому їхня кількість майже не відрізнялась від такої в контролі (табл. 1, 2). Фармакологічні властивості цього лікарського засобу зумовлені складним механізмом його дії, він має протизапальні та антибронхоконструкторні властивості.

Таблиця 1

Антибактеріальна та протигрибкова активність сиропу “Інспірон”  
і сполук, що входять до його складу

Досліджувані зразки	Тест-штами мікроорганізмів				
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6583	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	<i>Candida albicans</i> ATCC 885-653
	Кількість мікроорганізмів, КУО/мл				
Сироп “Інспірон”	87,0±7,9	76,0±7,1	68,0±6,2	40,0±3,5	75,0±7,1
Фенспіриду гідрохлорид	17,0±1,3	–	12,0±0,8	–	8,0±0,6
Сорбат калію	–	8,0±0,7	25,0±1,9	–	–
Екстракт кореня солодки	83,0±7,7	74,0±6,9	68,0±6,3	46,0±4,1	75,0±7,2
Натрію сахаринат	82,0±7,6	75,0±6,9	68,0±6,2	45,0±4,2	70,0±6,7
Ароматизатор “Мед-липа”	88,0±8,4	74,0±6,8	62,0±5,6	46,0±4,1	76,0±7,2
Ванілін	–	–	–	–	–
Метилпарагідроксибензоат	–	–	–	–	–
Пропілпарагідроксибензоат	–	–	–	–	–
Контроль	83,0±7,9	77,0±7,2	67,0±5,9	44,0±4,1	75,0±7,1

**Примітка.** “–” – відсутність росту тест-мікроорганізмів.

Згідно з ДФУ [4], під час мікробіологічного контролю лікарських засобів потрібно визначати і антимікробну активність їх компонентів, причому для досліджень беруть строго визначені концентрації даних сполук, які є вищими за ті, що входять до фармацевтичних препаратів. Тому нашим завданням було визначити антибактеріальну і протигрибкову дію компонентів сиропу “Інспірон”. До складу даного лікарського препарату входять фенспіриду гідрохлорид, сорбат калію, екстракт кореня солодки, натрію сахаринат, ароматизатор “Мед-липа”, метилпарагідроксибензоат (ніпагін), пропілпарагідроксибензоат (ніпазол), ванілін.

Результати досліджень показали (табл. 1, 2), що такі компоненти “Інспірону”, як екстракт кореня солодки, натрію сахаринат, ароматизатор “Мед-липа” не проявляли ні антибактеріальної, ні протигрибкової дії.

Сорбат калію повністю пригнічував ріст монокультур *S. aureus*, *A. brasiliensis*, *C. albicans* і змішаної культури мікроорганізмів, а кількість клітин таких бактерій як *B. subtilis* та *E. coli* була, відповідно, в 9,6 і 2,7 рази меншою, ніж у контролі. Фенспіриду гідрохлорид виявив бактерицидну і фунгіцидну дію на мікроорганізми *B. subtilis*, *A. brasiliensis*, а також на змішану культуру бактерій, а значення КУО/мл для *S. aureus*, *E. coli* та *C. albicans* при додаванні даної сполуки були, відповідно, в 4,9, 5,6 і 9,4 рази меншими, ніж у контролі.

Ванілін, метилпарагідроксибензоат, пропілпарагідроксибензоат мали антибактеріальну і протигрибкову активність стосовно всіх досліджених мікроорганізмів (табл. 1, 2).

Таблиця 2

Антимікробна активність компонентів лікарського засобу “Інспірон” щодо змішаної культури мікроорганізмів і її нейтралізація шляхом розведення

Досліджувані зразки	Розведення	Змішана культура мікроорганізмів				
		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6583	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	<i>Salmonella abortus</i> CIP-8039	
		Наявність чи відсутність росту				
Фенспіриду гідрохлорид	у 100 мл с-ща	–	–	–	–	–
Сорбат калію	“_“	–	–	–	–	–
Екстракт кореня солодки	“_“	+	+	+	+	+
Натрію сахаринат	“_“	+	+	+	+	+
Ванілін	“_“	–	–	–	–	–
Ароматизатор “Мед-ліпа”	“_“	+	+	+	+	+
Метилпарагідроксибензоат	“_“	–	–	–	–	–
Пропілпарагідроксибензоат	“_“	–	–	–	–	–
Сироп “Інспірон”	“_“	+	+	+	+	+
Контроль		+	+	+	+	+
Фенспіриду гідрохлорид	у 200 мл с-ща	–	–	–	–	–
Сорбат калію	“_“	+	+	+	+	+
Ванілін	“_“	–	–	–	–	–
Метилпарагідроксибензоат	“_“	–	–	–	–	–
Пропілпарагідроксибензоат	“_“	–	–	–	–	–
Контроль		+	+	+	+	+

**Примітка.** “+” – характерний ріст тест-мікроорганізму на відповідному селективному середовищі; “\_“ – відсутність росту тест-мікроорганізму на відповідному селективному середовищі.

Для уникнення псевдонегативних результатів аналізів щодо мікробіологічної чистоти лікарських засобів необхідно розробити точну схему нейтралізації антимікробної активності препарату чи його компонентів [3–5]. Тому на наступному етапі нашої роботи необхідно було підібрати методи нейтралізації антибактеріальної та протигрибкової активностей сорбату калію, фенспіриду гідрохлориду, ваніліну, метилпарагідроксибензоату та пропілпарагідроксибензоату.

Експериментально показано, що антимікробну активність сорбату калію можна нейтралізувати, використовуючи розведення 1:50, а щодо змішаної культури бактерій – шляхом збільшення об’єму поживних середовищ у 2 рази (табл. 3, 2).

Фенспіриду гідрохлорид добре розчинний у воді, що дало змогу для подальшої нейтралізації його антимікробної активності використати метод мембранної фільтрації. Підібрано об’єм 500 мл 0,9% розчину NaCl, використання якого знімало інгібуючу дію фенспіриду гідрохлориду на мікроорганізми і спостерігався ріст досліджуваних бактерій та грибів (табл. 4 і 5).

Антимікробну активність ваніліну, метилпарагідроксибензоату, пропілпарагідроксибензоату не вдалося нейтралізувати шляхом розведень (див. табл. 2, 3). Додавання розчину з 50 мл/л твіну-80, 50 г/л соєвого лецитину, 1 г/л гістидину гідрохлориду також не інактивувало антибактеріальну і протигрибкову активність цих компонентів препарату (табл. 6, 7). Так, ванілін навіть у присутності 50 г/л соєвого лецитину пригнічував ріст досліджуваних мікроорганізмів: кількість клітин *S. aureus* – у 2,7, *B. subtilis* – у 2,1, *E. coli* – у

2,4, *A. brasiliensis* – у 19,0, *C. albicans* – у 10,0 разів була нижчою, ніж у контролі. Метилпарагідроксibenзоат за даних умов також виявляв антимікробну активність: кількість *S. aureus* – у 4,3, *B. subtilis* – у 3,4, *E. coli* – у 2,0, *A. brasiliensis* та *C. albicans* у 3,6 разу була меншою, ніж у контролі. У присутності 50 г/л соєвого лецитину пропілпарагідроксibenзоат пригнічував ріст досліджуваних бактерій та грибів і значення КУО/мл було нижчим у 2,9 разу – для *S. aureus*, у 2,7 – *B. subtilis* і *E. coli*, у 4,1 – *A. brasiliensis* та у 6,2 разу – *C. albicans*, ніж у контролі (табл. 6). Антимікробну активність пропілпарагідроксibenзоату, метилпарагідроксibenзоату, ваніліну відносно змішаної культури мікроорганізмів також не вдалося нейтралізувати шляхом додавання інактивуючого комплексу (табл. 7). Тільки після застосування комбінованого методу нейтралізації антимікробної активності, а саме використовуючи розведення та додавання розчину з 50 мл/л твіну-80, 50 г/л соєвого лецитину, 1 г/л гістидину гідрохлориду, вдалось інгібувати антибактеріальну та протигрибкову активність вищезгаданих компонентів лікарського засобу (табл. 8, 9).

Таблиця 3

Вплив розведення компонентів препарату “Інспірон”  
на їхню антибактеріальну та протигрибкову активність

Досліджувані зразки	Розведення	Тест-штами мікроорганізмів				
		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6583	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	<i>Candida albicans</i> ATCC 885-653
		Кількість мікроорганізмів, КУО/мл				
Фенспіриду гідрохлорид	1:50	29,0±1,9	–	32,0±2,0	–	17,0±0,3
Сорбат калію	1:50	88,0±8,3	92,0±8,9	74,0±7,1	43,0±4,0	86,0±8,2
Ванілін	1:50	–	–	–	–	–
Метилпарагідроксibenзоат	1:50	–	–	–	–	–
Пропілпарагідроксibenзоат	1:50	–	–	–	–	–
Контроль		83,0±8,8	96,0±9,2	78,0±7,3	49,0±4,4	84,0±8,1
Фенспіриду гідрохлорид	1:100	54,0±1,2	10,0±0,8	56,0±2,2	19,0±1,7	28,0±1,5
Ванілін	1:100	–	–	–	–	–
Метилпарагідроксibenзоат	1:100	–	–	–	–	–
Пропілпарагідроксibenзоат	1:100	–	–	–	–	–
Контроль		83,0±8,7	95,0±8,9	79,0±7,7	49,0±4,5	84,0±7,8

Примітка. “–” – відсутність росту тест-мікроорганізмів.

Таблиця 4

Антимікробна активність фенспіриду гідрохлориду залежно від об’єму промивної рідини,  
використаного для мембранної фільтрації

Досліджувані зразки	Об’єм промивної рідини (NaCl, 0,9%, мл)	Тест-штами мікроорганізмів				
		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6583	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	<i>Candida albicans</i> ATCC 885-653
		Кількість мікроорганізмів, КУО/мл				
Фенспіриду гідрохлорид	100	–	–	7,0±0,8	–	6,0±0,8
	300	–	15,0±1,4	21,0±1,9	7,0±0,4	10,0±0,9
	500	65,0±5,2	74,0±6,6	61,0±5,9	43,0±3,5	54,0±5,3
Контроль		88,0±8,3	92,0±8,9	74,0±7,1	43,0±4,0	86,0±8,2

Примітка. “–” – відсутність росту тест-мікроорганізмів.

Таблиця 5

Вплив мембранної фільтрації та розведення у 200 мл середовища на інгібуючу дію фенспіриду гідрохлориду щодо змішаної культури мікроорганізмів

Досліджувані зразки	Об'єм промивної рідини (NaCl, 0,9%, мл)	Змішана культура мікроорганізмів			
		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6583	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	<i>Salmonella abony</i> CIP - 8039
Наявність чи відсутність росту					
Фенспіриду гідрохлорид	100	-	-	-	-
	300	-	+	-	-
	500	+	+	+	+
Контроль		+	+	+	+

Примітка. “-” – відсутність росту тест-мікроорганізмів.

Таблиця 6

Антибактеріальна та протигрибкова активність компонентів препарату “Інспірон” залежно від концентрації лецитину в інактивуючому розчині

Досліджувані зразки	Концентрація лецитину, %	Тест-штами мікроорганізмів				
		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6583	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	<i>Candida albicans</i> ATCC 885-653
Кількість мікроорганізмів, КУО/мл						
Ванілін	0,3	-	-	-	-	-
	1	-	4,0±0,3	15,0±1,2	-	-
	3	4,0±0,3	41,0±3,8	28,0±2,1	12,0±0,8	5,0±0,4
Метилпарагідроксибензоат	5	29,0±2,3	45,0±4,2	36,0±3,1	3,0±0,2	8,0±0,7
	0,3	5,0±0,4	10,0±0,9	3,0±0,2	-	-
	1	11,0±0,9	7,0±0,6	36,0±2,9	-	-
Пропілпарагідроксибензоат	3	16,0±1,1	36,0±3,2	35,0±3,1	8,0±7,7	18,0±1,4
	5	18,0±1,5	28,0±2,4	43,0±4,1	16,0±1,3	22,0±1,9
	0,3	-	11,0±0,8	-	-	-
Контроль	1	-	26,0±2,1	15,0±1,2	-	-
	3	24,0±2,1	32,0±2,9	24,0±2,1	12,0±1,1	9,0±0,8
	5	27,0±2,6	35,0±3,2	31,0±2,9	14,0±1,0	13,0±0,9

Примітка. “-” – відсутність росту тест-мікроорганізмів.

Таблиця 7

Антибактеріальна активність ваніліну, метилпарагідроксибензоату і пропілпарагідроксибензоату за впливу розчину з різними концентраціями соєвого лецитину

Досліджувані зразки	Концентрація лецитину, %	Змішана культура мікроорганізмів			
		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6583	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	<i>Salmonella abony</i> CIP-8039
Наявність чи відсутність росту					
Ванілін	0,3	-	-	-	-
	1	-	-	-	-
	3	-	-	-	-
Метилпарагідроксибензоат	5	-	+	-	+
	0,3	-	-	-	-
	1	-	-	-	-
Пропілпарагідроксибензоат	3	-	-	-	-
	5	-	+	-	-
	0,3	-	-	-	-
Контроль	1	-	-	-	-
	3	-	-	-	-
	5	-	+	-	+
		+	+	+	+

**Примітка.** “+” – характерний ріст тест-мікроорганізму на відповідному селективному середовищі; “-” – відсутність росту тест-мікроорганізму на відповідному селективному середовищі.

Таблиця 8

Вплив розведення і додавання 5% лецитину, 5% твіну – 80, 0,1% L-гістидину гідрохлориду на антимікробну активність компонентів препарату “Інспірон”

Досліджувані зразки	Розведення	Тест-штами мікроорганізмів				
		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6583	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	<i>Candida albicans</i> ATCC 885-653
Кількість мікроорганізмів, КУО/мл						
Ванілін	1:50	35,0±3,2	51,0±4,8	42,0±3,7	37,0±3,4	33,0±3,1
Метилпарагідроксибензоат	1:50	43,0±3,9	32,0±2,7	51,0±4,6	22,0±2,0	48,0±4,3
Пропілпарагідроксибензоат	1:50	36,0±3,3	34,0±3,1	58,0±5,7	22,0±1,8	35,0±3,2
Ванілін	1:100	58,0±5,5	72,0±6,8	70,0±6,8	44,0±4,1	63,0±5,9
Метилпарагідроксибензоат	1:100	75,0±7,2	92,0±8,9	83,0±7,8	54,0±5,1	81,0±7,7
Пропілпарагідроксибензоат	1:100	73,0±6,9	95,0±9,2	86,0±8,3	57,0±5,4	81,0±7,8
Контроль		77,0±7,4	95,0±9,2	84,0±8,1	56,0±5,3	79,0±7,5

Таблиця 9

Вплив розведення у 200 мл середовища та додавання інактивуючого комплексу на антибактеріальну активність ваніліну, метилпарагідроксибензоату і пропілпарагідроксибензоату

Досліджувані зразки	Змішана культура мікроорганізмів			
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6583	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	<i>Salmonella abony</i> СІР - 8039
Наявність чи відсутність росту				
Ванілін	+	+	+	+
Метилпарагідроксибензоат	+	+	+	+
Пропілпарагідроксибензоат	+	+	+	+
Контроль	+	+	+	+

**Примітка.** “+” – характерний ріст тест-мікроорганізму на відповідному селективному середовищі.

Встановлено, що сироп “Інспірон” і такі його компоненти як екстракт кореня солодки, натрію сахаринат, ароматизатор “Мед-липа” не проявляють ні антибактеріальної, ні протигрибкової активності. Сорбат калію повністю пригнічував ріст монокультур *S. aureus*, *A. brasiliensis* і змішаної культури тест-мікроорганізмів, а значення КУО/мл для *S. aureus*, *E. coli* та *C. albicans* були, відповідно, в 4,9, 5,6 і 9,4 разу меншими, ніж у контролі. Показано, що інгібуючу активність даної сполуки можна нейтралізувати, використовуючи розведення 1:50, а відносно змішаної культури мікроорганізмів – шляхом збільшення об’єму середовища у 2 рази. Фенспіриду гідрохлорид проявив бактерицидну і фунгіцидну дію на мікроорганізми *B. subtilis*, *A. brasiliensis*, а також на змішану культуру бактерій. Для нейтралізації антимікробної активності фенспіриду гідрохлориду слід використовувати метод мембранної фільтрації з використанням 5 порцій по 100 мл 0,9% розчину NaCl.

Ванілін, метилпарагідроксибензоат, пропілпарагідроксибензоат мають антибактеріальну і протигрибкову дію відносно всіх досліджених мікроорганізмів. Нейтралізувати антимікробну активність даних компонентів лікарського засобу можна завдяки поєднанню методів розведення та інактивації розчином з 50 мл/л твіну-80, 50 г/л соєвого лецитину, 1 г/л гістидину гідрохлориду.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Гунар О. В., Каграманова К. А., Сахно Н. Г. Требования к микробиологическому качеству лекарственных средств и процедур испытания в различных фармакопеях // Фармация. 2010. № 6. С. 9–14.
2. Гунар О. В. Микрофлора лекарственных средств и различные аспекты ее изучения // Хим.-фарм. журнал. 2011. № 2. С. 31–40.
3. Гунар О. В. Отражение научных и практических аспектов фармацевтической микробиологии в системе микробиологического контроля качества лекарственных средств // Вопросы биол., мед. и фарм. химии. 2010. № 12. С. 19–22.
4. Державна Фармакопея України. 1-е вид. Доп. 4. Х.: ДП „Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів”, 2011. 540 с.

5. Жернокльов В. М., Тисячна О. В. Схеми розробки методик визначення мікробіологічної чистоти нерозчинних у воді лікарських засобів, що мають антимікробну дію, за тестом «Визначення загального числа життєздатних аеробних мікроорганізмів» // Фармацевт. журнал. 2009. № 3. С. 78–85.
6. Одегова Т. Ф., Гунар О. В. Микробиологическая чистота – один из основных параметров стандартов GMP и GLP // Фармация. 2010. № 5. С. 8–9.
7. British Pharmacopoeia. London: Vol. I & II, 2009. 10952 p.
8. Clontz L. Microbial Limit and Bioburden Tests: Validation Approaches and Global Requirements - 2nd ed. CRC Press, 2009. 325 p.
9. European Pharmacopoeia – 7-ed. Strasbourg: European Directorate for the Quality of Medicines, 2011. 3256 p.
10. Gunar O. V. Aspects of investigating microflora contamination of drugs // Pharmaceutical Chem. J. 2011. Vol. 45. N 2. P. 93–102.
11. Jimenez L. Microbial contamination control in the pharmaceutical industry. New York: Marcel Dekker, Inc., 2004. 310 p.
12. USP Pharmacist's Pharmacopoeia. - 2-ed. Rockville: The United State Pharmacopoeia. Inc., 2008. 1519 p.

Стаття: надійшла до редакції 14.09.12

доопрацьована 24.10.12

прийнята до друку 26.10.12

## DETERMINATION AND NEUTRALIZATION OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF THE COMPONENTS OF MEDICINAL PRODUCT “INSPIRON”

Ya. Kolisnyk, N. Skochylyas

*Ivan Franko National University of Lviv  
4, Hrushevskyyi St., Lviv 79005, Ukraine  
e-mail: kolyaryna@yahoo.com*

The investigation of antimicrobial activity of components of new medicinal product “Inspiron” and methods of its neutralization have been done on the stage of pharmaceutical development. It was determined that “Inspiron” syrup and such components as liquorice root extract, sodium saccharinates, and honey-linden flavor does not show neither antifungal nor antibacterial activity. It was revealed that fenspiride hydrochloride completely inhibits growth of such test-microorganisms as *B. subtilis*, *A. brasiliensis* and of a mixed culture of microorganisms. Antimicrobial activity of fenspiride hydrochloride can be neutralized by the method of membrane filtration. Antimicrobial activity of potassium sorbate to *S. aureus*, *A. brasiliensis*, *C. albicans* and a mixed culture of microorganisms was revealed. It was shown that inhibition activity of this compound could be neutralized by a 1:50 dilution, and to mixed culture of microorganisms by 2-fold increasing of growth medium volume. Vanillin, propyl parahydroxybenzoate and methyl parahydroxybenzoate show antimicrobial activity to all investigated microorganisms. Neutralization of inhibition action of these components of investigated product can be achieved using combined method of neutralization of antimicrobial activity. It includes product dilution by 1:100 and addition of solution with inactivators.

*Keywords:* antibacterial and antifungal activity, neutralization.



**ОПРЕДЕЛЕНИЕ И НЕЙТРАЛИЗАЦИЯ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ  
КОМПОНЕНТОВ ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА “ИНСПИРОН”****Я. Колісник, Н. Скочиляс**

*Львовский национальный университет имени Ивана Франко  
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина  
e-mail: kolyaryna@yahoo.com*

На этапе фармацевтической разработки нового лекарственного средства “Инспирон” изучена антимикробная активность **компонентов, входящих в его состав**. Установлено, что сироп “Инспирон” и такие его компоненты, как экстракт корня солодки, натрия сахаринат, ароматизатор мёд-липа не проявляют антибактериальную, противогрибковую активность. Выявлено, что фенспирида гидрохлорид полностью подавляет рост тест-микроорганизмов *B. subtilis*, *A. brasiliensis* и смешанной культуры микроорганизмов. Противомикробное действие фенспирида гидрохлорида можно нейтрализовать методом мембранной фильтрации. Установлено бактерицидное и фунгицидное действие сорбата калия относительно *S. aureus*, *A. brasiliensis*, *C. albicans* и смешанной культуры микроорганизмов. Показано, что ингибирующее действие данного соединения можно нейтрализовать, используя разведения 1:50, а относительно смешанной культуры микроорганизмов – путем увеличения объема питательных сред в 2 раза. Ванилин, пропилпарагидроксibenзоат, метилпарагидроксibenзоат проявляют антимикробную активность **относительно всех исследуемых микроорганизмов**. Снятие угнетающего действия данных компонентов лекарственного средства можно достичь благодаря комбинированному методу нейтрализации антимикробной активности: разведению и добавлению инактивирующего раствора.

*Ключевые слова:* антибактериальная и противогрибковая активность, нейтрализация.

## ЗМІНИ РОЗМІРНОГО РОЗПОДІЛУ ТА ВІДНОСНОГО ВМІСТУ КЛІТИН СІРКОВІДНОВЛЮВАЛЬНИХ БАКТЕРІЙ *DESULFUROMONAS ACETOXIDANS* ЗА ВПЛИВУ СОЛЕЙ ПЕРЕХІДНИХ МЕТАЛІВ

О. Василів<sup>1</sup>, С. Гнатуш<sup>1</sup>, О. Білий<sup>2</sup>, В. Гетьман<sup>2</sup>, Я. Ференсович<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Львівський національний університет імені Івана Франка  
біологічний факультет, кафедра мікробіології  
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна  
e-mail: oresta.vasyliv@gmail.com

<sup>2</sup>Львівський національний університет імені Івана Франка  
факультет електроніки, кафедра фізичної та біомедичної електроніки  
вул. Драгоманова, 5, Львів 79005, Україна

Досліджено зміни розмірного розподілу та відносного вмісту клітин сірковідновлювальних бактерій *D. acetoxidans* упродовж п'яти діб їхнього культивування за впливу 0,01–10 мМ CoCl<sub>2</sub>, NiCl<sub>2</sub> та MnCl<sub>2</sub>. Максимум розмірного розподілу клітин бактерій змінювався у межах 0,55–0,70 мкм за наявності MnCl<sub>2</sub> в середовищі, 0,49–0,70 мкм – за впливу CoCl<sub>2</sub> та 0,55–0,62 мкм – за внесення NiCl<sub>2</sub>. Зменшення півширини кривих розмірного розподілу та зростання відносного вмісту клітин із максимумом розмірного розподілу на третю добу культивування бактерій за впливу 0,01 мМ досліджуваних солей металів свідчило про найінтенсивніший поділ клітин протягом цього етапу культивування за наведених умов. Внесення 10 мМ MnCl<sub>2</sub> у ростове середовище *D. acetoxidans* зумовлювало підвищення поділу бактерій, порівняно з впливом аналогічних концентрацій NiCl<sub>2</sub> та CoCl<sub>2</sub>.

*Ключові слова:* *Desulfuromonas acetoxidans*, максимум розмірного розподілу, півширина кривих розмірного розподілу, перехідні метали.

Проблема захисту навколишнього середовища від антропогенного забруднення різними металами надзвичайно актуальна. Одним із основних напрямів її розв'язання є застосування екологічних біотехнологій, що ґрунтуються на ефективних біологічних механізмах детоксикації небезпечних речовин мікроорганізмами [1, 11]. *Desulfuromonas acetoxidans* – безбарвні сірковідновлювальні бактерії розміром 0,4–0,8×1–4 мкм, що населяють збагачені сіркою водні середовища. Взаємодія гідроген сульфідів, який утворюється цими бактеріями, з іонами металів зумовлює їхнє часткове зв'язування та утворення нерозчинних осадів у формі метал сульфідів, що нівелює їхній токсичний вплив на живі організми.

Дослідження розмірного розподілу та відносного вмісту клітин бактерій нормальної мікрофлори природних середовищ, зокрема *D. acetoxidans*, за впливу різних концентрацій перехідних металів дасть змогу здійснити цілісний аналіз змін поділу та росту клітин за наведених умов із можливим встановленням механізмів їхньої резистентності за дії цих елементів. Визначення розмірного розподілу клітин оптичними методами, за літературними даними, можливе лише в рамках теорій Релея, Релея-Ганса і теорії розсіяння Мі [7, 14].

Для визначення вмісту клітин мікроорганізмів у середовищі використовують різноманітні методи їхньої реєстрації. Серед методів швидкої реєстрації наявності та кількості мікроорганізмів найширшого впровадження набули імунологічні методи із застосуванням різноманітних оптичних, електрохімічних, імуномагнітних методик з

використанням мікропроточних приладів і без їхнього застосування [9, 12]. До них належать метод розсіювання світла [13] та флуоресцентні методи, що ґрунтуються на аналізі зміни інтенсивності свічення молекул-маркерів при їхній взаємодії із клітинами бактерій. Поєднання флуоресцентних методів аналізу з методом розсіювання світла використовується у методі проточної цитометрії. Також широкого застосування набув метод визначення біомаси мікроорганізмів, що базується на реєстрації змін мутності рідкого поживного середовища у процесі культивування мікроорганізмів [10]. Недоліком вказаного способу реєстрації кількості мікроорганізмів є довготривалість аналізу та значні похибки вимірювань при низькій вихідній концентрації клітин мікроорганізмів на початку їхнього культивування. Метод швидкої реєстрації кількості бактерій, що базується на аналізі зміни інтенсивності свічення флуоресцентних молекул-маркерів у поєднанні із молекулярними фрагментами клітин бактерій значно чутливіший, порівняно з методом реєстрації мутності бактерійної суспензії. Флуоресцентні методи при певному підборі молекул-маркерів дають змогу реєструвати бактерійні культури на рівні 10 клітин/мл. Але складність і значна собівартість аналізу заважають його широкому використанню.

Розробка нових методів швидкої реєстрації змін розмірного розподілу та відносного вмісту клітин мікроорганізмів з високою чутливістю і низькою собівартістю є актуальною проблемою цитометричних досліджень.

Тому метою нашої роботи було дослідити зміни розмірного розподілу та відносного вмісту клітин сірководновольовальних бактерій *D. acetoxidans* за впливу кобальт (II) хлориду, нікель (II) хлориду та манган (II) хлориду в процесі їхнього культивування протягом п'яти діб за допомогою нового методу швидкої реєстрації клітин мікроорганізмів на основі змін їхніх світлорозсіювальних властивостей.

#### Матеріали та методи

Для визначення змін розмірного розподілу та відносного вмісту клітин бактерій *D. acetoxidans* запропоновано метод, що базується на реєстрації змін інтенсивності розсіяного світла шляхом статистичного набору змін амплітуди і тривалості імпульсів для частинок заданого розміру, побудові на основі одержаних даних вимірювання кореляційної функції, що виражає статистичні характеристики інтенсивності розсіювання світла досліджуваними клітинами, і одержання розподілу клітин за розмірами шляхом розв'язування інтегрального рівняння Фредгольма першого роду (1) [4, 8]:

$$F(U, t) = \int_{r_{\min}}^{r_{\max}} K(U, t, r) n(r) d(r), \quad (1)$$

де:  $r_{\min}$  і  $r_{\max}$  – верхня й нижня межі діапазону розмірів частинок, що реєструються;  $n(r)$  – функція розподілу частинок за розмірами;  $K(U, t, r)$  – функція розподілу нормованих значень амплітуд і тривалості реєстрованих імпульсів розсіяного світла калібрувальних частинок, отримана в результаті попереднього зондування потоку рідини монохроматичним когерентним світлом полімерних латексів заданого розміру, і відомим показником заломлення.

Бактерії *D. acetoxidans* культивували у модифікованому середовищі Постгейта С [3] протягом п'яти діб, визначаючи часову залежність зміни кількості клітин і фонових часток та їхніх розмірів у культуральному середовищі. Для цього поживне середовище з клітинами і без них розводили в однакових пропорціях у високоочищеній деіонізованій воді. Окремо визначали загальну кількість бактерійних клітин і фонових часток у пробах з клітинами, а також загальний розмірний розподіл фонових часток у пробах без клітин.

У вибраному інтервалі розмірів визначали кількість клітин бактерій і їхній відносний вміст шляхом розрахунку відношення кількості клітин у певному розмірному діапазоні до їхнього загального вмісту. Відносний вміст клітин вимірювали у відносних одиницях. На основі отриманих даних одержували залежності змін розмірного розподілу клітин і їхнього відносного вмісту у вибраному інтервалі розмірів з часом культивування.

При дослідженні впливу  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{NiCl}_2$  та  $\text{MnCl}_2$  на світлорозсіювальні параметри клітин *D. acetoxidans* з використанням описаного методу бактерії вирощували у пробірках об'ємом 20 мл у модифікованому середовищі Постгейта С при 28°C за анаеробних умов. У середовище вносили 0,01; 0,1; 1,0 та 10 мМ досліджуваних солей металів. Відбирали 1 мл суспензії бактерій через 1, 2, 3 та 4 доби культивування, розводили у 100 разів і проводили вимірювання за допомогою пристрою ПРМ-6М, розробленого на кафедрі фізичної та біомедичної електроніки факультету електроніки ЛНУ імені Івана Франка. Отримані результати порівнювали з контролем № 1 (середовище культивування бактерій, у яке додатково не вносили солей досліджуваних металів).

Основні характеристики пристрою швидкої реєстрації мікроорганізмів ПРМ-6М методом розсіювання світла наведені нижче:

Розмірний діапазон реєстрованих мікроорганізмів, мкм	0,2-10,0
Похибка вимірювання розмірів частинок, %	5,0
Концентрація мікрочастинок, клітин/мл	$\geq 1000$

З метою уникнення похибок, зумовлених додатковим світлорозсіянням частинками утворених метал сульфідів при дослідженні розмірного розподілу та відносного вмісту клітин *D. acetoxidans* за впливу  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{NiCl}_2$  та  $\text{MnCl}_2$  використовували контрольні проби № 2. Вони містили солі досліджуваних металів у відповідних концентраціях і середовище культивування бактерій в однакових об'ємах, порівняно з дослідними зразками, й еквівалентну кількість  $\text{Na}_2\text{S} \times 9\text{H}_2\text{O}$  до утвореного гідроген сульфід іону *D. acetoxidans* на певному етапі вирощування за відповідних умов культивування.

Кількість  $\text{HS}^-$  у культуральній рідині визначали фотометрично з використанням фотоелектроколориметра КФК-3 ( $\lambda=665$  нм, кювета з оптичним шляхом 30 мм) за рівнем утворення метиленової сині в результаті взаємодії  $\text{HS}^-$  з п-аміно-диметиланіліном [2].

### Результати і їхнє обговорення

Для цілісного аналізу особливостей росту й поділу клітин бактерій *D. acetoxidans* у процесі їхнього росту протягом п'яти діб за впливу 0,01–10 мМ  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{MnCl}_2$  та  $\text{NiCl}_2$  досліджували кореляцію між змінами їхнього максимуму розмірного розподілу, відносного вмісту з максимумом розмірного розподілу та півширини кривих розмірного розподілу.

Діапазон розмірного розподілу клітин *D. acetoxidans* становив 0,3–1,9 мкм. У контрольних зразках максимум розмірного розподілу клітин набував значень 0,49–0,55 мкм, а відносний вміст клітин із максимумом розмірного розподілу змінювався від 0,275 до 0,398 відносних одиниць при зростанні часу вирощування з першої до п'ятої доби (табл. 1). Півширина кривих розмірного розподілу зменшувалася від 0,23 до 0,14 мкм зі збільшенням часу культивування бактерій з першої по третю доби, що свідчить про звуження вибірки розмірів клітин зі зростанням часу їхнього вирощування. Це явище, очевидно, зумовлено інтенсивним поділом бактерій на третю-четверту доби культивування, у результаті чого підвищується відносний вміст клітин із нижчим максимумом розмірного розподілу (0,49 мкм), порівняно з його вихідним значенням (0,55 мкм). Ймовірне пригнічення поділу бактерій на п'яту добу призводило до зростання відносного вмісту клітин із максимумом розмірного розподілу (0,55 мкм).

Таблиця 1

Зміни максимуму розмірного розподілу клітин бактерій *D. acetoxidans*, їхнього відносного вмісту з максимумом розмірного розподілу та півширини кривих розмірного розподілу протягом п'яти діб культивування у контрольних зразках без додаткового внесення солей металів

Тривалість культивування, доба	Максимум розмірного розподілу клітин бактерій <i>D. acetoxidans</i> , мкм	Відносний вміст клітин із максимумом розмірного розподілу, відносні од.	Півширина кривих розмірного розподілу, мкм
1	0,55	0,275	0,23
2	0,55	0,268	0,23
3	0,55	0,420	0,14
4	0,49	0,383	0,14
5	0,55	0,398	0,16

Встановлено, що максимум розмірного розподілу клітин *D. acetoxidans* зменшувався від 0,62 до 0,49 мкм зі збільшенням тривалості культивування досліджуваних бактерій з першої по третю доби за впливу 0,01 мМ  $\text{CoCl}_2$  у середовищі (табл. 2). Відносний вміст клітин із максимумом розмірного розподілу підвищився на 32% на третю добу вирощування бактерій, порівняно з його початковим значенням, а півширина кривої розмірного розподілу клітин зменшилася від 0,25 до 0,17 мкм, що свідчить про звуження вибірки клітин різних розмірів на цій фазі росту.

Таблиця 2

Зміни максимуму розмірного розподілу клітин бактерій *D. acetoxidans*, їхнього відносного вмісту з максимумом розмірного розподілу та півширини кривих розмірного розподілу протягом п'яти діб культивування за впливу 0,01 мМ та 10 мМ  $\text{CoCl}_2$  у середовищі

Тривалість культивування, доба	Максимум розмірного розподілу клітин бактерій <i>D. acetoxidans</i> , мкм		Відносний вміст клітин із максимумом розмірного розподілу, відносні од.		Півширина кривих розмірного розподілу, мкм	
	Концентрація $\text{CoCl}_2$ у середовищі, мМ					
	0,01	10	0,01	10	0,01	10
1	0,62	0,55	0,249	0,329	0,25	0,19
2	0,62	0,55	0,261	0,266	0,25	0,26
3	0,49	0,62	0,328	0,259	0,17	0,25
4	0,49	0,70	0,289	0,176	0,22	0,43
5	0,55	0,62	0,415	0,320	0,15	0,19

Наведені зміни, очевидно, обумовлені зростанням інтенсивності поділу бактерій протягом цього часового періоду. Відомо, що іони Кобальту відіграють важливу роль у регуляції активності ферментів, зокрема тих, що здійснюють процеси трансамінування амінокислот [6]. Очевидно, за низьких концентрацій  $\text{Co}^{2+}$  зумовлюють пришвидшення поділу клітин досліджуваних бактерій порівняно з їхнім культивуванням за відсутності цього металу в середовищі.

Показано зміни світлорозсіювальних параметрів клітин сірковідновлювальних бактерій *D. acetoxidans* за впливу 10 мМ  $\text{CoCl}_2$  у середовищі (табл. 2). Встановлено, що за наведених умов максимум розмірного розподілу клітин збільшувався від 0,55 до 0,70 мкм з першої по четверту доби культивування. Відносний вміст клітин із максимумом розмірного розподілу зменшувався на 87%, а півширина кривої розмірного розподілу зростала у 2,3 разу відповідно, порівняно з їхніми початковими значеннями протягом наведеного часу вирощування бактерій. Очевидно, за цього впливу солі Кобальту інтенсивно пригнічувалися процеси поділу клітин *D. acetoxidans*, унаслідок чого розмір

їхньої найвищої частки становив 0,70 мкм, що було більшим на 27%, порівняно з контролем. Можливо, це обумовлено відсутністю розходження клітин після поділу їхнього нуклеоїда внаслідок тривалого впливу високих концентрацій  $\text{CoCl}_2$  на досліджувані бактерії. Високе значення півширини кривої розмірного розподілу, отримане на четверту добу культивування бактерій, свідчило про значну варіабельність розмірів клітин на цьому етапі вирощування. Отримані дані демонструють пригнічення процесів поділу клітин, порівняно з контрольними зразками. Інтенсивне зменшення півширини кривої розмірного розподілу клітин на п'яту добу культивування свідчить про зростання частки клітин із максимумом розмірного розподілу, що становив 0,62 мкм. Це показує наявність прямо пропорційної залежності пригнічення процесів поділу клітин *D. acetoxidans* при збільшенні тривалості впливу високого вмісту  $\text{CoCl}_2$  у середовищі (10 мМ).

Досліджено вплив 0,01–10 мМ  $\text{NiCl}_2$  на зміни максимуму розмірного розподілу клітин, їхнього відносного вмісту з максимумом розмірного розподілу та півширину кривих розмірного розподілу протягом п'яти діб культивування (табл. 3). Встановлено, що за внесення нікель (II) хлориду в концентрації 0,01 мМ у середовище вирощування бактерій максимум розмірного розподілу клітин змінювався у межах 0,55–0,62 мкм. Зменшення півширини кривої розмірного розподілу на 57% на третю добу культивування, порівняно з її початковим значенням, свідчить про низьку варіабельність розмірів клітин на цьому етапі вирощування. При цьому спостерігали інтенсивне зростання відносного вмісту клітин із максимумом розмірного розподілу, що становив 0,55 мкм. Отримані дані демонструють підвищення інтенсивності процесів поділу клітин на третю добу їхнього культивування. Максимум розмірного розподілу клітин не змінювався, порівняно з його значенням, отриманим у контрольних зразках на цьому етапі вирощування бактерій, що свідчить про відсутність негативного впливу наведеної концентрації солі Нікелю (0,01 мМ) на процеси росту й поділу *D. acetoxidans*. Часткове збільшення максимуму розмірного розподілу клітин протягом першої та другої діб культивування бактерій, порівняно з контролем, імовірно, зумовлене інтенсивнішим зростанням розмірів клітин за наявності іонів Нікелю у середовищі, що можуть використовуватись *D. acetoxidans* як мікроелементи, необхідні для функціонування їхніх ферментів, зокрема NiFe-гідрогенази тощо [5].

Таблиця 3

Зміни максимуму розмірного розподілу клітин бактерій *D. acetoxidans*, їхнього відносного вмісту з максимумом розмірного розподілу та півширини кривих розмірного розподілу протягом п'яти діб культивування за впливу 0,01 мМ та 10 мМ  $\text{NiCl}_2$  у середовищі

Тривалість культивування, доба	Максимум розмірного розподілу клітин бактерій <i>D. acetoxidans</i> , мкм		Відносний вміст клітин із максимумом розмірного розподілу, відносні од.		Півширина кривих розмірного розподілу, мкм	
	Концентрація $\text{NiCl}_2$ у середовищі, мМ					
	0,01	10	0,01	10	0,01	10
1	0,55-0,62	0,49-0,55	0,165-0,171	0,178-0,179	0,36	0,34
2	0,55-0,62	0,55-0,62	0,183-0,175	0,173-0,168	0,32	0,31
3	0,55	0,55	0,249	0,200	0,23	0,28
4	0,55	0,55	0,187	0,172	0,30	0,33
5	0,55	0,55	0,254	0,237	0,21	0,27

Показано, що півширина кривих розмірного розподілу клітин *D. acetoxidans* не знає суттєвих змін протягом п'яти діб культивування бактерій за впливу 10 мМ нікель (II) хлориду в середовищі (табл. 3). Це свідчить про незначну варіабельність вибірки розмірів

клітин протягом досліджуваного часу культивування, що обумовлено низькою інтенсивністю процесів їхнього поділу. Незначне зростання відносного вмісту клітин із максимумом розмірного розподілу на третю і п'яту доби культивування, ймовірно, обумовлено частковим підвищенням проходження їхнього поділу, в результаті чого максимум розмірного розподілу клітин набував стабільного значення – 0,55 мкм.

Отже,  $\text{NiCl}_2$  зумовлює часткове інгібування поділу *D. acetoxidans* за високих концентрацій, тоді як за низького вмісту в середовищі сприяє зростанню розмірів їхніх клітин на початкових етапах впливу та подальший інтенсивний поділ.

Досліджено зміни максимуму розмірного розподілу клітин *D. acetoxidans*, їхнього відносного вмісту з максимумом розмірного розподілу та півширини кривих розмірного розподілу за впливу 0,01 мМ  $\text{MnCl}_2$  протягом п'яти діб культивування (табл. 4). Встановлено, що за наявності мінімальної досліджуваної концентрації манган (II) хлориду в середовищі максимум розмірного розподілу клітин зменшувався з 0,55 до 0,49 мкм на третю добу їхнього культивування з одночасним зменшенням півширини кривої розмірного розподілу на 83% та збільшенням відносного вмісту клітин із максимумом розмірного розподілу на 32%, порівняно з їхніми вихідними значеннями. Це, очевидно, свідчить про високу активність процесів поділу клітин *D. acetoxidans* за наведених умов культивування протягом досліджуваного часового періоду внаслідок інтенсивного зростання частки клітин однакового розміру, значення якого є меншим, порівняно з даними, отриманими на початкових етапах їхнього вирощування.

Таблиця 4

Зміни максимуму розмірного розподілу клітин бактерій *D. acetoxidans*, їхнього відносного вмісту з максимумом розмірного розподілу та півширини кривих розмірного розподілу протягом п'яти діб культивування за впливу 0,01 та 10 мМ  $\text{MnCl}_2$  у середовищі

Тривалість культивування, доба	Максимум розмірного розподілу клітин бактерій <i>D. acetoxidans</i> , мкм		Відносний вміст клітин із максимумом розмірного розподілу, відносні од.		Півширина кривих розмірного розподілу, мкм	
	Концентрація $\text{MnCl}_2$ у середовищі, мМ					
	0,01	10	0,01	10	0,01	10
1	0,55	0,70	0,344	0,224	0,22	0,34
2	0,55	0,55	0,277	0,450	0,22	0,14
3	0,49	0,62	0,453	0,252	0,12	0,26
4	0,49	0,49	0,247	0,419	0,25	0,14
5	0,55	0,55	0,378	0,373	0,16	0,16

Зростання часу культивування бактерій до п'ятої доби зумовлювало підвищення відносного вмісту клітин із максимумом розмірного розподілу, що становив 0,55 мкм, з одночасним зменшенням півширини кривої розмірного розподілу. Отримані дані свідчать про пригнічення інтенсивності процесів поділу клітин зі збільшенням часу культивування та зростання частки клітин більшого розміру, порівняно з попередніми етапами культивування за наведених умов. Отже, низький вміст  $\text{MnCl}_2$  у середовищі не виявляє негативного впливу на процеси поділу досліджуваних бактерій.

Проаналізовано зміни світлорозсіювальних властивостей клітин *D. acetoxidans* за впливу 10 мМ  $\text{MnCl}_2$  у середовищі (табл. 4). Встановлено зменшення максимуму розмірного розподілу клітин від 0,70 до 0,55 мкм та відповідне звуження півширини кривої розмірного розподілу в 2,4 рази з першої по другу доби їхнього культивування. Це свідчить

про швидке зростання розміру клітин на початкових етапах дії солі Мангану та про їхній подальший інтенсивний поділ зі зменшенням значення максимуму розмірного розподілу на 27%, порівняно з першою добою. При подальшому культивуванні бактерій цей параметр підвищувався від 0,55 до 0,62 мкм з одночасним зростанням півширини кривої розмірного розподілу як результату пригнічення поділу клітин. На четверту добу вирощування спостерігали зменшення значення максимуму розмірного розподілу до 0,49 мкм та звуження півширини кривої розмірного розподілу на 86%, порівняно з попередньою добою, що, очевидно, свідчить про ймовірне відновлення поділу клітин. Подальше культивування бактерій продемонструвало зростання максимуму розмірного розподілу клітин від 0,49 до 0,55 мкм з незначним підвищенням півширини кривої розмірного розподілу, що, ймовірно, є результатом часткового пригнічення процесів поділу *D. acetoxidans*. Очевидно, за високого вмісту манган (II) хлориду в середовищі скорочуються фази росту досліджуваних бактерій, порівняно з контролем, внаслідок чого пришвидшуються процеси їхнього поділу.

Отже, внаслідок проведених досліджень встановлено, що за впливу 0,01–10 мМ солей Мангану, Кобальту й Нікелю на сірковідновлювальні бактерії *D. acetoxidans* протягом п'яти діб вирощування максимум розмірного розподілу клітин змінювався у межах 0,55–0,70 мкм за впливу  $MnCl_2$ , 0,49–0,70 мкм – за наявності  $CoCl_2$  у середовищі вирощування бактерій та 0,55–0,62 мкм – за впливу досліджуваних концентрацій  $NiCl_2$ . За внесення 0,01 мМ досліджуваних солей металів у середовище культивування бактерій найнижче значення півширини кривих розмірного розподілу клітин було зафіксовано на третю добу культивування, що свідчить про вузьку вибірку їхніх розмірів і відповідно інтенсивний поділ за цих умов. Це підтверджується інтенсивним підвищенням відносного вмісту клітин із максимумом розмірного розподілу протягом цього періоду вирощування бактерій, порівняно з першою та другою добами їхнього культивування. Наявність 10 мМ  $MnCl_2$  у середовищі культивування *D. acetoxidans* зумовлювала значну мінливість максимуму розмірного розподілу клітин, півширини кривих їхнього розмірного розподілу та відносного вмісту з максимумом розмірного розподілу, порівняно з впливом наведеної концентрації інших солей металів протягом п'яти діб культивування. Очевидно, високі концентрації Мангану зумовлюють пришвидшення перебігу процесів поділу клітин бактерій *D. acetoxidans*.

Отримані результати можуть стати основою для розробки нових високочутливих селективних біосенсорів забруднення навколишнього середовища різними металами на підставі аналізу залежностей між змінами розмірів клітин нормальної мікрофлори навколишнього середовища, зокрема сірковідновлювальних бактерій, і наявністю різних концентрацій  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  тощо у їхніх екологічних нішах. Також наведений метод дає можливість простежувати зміни поділу клітин мікроорганізмів, що може використовуватися для аналізу цих процесів за різних умов їхнього культивування, а також для розробки ефективних цитометрів із низькою собівартістю й високою швидкодією.

Вперше застосовано новий високочутливий метод визначення змін світлорозсіювальних параметрів клітин для дослідження впливу солей перехідних металів на розмірний розподіл і відносний вміст клітин бактерій *D. acetoxidans*. Встановлено, що за впливу 0,01–10 мМ солей перехідних металів протягом п'яти діб культивування бактерій максимум розмірного розподілу клітин змінюється у межах 0,55–0,70 мкм за наявності  $MnCl_2$  у середовищі, 0,49–0,70 мкм – за впливу  $CoCl_2$  та 0,55–0,62 мкм – за внесення  $NiCl_2$ . Значення півширини кривих розмірного розподілу клітин *D. acetoxidans* суттєво знижуються на третю добу їхнього культивування з одночасним підвищенням відносного вмісту клітин



із максимумом розмірного розподілу за впливу 0,01 мМ досліджуваних солей металів, що свідчить про найінтенсивніший поділ бактерій за наведених умов протягом цього періоду росту. За дії 10 мМ  $MnCl_2$  на *D. acetoxidans* швидкість поділу їхніх клітин зростає, порівняно з впливом цих концентрацій  $NiCl_2$  та  $CoCl_2$ .

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Таширеєв А. Б. Взаимодействие микроорганизмов с металлами // Микробиол. журн. 1995. Т. 57. № 2. С. 95–104.
2. Пат. 6340596 США, МКИ G 01 N 33/00 Reagent composition for measuring hydrogen sulfide and method for measuring hydrogen sulfide / Sugiyama M. (Японія); Fujirebio Inc. N 6340596; Заявл. 11.02.1999; Опубл. 22.01.2002; НКИ 436/121. 9 с.
3. Biebl H., Pfennig N. Growth of sulfate-reducing bacteria with sulfur as electron acceptor // Arch. Microbiol. 1977. Vol. 112. P. 115–117.
4. Білий О. І., Гетман В. В., Костюкевич С. О. New method for investigation of cells and other biological objects in analytical cytology // Proc. SPIE. 2001. Vol. 4260. P. 249–254.
5. Brugna M., Nitschke W., Toci R. et al. First evidence for the presence of a hydrogenase in the sulfur-reducing bacterium *Desulfuromonas acetoxidans* // J. Bacteriol. 1999. Vol. 181. N 17. P. 5505–5508.
6. Cavet S. J., Borrelly G. M., Robinson N. J. Zn, Cu, Co in cyanobacteria: selective control of metal availability // FEMS Microbiol. Reviews. 2003. Vol. 27. P. 165–181.
7. Katz A., Alimova A., Xu M. Bacteria size determination by elastic light scattering // IEEE J. Selected Topics in Quantum Electronics. 2003. Vol. 9. N 2. P. 277–287.
8. Kotsyumbas I. Ya., Kushnir I. M., Білий Р. О. et al. Light scattering application for bacterial cell monitoring during cultivation process // Proc. SPIE. 2007. Vol. 6631. P. 66311I–8I – 8.
9. Lazcka O., Campob F., Munoz F. Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors // Biosensor and Bioelectronics. 2007. Vol. 22. N 7. P. 1205–1217.
10. Marcelis J. H., Versteeg H., Beck H. J., Vinke D. Semielectronic turbidimeter for automated monitoring of bacterial growth in test tubes // Appl. Environ. Microbiol. 1980. Vol. 39. N 2. P. 281–284.
11. Nies D. H. Minireview: microbial heavy-metal resistance // Appl. Microbial Biotechnol. 1999. Vol. 51. P. 730–750.
12. Sakamoto C., Yamaguchi N., Yamada M. et al. **Rapid quantification of bacterial cells in portable water using a simplified microfluidic device** // J. Microbiolog. Methods. 2007. Vol. 68. N 3. P. 643–647.
13. Wang R., Liow E., Keay P. Detection of *Escherichia coli* O157 in raw beef using a ccd based light scattering instrument // J. Rapid Methods and Automation in Microbiol. 2002. Vol. 10. N 4. P. 245–254.
14. Yguerabide J., Yguerabide E. Light-scattering submicroscopic particles as highly fluorescent analogs and their use as tracer labels in clinical and biological applications // Analytical Biochem. 1998. Vol. 262. N 2. P. 137–156.

Стаття: надійшла до редакції 14.09.12

прийнята до друку 16.11.12

**CHANGES OF SIZE DISTRIBUTION AND RELATIVE CONTENT  
OF SULFUR-REDUCING *DESULFUROMONAS ACETOXIDANS* BACTERIAL  
CELLS UNDER THE INFLUENCE OF TRANSITION METAL SALTS**

**O. Vasyliv<sup>1</sup>, S. Hnatush<sup>1</sup>, O. Bilyy<sup>2</sup>, V. Hetman<sup>2</sup>, Ya. Ferensovych<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Ivan Franko National University of Lviv  
Biological Faculty, Department of Microbiology  
4, Hrushevskiy St., Lviv 79005, Ukraine  
e-mail: oresta.vasyliv@gmail.com*

<sup>2</sup>*Ivan Franko National University of Lviv  
Faculty of Electronics, Department of Physical and Biomedical Electronics  
50, Drahomanov St., Lviv 79005, Ukraine*

Changes of cell size distribution and their relative content of sulfur-reducing *Desulfuromonas acetoxidans* bacteria under the influence of 0.01–10 mM of CoCl<sub>2</sub>, NiCl<sub>2</sub> and MnCl<sub>2</sub> have been investigated during five days of bacterial cultivation. Cell size distribution maximum changed in the range of 0.55–0.70 μm under the addition of MnCl<sub>2</sub> into growth medium, 0.49–0.70 μm under the influence of CoCl<sub>2</sub> and 0.55–0.62 μm under the addition of NiCl<sub>2</sub>. Decreasing of half-width of cell size distribution curve and increasing of cells relative content with size distribution maximum by third day of bacterial cultivation under the influence of 0.01 mM of investigated metal salts showed the most intensive cells division during this stage of their growth under chosen cultivation conditions. Addition of 10 mM of MnCl<sub>2</sub> into *D. acetoxidans* growth medium caused enhancement of bacterial division in comparison with the influence of the same NiCl<sub>2</sub> and CoCl<sub>2</sub> concentrations.

*Keywords:* *Desulfuromonas acetoxidans*, size distribution maximum, half-width of size distribution curves, transition metals.

**ИЗМЕНЕНИЕ РАЗМЕРНОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ И ОТНОСИТЕЛЬНОГО  
СОДЕРЖАНИЯ КЛЕТОК СЕРОВОССТАНАВЛИВАЮЩИХ  
БАКТЕРИЙ *DESULFUROMONAS ACETOXIDANS* ПРИ ВЛИЯНИИ  
СОЛЕЙ ПЕРЕХОДНЫХ МЕТАЛЛОВ**

**О. Васи́ливі, С. Гнатуш, А. Білий, В. Гетьман, Я. Ференсович**

<sup>1</sup>*Львовский национальный университет имени Ивана Франко  
биологический факультет, кафедра микробиологии  
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина  
e-mail: oresta.vasyliv@gmail.com*

<sup>2</sup>*Львовский национальный университет имени Ивана Франко  
факультет электроники, кафедра физической и биомедицинской  
электроники  
ул. Драгоманова, 50, Львов 79005, Украина*

Исследовано изменение размерного распределения и относительного содержания клеток серовосстанавливающих бактерий *D. acetoxidans* при воздействии 0,01–10 мМ CoCl<sub>2</sub>, NiCl<sub>2</sub> и MnCl<sub>2</sub> в течение пяти суток их культивирования. Максимумы

размерного распределения клеток бактерий наблюдали в пределах 0,55–0,70 мкм при наличии  $MnCl_2$  в среде, 0,49–0,70 мкм – при влиянии  $CoCl_2$  и 0,55–0,62 мкм – при внесении  $NiCl_2$ . Уменьшение полуширины кривой размерного распределения и увеличение относительного содержания клеток с максимумом размерного распределения на третьи сутки культивирования бактерий при воздействии 0,01 мМ исследуемых солей металлов свидетельствовало о наиболее интенсивном делении клеток на этом этапе культивирования при заданных условиях. Внесение 10 мМ  $MnCl_2$  в ростовую среду *D. acetoxidans* приводило к повышению деления бактерий по сравнению с влиянием аналогичных концентраций  $NiCl_2$  и  $CoCl_2$ .

*Ключевые слова:* *Desulfuromonas acetoxidans*, максимум размерного распределения, полуширина кривых размерного распределения, переходные металлы.

**ФІЗІОЛОГІЯ ЛЮДИНИ І ТВАРИН**

УДК 612.017.2+612.273+612.766.1:796

**СТІЙКІСТЬ РЕАКЦІЙ КАРДІОРЕСПІРАТОРНОЇ СИСТЕМИ ЗА УМОВ  
ДОСЯГНЕННЯ МАКСИМАЛЬНОГО РІВНЯ СПОЖИВАННЯ КИСНЮ У  
КВАЛІФІКОВАНИХ СПОРТСМЕНІВ-БІГУНІВ**

**О. Лисенко**

*Науково-дослідний інститут Національного університету фізичного  
виховання і спорту України  
вул. Фізкультури, 1, Київ-150, 03680, Україна  
e-mail: luslena@rambler.ru*

Виявлено негативний взаємозв'язок між характеристиками чутливості КРС на  $\text{CO}_2\text{-H}^+$ -стимул і рівнем реакцій КРС за умов аеробного навантаження максимальної потужності. Відзначили протилежну взаємозалежність між рівнем чутливості КРС на  $\text{CO}_2\text{-H}^+$ -стимул та рівнем економічності і стійкості функціонування, а також позитивний взаємозв'язок із рівнем активності анаеробних гліколітичних процесів у енергозабезпеченні фізичних навантажень.

*Ключові слова:* кваліфіковані спортсмени, реактивність, кардіореспіраторна система, фізична працездатність.

Механізми адаптації при різних впливах середовища та фізичних навантажень мають як загальні, так і індивідуальні риси. Спортсмени різної спеціалізації відрізняються між собою високою фізичною працездатністю насамперед у звичних для них видах м'язової діяльності. Зазвичай, це має бути пов'язано з відповідними морфофункціональними і фізіологічними пристосувальними механізмами. Такі відмінності формуються на основі індивідуальних спадкових властивостей протягом певного періоду накопичення однотипних по головному механізму тренувальних впливів на організм спортсмена [11, 14]. Специфіка умов конкретного виду м'язової діяльності чітко відображається на рівні та динамічних характеристиках реакції кардіореспіраторної системи (КРС) на дію гіперкапічнічних і гіпоксичних зрушень дихального гомеостазу як у стані спокою, так і в умовах напружених фізичних навантажень [7, 13, 14, 20]. У кваліфікованих спортсменів, які тривалий час спеціалізуються в обраному виді спорту, виявлені особливості фізіологічної реактивності організму, що є одночасно як наслідком тривалої адаптації до напруження фізичних навантажень певної спрямованості, так і наслідком багаторічного відбору спортсменів за характером вентиляторної реакції на гіперкапічний стимул [10, 11, 13, 14, 16, 18, 20].

За останні роки накопичилося багато принципово нових знань про сутність функціональних можливостей спортсменів і опубліковано велику кількість даних, що відображають верхні межі функціональних можливостей людини, отриманих при обстеженні елітних спортсменів [2, 5, 11, 13, 14, 21, 23, 26]. При вирішенні завдань вдосконалення фізіологічного контролю процесу адаптації спортсменів до напруженого спортивного тренування у спортивній фізіології на перший план завдань виходить визначення фізіологічних факторів, що забезпечують ефективність спортивної діяльності. Вважають, що загальна функціональна і метаболічна продуктивність організму спортсменів, їх аеробна продуктивність при максимальній інтенсивності фізичного навантаження залежать від таких властивостей фізіологічної реактивності: функціональна

та метаболічна потужність, стійкість, рухливість, економічність і реалізованість, що достатньо повно враховують вимоги до основних сторін діяльності функціональних систем в умовах напружених спортивних навантажень [10–12, 14]. У процесі тренування спортсменів властивості фізіологічної реактивності закономірно змінюються, і це лежить в основі змін спеціальної працездатності й функціональної підготовленості спортсменів на основі стабілізації рівня фізіологічних функцій і метаболізму, а також є основою сталого функціонального стану організму спортсмена [11, 12].

Дедалі очевиднішим стає той факт, що при приблизно однаковому енергетичному і функціональному потенціалі фізіологічних систем, провідних для виду спорту, перевагу отримує той спортсмен, який в конкретних умовах змагань здатен довго утримувати максимальні рівні функціонування [11–14] і є більш стійким до прогресуючої втоми. Стійкість розглядається як відображення здатності організму підтримувати високий ефективний рівень функціональних реакцій в умовах граничної інтенсивності фізичних навантажень, що характерні для змагальної діяльності у спорті [11, 12]. Можливо, прояви стійкості функціональних реакцій за умов напружених фізичних навантажень будуть залежати як від індивідуальних особливостей спортсменів, так і від особливостей їх довготривалої адаптації до змагальних навантажень різної тривалості.

Метою роботи було визначення залежності здатності організму утримувати високі рівні енергетичних процесів і функціонування КРС при напружених фізичних навантаженнях залежно від рівня чутливості й загальної реактивності КРС на  $\text{CO}_2$ - $\text{H}^+$ -стимул у кваліфікованих спортсменів.

#### Матеріали та методи

Дослідження проводили в лабораторних умовах на експериментальній базі НДІ Національного університету фізичного виховання і спорту України у змагальному періоді підготовки за участю 54 кваліфікованих спортсменів-чоловіків (КМС-МС) віком від 19 до 24 років, які 8–14 років спеціалізувалися в легкій атлетиці.

Використовувався методичний підхід для оцінки функціональних можливостей спортсменів [10, 11] і діагностичний ергоспірометричний комплекс «Охусон Про» («Jaeger», Німеччина). Досліджувалися показники газообміну, зовнішнього дихання, центральної гемодинаміки, ацидемічних зрушень крові та фізичної працездатності спортсменів в умовах фізичних тестових навантажень [4, 5, 17, 21, 23, 26]. З цією метою використовували тест на утримання навантаження на рівні «критичної» потужності ( $W_{\text{кр}}$ ), який використовується для визначення максимальної аеробної ємності [5, 19, 25, 26] та здатності утримувати високі рівні енергетичних процесів і функціонування КРС в умовах напружених фізичних навантажень [11]. Результати в тесті з навантаженням ступенево зростаючої потужності були використані для розрахунку значень рівня навантаження «критичної» потужності, яка визначалася як той найменший рівень навантаження, при якому вперше досягався рівень максимального споживання  $\text{O}_2$  –  $\text{VO}_{2\text{max}}$  [4, 8, 24]. Тестові навантаження на рівні  $W_{\text{кр}}$  виконувалися на тредмілі LE-200 С (Jaeger, Німеччина) з постійною швидкістю до моменту «відмови» випробуваного від продовження роботи.

У реальному масштабі часу (breath by breath) визначали основні характеристики реакції КРС: легеневу вентиляцію ( $V_E$ ), частоту дихання ( $f_T$ ), дихальний об'єм ( $V_T$ ), концентрацію  $\text{CO}_2$  і  $\text{O}_2$  у видихуваному ( $F_E\text{O}_2$ ,  $F_E\text{CO}_2$ ) і в альвеолярному повітрі ( $F_A\text{O}_2$ ,  $F_A\text{CO}_2$ ), споживання  $\text{O}_2$  ( $\text{VO}_2$ ), виділення  $\text{CO}_2$  ( $\text{VCO}_2$ ), газообмінне відношення ( $\text{VCO}_2/\text{VO}_2$ ), вентиляційні еквіваленти для  $\text{O}_2$  ( $V_E/\text{VO}_2$ ) і для  $\text{CO}_2$  ( $V_E/\text{VCO}_2$ ), кисневий пульс (“ $\text{O}_2$ -пульс”= $\text{VO}_2/\text{ЧСС}$ ) та ін. З огляду на те, що виміри проводилися у відкритій системі,

показники зовнішнього дихання приведені до умов ВTPS, а газообміну – до умов STPD. Реєстрацію частоти серцевих скорочень (ЧСС) проводили за допомогою «Sport Tester Polar». Концентрацію лактату (HLA) в капілярній крові визначали ензиматичним методом («Dr. Lange-400»). Статистичне опрацювання результатів проводили з використанням комп'ютерної програми «Microsoft Excel» з визначенням основних статистичних показників.

Тестування проводили після дня відпочинку при стандартизованому режимі харчування і питного режиму. Спортсмени були інформовані про зміст тестів і дали згоду на їх проведення.

### Результати і їхнє обговорення

Проведені раніше дослідження в умовах дії прогресуючої гіперкапічної стимуляції дали змогу виділити три групи спортсменів, які відрізнялися за типом реагування кардіореспіраторної системи (КРС) на  $\text{CO}_2$ - $\text{H}^+$ -стимул [13, 14, 20], а також спеціалізувалися в бігу на змагальних дистанціях різної тривалості (100 м, 800 м і 5000 м). Першу групу (17 спортсменів) становили спортсмени-спринтери з високим рівнем фізіологічної реактивності (біг на 100 м). Друга група – 19 спортсменів з відносно середнім рівнем фізіологічної реактивності, які спеціалізувалися на середніх змагальних дистанціях (біг на 800 м). Третя група – 18 спортсменів-стаєрів зі зниженим рівнем фізіологічної реактивності (біг на 5000 м).

Тест на утримання навантаження на рівні «критичної» потужності за енергозабезпеченням роботи є навантаженням максимальної аеробної потужності з дистанційним рівнем споживання кисню ( $\text{VO}_2$ ) 90–100% від індивідуального  $\text{VO}_{2\text{max}}$ , виконання якого потребує максимальної мобілізації аеробних процесів у працюючих м'язах – в енергозабезпеченні навантаження переважає аеробний компонент і становить до 70–80% [11, 12, 22, 24]. Відзначається і значне посилення в енергозабезпеченні анаеробних гліколітичних процесів, тому що локалізація анаеробного порога у спортсменів зазвичай виявляється на рівні близько 65–75% від індивідуального  $\text{VO}_{2\text{max}}$  [6–8, 11]. При аналізі особливостей реакції КРС на фізичні навантаження «критичної» потужності враховували, що спортсмени різних груп при виконанні тесту утримують різну потужність навантаження на рівні максимального споживання  $\text{O}_2$  ( $W_{\text{кр}}$ ) і виконують різний об'єм роботи на рівні навантаження «критичної» потужності (ОКР, Дж·кг<sup>-1</sup>) – табл. 1.

Так, у спортсменів-бігунів на дистанції 5000 м, яких відрізняв знижений рівень чутливості КРС на  $\text{CO}_2$ - $\text{H}^+$ -стимул, відзначався достовірно високий рівень навантаження на рівні «критичної» потужності й об'єм виконаної роботи на даному рівні порівняно зі спортсменами-бігунами на дистанції 100 м і 800 м ( $p < 0,05$ ). Спортсмени-стаєри досягали і більших граничних рівнів функціонування КРС ( $\text{VO}_{2\text{max}}$  60,79±3,30 мл·хв<sup>-1</sup>·кг<sup>-1</sup>,  $V_{\text{Emax}}$  2037,52±123,24 мл·хв<sup>-1</sup>·кг<sup>-1</sup>) у поєднанні з відносно вищим рівнем ефективності реакцій КРС за рахунок більшого кисневого ефекту серцевого циклу (« $\text{O}_2$ -пульс» 22,67±1,27 мл·уд<sup>-1</sup>). Відносно знижене значення максимальної частоти серцевих скорочень у спортсменів даного типу фізіологічної реактивності може вказувати на більший систолічний об'єм крові в умовах даного тесту, що в цілому свідчить про більший ступінь розвитку аеробних механізмів енергозабезпечення, економічності й загальної продуктивності реакцій КРС [3, 4] в умовах максимального аеробного тесту. У спортсменів-спринтерів із високим рівнем фізіологічної реактивності (біг на дистанції 100 м) відзначався відносно знижений рівень загальної фізичної працездатності, який поєднувався із меншими граничними рівнями функціонування КРС та кисневим ефектом серцевого циклу (« $\text{O}_2$ -пульс»), що свідчило

про знижений рівень економічності функціонування серцево-судинної системи (ССС) у спортсменів-спринтерів (див. табл. 1). Середній рівень фізичної працездатності, як і загальний рівень аеробних можливостей організму, економічності функціонування ССС відзначався у спортсменів-бігунів на дистанції 800 м.

Таблиця 1

Відмінності максимального рівня реакції кардіореспіраторної системи в умовах підтримки навантаження на рівні «критичної» потужності у кваліфікованих спортсменів з різним рівнем фізіологічної реактивності на зрушення дихального гомеостазу,  $X \pm S$

Показники	Групи спортсменів за рівнем фізіологічної реактивності, спортивної спеціалізації			p (t-тест) <0,05
	1 група – знижений, біг на 100 м	2 група – середній, біг на 800 м	3 група – знижений, біг на 5000 м	
Потужність «критичного» навантаження ( $W_{кр}$ ), Вт	231,85±7,05	270,15±12,99	311,97±11,13	1-2,3;2-3
Потужність «критичного» навантаження ( $W_{кр}$ ) на кг маси тіла, Вт·кг <sup>-1</sup>	3,18±0,17	3,57±0,15	4,82±0,22	1-2,3;2-3
Об'єм виконаної роботи на рівні «критичної» потужності, ОКР, Вт·хв <sup>-1</sup> ·кг <sup>-1</sup>	16,97±1,07	22,29±1,28	41,98±4,58	1-2,3;2-3
Максимальний рівень легеневої вентиляції ( $V_{E_{max}}$ ), л·хв <sup>-1</sup>	109,20±10,30	128,79±10,13	131,68±6,62	1-3
Максимальний рівень легеневої вентиляції ( $V_{E_{max}}$ ) на кг маси тіла, мл·хв <sup>-1</sup> ·кг <sup>-1</sup>	1497,74±163,74	1704,02±133,94	2037,52±123,24	3-1,2
Максимальний рівень споживання $O_2$ ( $VO_{2max}$ ), мл·хв <sup>-1</sup>	3088,9±220,0	3766,5±171,5	3934,8±190,2	1-2,3
Максимальний рівень споживання $O_2$ ( $VO_{2max}$ ) на кг маси тіла, мл·хв <sup>-1</sup> ·кг <sup>-1</sup>	42,36±3,89	49,83±2,04	60,79±3,30	1-2,3;2-3
Максимальний рівень ЧСС ( $ЧСС_{max}$ ), уд·хв <sup>-1</sup>	189,17±5,26	183,04±4,19	181,00±4,94	
Вентиляційний еквівалент для $O_2$ ( $E_{QO_2}$ )	28,80±1,05	27,99±1,30	26,96±0,96	
Максимальний кисневий ефект серцевого циклу (« $O_2$ -пульс» <sub>max</sub> ), мл·уд <sup>-1</sup>	16,21±1,18	20,60±0,92	22,67±1,27	1-2,3

Крім того, як видно з табл. 2, в умовах утримання навантаження на рівні «критичної» потужності спортсмени різних груп і спортивної спеціалізації розрізнялися і за рівнем активності анаеробних гліколітичних процесів в енергозабезпеченні тестового навантаження. За цих умов виконання тесту у кваліфікованих спортсменів більшого значення набуває здатність утримувати високі рівні енергетичного метаболізму і функцій КРС, тобто властивість стійкості [2, 12, 22, 24].

Кваліфіковані спортсмени різних груп підтримували різний рівень «критичної» потужності навантаження й утримували його різний час, а також утримували і різний рівень споживання  $O_2$ . Так, у спортсменів-стаєрів зі зниженим рівнем чутливості КРС на  $CO_2$ - $H^+$ -стимул (3 група) загальний час роботи на рівні «критичної» потужності 4,82±0,22 Вт·кг<sup>-1</sup> становив 8,71±0,32 хвилини (табл. 3) при середньому рівні  $VO_2$  54,47±3,11 мл·хв<sup>-1</sup>·кг<sup>-1</sup>. Це достовірно більше, ніж загальний час роботи у спортсменів зі середнім рівнем фізіологічної реактивності ( $T_{кр}$  6,17±0,39 хв) на рівні  $W_{кр}$  3,57±0,15 Вт·кг<sup>-1</sup> і при середньому рівні

$VO_2$   $45,05 \pm 2,39$  мл·хв<sup>-1</sup>·кг<sup>-1</sup>, а також у спортсменів-спринтерів (Ткр  $5,33 \pm 0,21$  хв) при  $W_{кр}$   $3,18 \pm 0,17$  Вт·кг<sup>-1</sup> і при середньому рівні  $VO_2$   $39,26 \pm 2,74$  мл·хв<sup>-1</sup>·кг<sup>-1</sup>.

Таблиця 2

Активність анаеробних гліколітичних процесів в енергозабезпеченні в умовах утримання навантаження на рівні «критичної» потужності у кваліфікованих спортсменів із різним рівнем фізіологічної реактивності на зрушення дихального гомеостазису,  $X \pm S$

Показники	Групи спортсменів за рівнем фізіологічної реактивності, спортивної спеціалізації			p (t-тест) <0,05
	1 група – знижений, біг на 100 м	2 група – середній, біг на 800 м	3 група – знижений, біг на 5000 м	
Максимальний рівень виділення $CO_2$ ( $VCO_{2max}$ ) на кг маси тіла, мл·хв <sup>-1</sup> ·кг <sup>-1</sup>	50,36±3,24	41,56±2,19	47,59±2,34	2-1,3
Газообмінне відношення при фізичному навантаженні ( $VCO_2/VO_2$ фн)	1,24±0,19	0,89±0,06	0,82±0,06	1-2,3
Газообмінне відношення у відновлювальному періоді ( $VCO_2/VO_2$ відн)	1,28±0,14	1,11±0,13	0,97±0,09	1-3
Концентрація лактату в крові (HLа), ммоль·л <sup>-1</sup>	10,43±1,01	7,84±0,94	6,03±0,79	1-2,3

За весь період тесту потужність навантаження була постійною, але швидкість споживання  $O_2$  безперервно збільшувалася. Виявлені відмінності між групами як за часом досягнення  $VO_{2max}$ , так і за часом стійкого утримання споживання  $O_2$  на максимальному рівні, тобто за часом утримання високої ефективності роботи (% від загальної тривалості роботи). Як видно з табл. 3, максимальна швидкість споживання  $O_2$  у спортсменів-стаєрів зі зниженим рівнем фізіологічної реактивності КРС на  $CO_2$ -H<sup>+</sup>-стимул (3 група, біг на 5000 м), порівняно зі спортсменами з середнім рівнем фізіологічної реактивності (2 група, біг на 800 м), досягалася раніше на  $4,05 \pm 0,19$  хвилині виконання тесту, а період стійкого утримання  $VO_{2max}$  становив  $54,53 \pm 1,74\%$  від загального часу підтримки навантаження на рівні «критичної» потужності. Більш низький рівень стійкості функціональних реакцій відзначали у спортсменів-спринтерів із високим рівнем фізіологічної реактивності (1 група, біг на 100 м). Так,  $VO_{2max}$  відзначався на  $5,51 \pm 0,34$  хвилині й утримувався на високому рівні  $10,69 \pm 1,02\%$  від загального часу підтримки навантаження на рівні «критичної» потужності.

Таблиця 3

Особливості підтримки навантаження на рівні «критичної» потужності у кваліфікованих спортсменів з різним рівнем фізіологічної реактивності на зрушення дихального гомеостазису,  $X \pm S$

Показники	Групи спортсменів за рівнем фізіологічної реактивності, спортивної спеціалізації			p (t-тест) <0,05
	1 група – знижений, біг на 100 м	2 група – середній, біг на 800 м	3 група – знижений, біг на 5000 м	
Загальний час виконання тесту (Ткр), хв	5,33±0,21	6,17±0,41	8,71±0,32	1-2,3; 2-3
Час досягнення максимального рівня споживання $O_2$ , хв	5,12±0,18	5,51±0,34	4,05±0,19	3-1,2
Час підтримки високої ефективності роботи в % від загальної тривалості навантаження, %	3,94±0,24	10,69±1,02	54,53±1,74	1-2,3; 2-3

Крім того, в умовах тесту при незмінному рівні потужності роботи відзначалося безперервне збільшення частоти серцевих скорочень, позначене як пульсовий «дрейф» [1,



9, 11, 12]. Так, у спортсменів-стаєрів зі зниженим рівнем фізіологічної реактивності (III група) відзначався найменший пульсової «дрейф» за значенням коефіцієнта функціональної стійкості за ЧСС (КФС ЧСС  $3,34 \pm 0,39\%$ ), що свідчило про більш високий рівень стійкості циркуляторної реакції в умовах тривалого навантаження. Трохи нижчий рівень стійкості функціональних реакцій за «дрейфом» ЧСС відзначався у спортсменів II групи (біг на 800 м) зі середнім рівнем фізіологічної реактивності (КФС ЧСС  $5,53 \pm 0,78\%$ ).

У спортсменів-спринтерів з високим рівнем чутливості КРС на  $\text{CO}_2\text{-H}^+$ -стимул при аналізі динаміки рівня споживання  $\text{O}_2$  в умовах тесту на утримання навантаження на рівні «критичної» потужності не відзначалося вираженої стадії «стійкого» стану. Швидкість споживання  $\text{O}_2$  безперервно наростала протягом тестового навантаження і максимальний рівень  $\text{VO}_2$  відзначався на  $5,12 \pm 0,18$  хвилині, а період стійкого утримання  $\text{VO}_{2\text{max}}$  становив лише  $3,94 \pm 0,24\%$  від загального часу підтримки навантаження на рівні «критичної» потужності. У цій групі спортсменів відзначали і найменший рівень стійкості за пульсовим «дрейфом» (КФС ЧСС  $6,26 \pm 0,37\%$ ). Подібна закономірність відмінностей серед груп в умовах підтримки навантаження на рівні «критичної» потужності відзначалася і за коефіцієнтом функціональної стійкості для ефективності легеневого газообміну за  $\text{O}_2$  («дрейф»  $\text{EQO}_2$ ).

Результати кореляційного аналізу виявили негативний взаємозв'язок рівня фізичної працездатності, максимального рівня функціонування КРС (за рівнем легеневої вентиляції та споживанням  $\text{O}_2$ ), рівня економічності (за « $\text{O}_2$ -пульс», вентиляційним еквівалентом для  $\text{O}_2$ ) і стійкості (за КФС ЧСС та КФС  $\text{EQO}_2$ ) функціональних реакцій в умовах підтримки навантаження на рівні «критичної» потужності з характеристиками чутливості реакцій КРС на  $\text{CO}_2\text{-H}^+$ -стимул. Пряма взаємозумовленість відзначалася між рівнем чутливості КРС на  $\text{CO}_2\text{-H}^+$ -стимул і рівнем активності анаеробних гліколітичних процесів ( $\text{VCO}_2$ ,  $\text{VCO}_2/\text{VO}_{2\text{fn}}$ ,  $\text{VCO}_2/\text{VO}_{2\text{відн}}$ ,  $\text{HLa}$ ).

Дослідження динаміки виділення  $\text{CO}_2$  при поступово зростаючих навантаженнях у аеробному режимі [1, 4, 7, 8] показали, що зі збільшенням потужності спостерігався прогресивний приріст виділення  $\text{CO}_2$ . Вважають, що ступінь підвищення активності анаеробних процесів при виконанні фізичних навантажень достатньо чітко відображає рівень виділення  $\text{CO}_2$ . Крім того, рівень виділення  $\text{CO}_2$  через легені перебуває у прямій залежності від інтенсивності фізичного навантаження і у протилежній – від фізичної підготовленості спортсмена [1, 8, 11]. Однак у даній роботі не виявлено вірогідних відмінностей за значеннями виділеного  $\text{CO}_2$  на рівні максимального споживання  $\text{O}_2$  у кваліфікованих спортсменів-бігунів на дистанції різної тривалості. Водночас важливо відзначити, що спортсмени за умов тесту досягають різних рівнів  $\text{W}_{\text{кр}}$  і  $\text{VO}_{2\text{max}}$ , а також є вірогідні відмінності у значеннях вентиляційного еквівалента за  $\text{CO}_2$  і газообмінного відношення ( $\text{VCO}_2/\text{VO}_2$ ). Виявити відмінності між групами за рівнем виділення  $\text{CO}_2$  дав змогу лише аналіз динаміки  $\text{VCO}_2$  і  $\text{VCO}_2/\text{VO}_2$  залежно від потужності навантаження при виконанні ступенево зростаючого навантаження.

Найбільший рівень виділення  $\text{CO}_2$  при однаковому механічному значенні потужності навантаження відзначався у спортсменів-спринтерів, які мали найменший рівень фізичної працездатності. Так, у спринтерів при навантаженні  $W$  245,91 Вт мав місце вірогідно вищий рівень  $\text{VCO}_2$  ( $56,94 \pm 3,71$  мл·хв<sup>-1</sup>·кг<sup>-1</sup>) і  $\text{VCO}_2/\text{VO}_2$  ( $1,17 \pm 0,14$ ), ніж у спортсменів-бігунів на 800 м ( $\text{VCO}_2$   $38,18 \pm 2,54$  мл·хв<sup>-1</sup>·кг<sup>-1</sup>,  $\text{VCO}_2/\text{VO}_2$   $0,91 \pm 0,13$ ) і у спортсменів-стаєрів ( $\text{VCO}_2$   $34,51 \pm 3,26$  мл·хв<sup>-1</sup>·кг<sup>-1</sup>,  $\text{VCO}_2/\text{VO}_2$   $0,79 \pm 0,17$ ) при тому ж рівні механічної потужності навантаження. Отримані дані свідчать про вищий рівень

активності анаеробних гліколітичних процесів у енергозабезпеченні [7, 8, 21] при однаковій потужності навантаження у спортсменів-спринтерів (біг на 100 м). Крім того, переважання рівня виділення  $\text{CO}_2$  над рівнем споживання  $\text{O}_2$  сприяло розвитку рухової гіпокапнії, яку вважають лімітуючим фактором фізичної працездатності й функцій КРС [8, 21]. Знижена продукція  $\text{CO}_2$  на всіх рівнях потужності навантаження мала місце у спортсменів із високим рівнем фізичної працездатності, які спеціалізувалися у бігу на 5000 м, що свідчило про переважання в енергозабезпеченні тестового навантаження аеробних механізмів і про менше виділення “неметаболічного”  $\text{CO}_2$ .

Виявлені відмінності за рівнем  $\text{VCO}_2$  пояснюються тим, що при виконанні однакової механічної роботи кваліфіковані спортсмени, які довгостроково виконували тренувальні навантаження, що потребують прояву витривалості (біг на 5000 м), порівняно зі спортсменами інших груп, споживали менше  $\text{O}_2$ , менше витрачали енергії, і отже, менше виділяли  $\text{CO}_2$  як метаболічного, так і «неметаболічного» походження, що утворився при нейтралізації ацидемічних зрушень в організмі, пов'язаних з утворенням лактату. У зв'язку з цим стає зрозумілою можливість прогнозування фізичної підготовленості спортсменів різної спортивної спеціалізації не тільки за об'ємом спожитого  $\text{O}_2$  (при стандартному навантаженні), але і за об'ємом виділеного  $\text{CO}_2$ . Приріст  $\text{VCO}_2$  і його співвідношення з  $\text{VO}_2$  ( $\text{VCO}_2/\text{VO}_2$ ) прямо співвідноситься з рівнем чутливості КРС на  $\text{CO}_2$ - $\text{H}^+$ -стимул. Таким чином, у процесі адаптації має місце такий характер модифікації фізіологічної реактивності (чутливості і стійкості) КРС до зрушень дихального гомеостазису, який може виступати як механізм формування потужності дихальної компенсації метаболічного ацидозу і забезпечувати ефективність основних факторів, що визначають рівень фізичної працездатності і енергетичних процесів.

Водночас не виявлено взаємозв'язку між показниками фізичної працездатності (за об'ємом виконаної роботи) і рівнем активності анаеробних процесів у енергозабезпеченні, на який вказують деякі дослідники [7, 11, 14]. Можна думати, що при порівнянні груп спортсменів, різнорідних за спрямованістю процесу адаптації до тренувальних навантажень, для досягнення високого рівня загальної фізичної працездатності й об'єму виконаної роботи за даних умов тесту домінуючого значення набуває рівень аеробних можливостей організму в поєднанні зі зниженим рівнем активності анаеробних процесів у енергозабезпеченні. При цьому значення аеробної продуктивності значно переважає. На це вказували результати кореляційного аналізу в *гетерогенній* групі спортсменів. Так, виявлено негативний взаємозв'язок величини потужності тестового навантаження на рівні “критичної” потужності ( $W_{кр}$ ) з показниками, що характеризують активність анаеробних гліколітичних процесів ( $\text{VCO}_2/\text{VO}_{2\text{фн}}$ ,  $\text{VCO}_2/\text{VO}_{2\text{відн}}$ ,  $\text{HLa}$ ) і позитивний взаємозв'язок з показниками, що характеризують рівень аеробних можливостей організму ( $\text{VO}_{2\text{max}}$ , « $\text{O}_2$ -пульс», ЧСС).

Лише аналіз характеру взаємозв'язків і їх виразності за значенням коефіцієнтів кореляції в *однорідних* групах спортсменів за направленістю процесу довгострокової адаптації (окремо для спортсменів-бігунів на 100 м, 800 м і 5000 м) підтвердили дані інших дослідників [7, 11, 14]. Вони показали, що рівень фізичної працездатності за об'ємом виконаної роботи і значенням навантаження “критичної” потужності позитивно пов'язаний з інтенсивністю анаеробних процесів у енергозабезпеченні (табл. 4). Крім того, значення коефіцієнтів кореляції по групах розрізнялася, що, очевидно, залежить від різного значення активності анаеробних процесів у забезпеченні високого рівня фізичної працездатності за умов напружених тривалих навантажень у кваліфікованих спортсменів

із різним рівнем фізіологічної реактивності КРС на зрушення дихального гомеостазу та спрямованістю процесу довготривалої адаптації (біг на 100 м, 800 м, 5000 м).

Таблиця 4

Кореляційний взаємозв'язок «критичної» потужності навантаження ( $W_{кр}$ ) з показниками, що характеризують активність анаеробних гліколітичних процесів у енергозабезпеченні при навантаженні ступенезростаючої потужності у кваліфікованих спортсменів

Показники	Змагальна дистанція		
	100 м	800 м	5000 м
	Значення коефіцієнтів кореляції		
	$r_{0,05} > 0,48, n=17$	$r_{0,05} > 0,46, n=19$	$r_{0,05} > 0,47, n=18$
Газообмінне відношення при фізичному навантаженні ( $VCO_2/VO_2$ фн)	0,52	0,55	0,51
Газообмінне відношення у відновлювальному періоді ( $VCO_2/VO_2$ відн)	0,56	0,62	0,53
Концентрація лактату у крові (HLA), ммоль·л <sup>-1</sup>	0,54	0,64	0,39

Специфічні прояви адаптації до конкретного виду фізичних навантажень характеризуються спрямованою модифікацією реактивності КРС (чутливості і стійкості) до зрушень дихального гомеостазу як у стані відносного спокою, так і в умовах напружених фізичних навантажень. Така модифікація може виступати як механізм формування потужності дихальної компенсації метаболічного ацидозу.

Кваліфіковані спортсмени-бігуни на змагальні дистанції різної тривалості (100 м, 800 м, 5000 м) і з різним рівнем чутливості й загальної реактивності КРС  $CO_2$ - $H^+$ -стимул при виконанні напруженого тестового навантаження «до відмови» відрізнялися як за максимальним досягнутим рівнем фізичної працездатності й за верхніми межами (піками) реакції кардіореспіраторної системи, так і за здатністю тривалий час підтримувати ефективний високий рівень функціонування організму.

Виявлено негативний взаємозв'язок рівня чутливості й загальної реактивності КРС на  $CO_2$ - $H^+$ -стимул у стані спокою з максимальним рівнем відповідної реакції та характеристиками стійкості функціональних реакцій при виконанні тестового навантаження на рівні «критичної» потужності, а також позитивний взаємозв'язок з рівнем активності анаеробних гліколітичних процесів за цих же умов.

При порівнянні груп кваліфікованих спортсменів, різнорідних за спрямованість процесу довготривалої адаптації до тренувальних навантажень та рівнем тренуваності, домінуюче значення для досягнення високого рівня загальної фізичної працездатності має рівень аеробних можливостей організму в поєднанні зі зниженим рівнем активності анаеробних процесів у енергозабезпеченні. При цьому значення аеробної продуктивності значно переважає.

Аналіз однорідних груп спортсменів за спрямованістю процесу довготривалої адаптації та рівнем тренуваності підтвердили дані інших дослідників: рівень фізичної працездатності прямо залежить від інтенсивності анаеробних процесів у енергозабезпеченні.

*Робота виконувалася в межах держбюджетної науково-дослідної теми «Моніторинг процесу адаптації кваліфікованих спортсменів з урахуванням їх індивідуальних особливостей» (номер держреєстрації теми: №0111U001732, КПКВ 2201040).*

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Агаджанян Н. А., Елфимов А. И. Функции организма в условиях гипоксии и гиперкапнии. М.: Медицина, 1986. 272 с.

2. *Алексеев В. М., Коц Я. М.* Изменение в частоте сердечных сокращений (пульсовой «дрейф») на протяжении работы постоянной аэробной мощности у спортсменов и не-спортсменов // Физиология человека. 1983. Т. 9. № 2. С. 316–322.
3. *Астранд П.-О.* Факторы, обуславливающие выносливость спортсмена // Наука в олимпийском спорте. 1994. № 1. С. 43–46.
4. *Виру А. А.* Энергообеспечение мышечной работы при одновременном использовании аэробных и анаэробных механизмов энергообеспечения // Главы из спортивной физиологии. Тарту, 1988. С. 51–70.
5. *Волков Н. И.* Тесты и критерии для оценки выносливости спортсменов. М.: ГЦОЛИФК, 1989. 44 с.
6. *Волков Н. И., Дардури У., Сметанин В. Я.* Градации гипоксических состояний у человека при напряженной мышечной деятельности // Физиология человека. 1998. Т. 24. № 3. С. 51–63.
7. *Гайлюне А. В.* Гуморальные факторы развития утомления у представителей разного возраста при напряженной мышечной деятельности // Кислородные режимы организма, работоспособность, утомление при напряженной мышечной деятельности. Вильнюс, 1989. Ч. I. С. 27–35.
8. *Красников Н. П.* Исследование функции внешнего дыхания и кровообращения, определяющих и лимитирующих физическую работоспособность человека // Физиология человека. 1984. Т. 10. № 6. С. 1036–1041.
9. *Коген Э., Уильямс Б.* Метаболическая адаптация к физическим тренировкам, направленным на развитие выносливости // Метаболизм в процессе физической деятельности. К.: Олимпийская литература, 1998. С. 195–232.
10. *Колчинская А. З.* Кислород, физическое состояние, работоспособность. К.: Наук. думка, 1991. 204 с.
11. *Конрад А. Н.* Критерии метаболических состояний у спортсменов при нагрузках критической мощности // Актуальные проблемы физической культуры и спорта. М., 1974. С. 23–24.
12. *Матсин Т. А., Виру А. А.* Функциональная устойчивость тренированного организма при выполнении длительных равномерных нагрузок в стандартных условиях // Физиология человека. 1980. Т. 6. № 1. С. 85–89.
13. *Мищенко В. С.* Свойства регуляции кислородтранспортной системы как отражение функционального потенциала организма спортсменов // Медико-биологические основы оптимизации тренировочного процесса в циклических видах спорта. К.: КГИФК, 1980. С. 108–133.
14. *Мищенко В. С.* Функциональные возможности спортсменов. К.: Здоров'я, 1990. 200 с.
15. *Мищенко В. С., Павлик А. И., Дяченко В. Ф.* Функциональная подготовленность как интегральная характеристика предпосылок высокой работоспособности спортсменов: метод. пособие. К.: ГНИИФКС, 1999. 128 с.
16. *Мищенко В. С., Лисенко О. М., Виноградов В. Є.* Типи фізіологічної реактивності системи дихання і специфіка прояву спеціальної працездатності спортсменів // Фізіол. журн. 2006. Т. 52. № 4. С. 69–77.
17. *Мищенко В. С., Лисенко Е. Н., Виноградов В. Е.* Реактивные свойства кардиореспираторной системы как отражение адаптации к напряженной физической тренировке в спорте. К.: Наук. світ, 2007. 351 с.
18. *Моногаров В. Д.* Утомление в спорте. К.: Здоров'я, 1986. 120 с.

19. *Платонов В. Н., Булатова М. М., Морозова А. А.* Ориентация тренировочного процесса юных пловцов с учетом их предрасположенности к выступлениям на дистанции различной протяженности // Управление процессом адаптации организма спортсменов высокой квалификации. К.: КГИФК, 1992. С. 5–29.
20. Физиологическое тестирование спортсмена высокой квалификации: пер. с англ. / Бекус Р.Д.Х., Банистер Е.У., Бушар К. и др. К.: Олимпийская литература, 1998. 432 с.
21. *Филлипов М. М.* Условия образования и переноса углекислого газа в процессе мышечной деятельности // Наука в олимпийском спорте. 1994. № 1. С. 73–78.
22. *Харитонов Л. Г.* Теоретические и экспериментальное обоснование типов адаптации в спорте // Теория и практика физ. культуры. 1991. № 7. С. 21–24.
23. *Astrand P.-O.* Influences of biological age and selection // *Endurance in Sport*. Blackwell Scientific Publication, 1992. P. 285–289.
24. *Lysenko Olena.* Cardiorespiratory responseveness and manifestations of energy potential for elite athletes // *Research Yearbook. Studies in Physical Education and Sport*. 2007. Vol. 13. N 2. P. 235–238.
25. *MacDougal J. D., Wander H. A., Green N. J.* Physiological testing of the high-performance athlete // *Champaign, II; Human Kinetics*. 1991. 448 p.
26. *Moritani T., Nagata A.U., de Vries, Muro M.* Critical power as a measure of physical work capacity and anaerobic threshold // *Ergonomics*. 1981. Vol. 24. N 5. P. 339–350.
27. *Morrow J. R., Jackson A. W., Disch J. G., Mood D. P.* Measurement and evaluation in Human Performance // *Human Kinetics Publishers*, 1995. 416 p.
28. *Morton R. H.* Critical power test for ramp exercise // *Europ. J. of appl. Physiol.* Berlin. 1994. Vol. 69. N 5. P. 435–438.
29. *Thoden J. S.* Testing aerobic power // *Physiological Testing of the High-Performance Athlete*. Human Kinetics, 1991. P. 107–173.
30. *Wilmore J. H., Costill D. L.* *Physiology of Sport and Exercise*. Champaign: Human Kinetics, 1994. 549 p.

*Стаття: надійшла до редакції 02.04.12*

*доопрацьована 31.08.12*

*прийнята до друку 02.10.12*

## STABILITY OF REACTIONS IN CARDIORESPIRATORY WHEN THE ACHIEVING OF MAXIMUM OXYGEN CONSUMPTION IN ATHLETES

**O. Lysenko**

*Scientific Research Institute National University of Physical Education and Sport  
of Ukraine*

*1, Fizkultury St., Kyiv-150, 03680, Ukraine*

*e-mail: luslena@rambler.ru*

Negative interrelation was revealed between characteristics of CRS sensitivity to CO<sub>2</sub>-H<sup>+</sup>-stimulus with the level of CRS responses under conditions of of maximum-power aerobic loading. Opposite interrelation was observed between the level of CRS sensitivity to CO<sub>2</sub>-H<sup>+</sup>-stimulus and the level of functioning economy and stability as well as positive

interrelation with the level of activity in anaerobic glycolytic processes during physical-load energy-supply.

*Keywords:* skilled athletes, reactivity, cardiorespiratory system, physical work capacity.

## **УСТОЙЧИВОСТЬ РЕАКЦИЙ КАРДИОРЕСПИРАТОРНОЙ СИСТЕМЫ В УСЛОВИЯХ ДОСТИЖЕНИЯ МАКСИМАЛЬНОГО УРОВНЯ ПОТРЕБЛЕНИЯ КИСЛОРОДА У КВАЛИФИЦИРОВАННЫХ СПОРТСМЕНОВ-БЕГУНОВ**

**Е. Лысенко**

*Научно-исследовательский институт Национального университета физического воспитания и спорта Украины  
ул. Физкультуры, 1, Киев-150, 03680, Украина  
e-mail: luslena@rambler.ru*

Выявлена обратная взаимосвязь между характеристиками чувствительности КРС на  $\text{CO}_2\text{-H}^+$ -стимул и уровнем реакций КРС в условиях аэробной нагрузки максимальной мощности. Отмечали также противоположную взаимозависимость между уровнем чувствительности КРС на  $\text{CO}_2\text{-H}^+$ -стимул и уровнем экономичности и устойчивости функционирования, а также положительную взаимосвязь с уровнем активности анаэробных гликолитических процессов в энергообеспечении физических нагрузок.

*Ключевые слова:* квалифицированные спортсмены, реактивность, кардиореспираторная система, физическая работоспособность.

## АТФ-АЗНА АКТИВНІСТЬ ІЗОЛЬОВАНИХ КЛІТИН ЗОВНІШНЬООРБІТАЛЬНОЇ СЛЪЗОВОЇ ЗАЛОЗИ ЩУРА ЗА УМОВ *IN SITU*

А. Котлярова, В. Манько

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

Виведення  $\text{Ca}^{2+}$  з цитозолу є енергозалежним процесом, і основну роль у цьому процесі відіграють  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи плазматичної мембрани та ендоплазматичного ретикулу. Одним із експериментальних підходів для дослідження  $\text{Ca}^{2+}$ -помп різних клітин є визначення  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-азної активності її очищених препаратів або везикул плазматичної мембрани чи ендоплазматичного ретикулу. Але важливим аспектом фізіологічних досліджень є вивчення внутрішньоклітинних процесів за умов, максимально наближених до природних, не розриваючи взаємозв'язків між транспортувальними системами різних органел. Метою цієї роботи було оцінити можливість використання ізольованих пермеабілізованих секреторних клітин слъзових залоз для дослідження  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-азної активності. Дослідження проведено на пермеабілізованих дигітоніном секреторних клітинах зовнішньорбітальної слъзової залози щура.  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-азну активність оцінювали на основі змін вмісту неорганічного фосфату в середовищах, який визначали методом УФ-детекції. Встановлено, що оптимальний час інкубації для дослідження АТФ-азної активності секреторних клітин зовнішньорбітальної слъзової залози за умов *in situ* становить 15 хв. Максимум  $\text{Ca}^{2+}$ -чутливої АТФ-азної активності спостерігається за 2 ммоль/л екзогенного АТФ, а еозин Y-чутливої – за 3 ммоль/л.  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-азна активність ефективно інгібується еозином Y (10–20 мкмоль/л) і тапсигаргіном (1 мкмоль/л), що слугує підтвердженням функціонування у досліджуваних клітинах  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи ендоплазматичного ретикулу. На основі отриманих нами результатів можна стверджувати про адекватність запропонованого методу дослідження АТФ-азної активності в умовах *in situ*.

**Ключові слова:**  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-азна активність, еозин Y, тапсигаргін, пермеабілізація, секреторні клітини, слъзова залоза, катіони  $\text{Ca}^{2+}$ .

Важливу роль у підтриманні внутрішньоклітинного  $\text{Ca}^{2+}$ -гомеостазу секреторних клітин, що було доведено для ацинарних клітин підшлункової залози [23, 25], слинних залоз ссавців [1, 23], шлункових залоз [6], секреторних клітин слинних залоз личинки *Chironomus plumosus* [7, 11], відіграють  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи плазматичної мембрани та ендоплазматичного ретикулу.

$\text{Ca}^{2+}$ -помпи є системами енергозалежного транспорту іонів  $\text{Ca}^{2+}$ , роль яких виконує  $\text{Ca}^{2+}$ -активована,  $\text{Mg}^{2+}$ -залежна АТФ-аза. Тому їх здебільшого досліджують, визначаючи  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-азну активність очищених препаратів або везикул клітинних мембран. Але важливим аспектом фізіологічних досліджень є з'ясування внутрішньоклітинних процесів в умовах, максимально наближених до природних, з незруйнованими взаємозв'язками між органелами.

Пермеабілізовані клітини є зручним об'єктом для дослідження функціонування  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальних систем ендоплазматичного ретикулу, оскільки в цьому випадку зберігаються такі умови. Нашими попередніми дослідженнями з використанням методу визначення вмісту  $\text{Ca}^{2+}$  у клітинах [10] було ідентифіковано та з'ясовано деякі властивості

Ca<sup>2+</sup>-помп пермеабілізованих секреторних клітин слинних залоз зовнішньоорбітальної слинної залози щура. Але кожен метод має свої обмеження, і для об'єктивної інтерпретації отриманих даних необхідне застосування різних експериментальних підходів. Тому мета цієї роботи – оцінити можливість використання ізольованих пермеабілізованих секреторних клітин цих залоз для дослідження Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-АТФ-азної активності.

Для досягнення мети було поставлено завдання підібрати оптимальні умови для дослідження Ca<sup>2+</sup>-АТФ-азної активності ізольованих пермеабілізованих секреторних клітин зовнішньоорбітальної слюзової залози щура за умов *in situ*. Спочатку необхідно виокремити Ca<sup>2+</sup>-АТФ-азну активність із сумарної АТФ-азної активності досліджуваних клітин. Для цього ми апробували два методичні підходи: 1) зменшили концентрацію Ca<sup>2+</sup> у середовищі інкубації за допомогою ЕГТА; 2) додали до середовища інгібітор Ca<sup>2+</sup>-помп плазматичної мембрани та ендоплазматичного ретикулулу еозин Y.

Залежність від концентрації Ca<sup>2+</sup> у середовищі серед усіх транспортувальних АТФ-аз найбільш притаманна Ca<sup>2+</sup>-активованим, Mg<sup>2+</sup>-залежним АТФ-азам плазматичної мембрани і ендоплазматичного ретикулулу. Правда, катіони Ca<sup>2+</sup> можуть стимулювати і Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-АТФ-азу плазматичної мембрани [7], але її легко заінгібувати, додавши до середовища інкубації оубаїн (строфантин G) або строфантин K. Тому можна припустити, що ЕГТА-чутливою частиною АТФ-азної активності можна характеризувати ферментативну активність клітинних Ca<sup>2+</sup>-помп.

Еозин Y є інгібітором Ca<sup>2+</sup>-АТФ-аз багатьох типів клітин (Ca<sup>2+</sup>-помпи плазматичної мембрани еритроцитів [20], Ca<sup>2+</sup>-помп гладеньком'язових клітин [8], слинних залоз личинки дзвінця [11–13], Ca<sup>2+</sup>-помпи ендоплазматичного ретикулулу клітин міометрія [9]). Він інгібує функціонування транспортних АТФ-аз за рахунок адсорбції з АТФ-зв'язуючим центром цих ферментів. Використання еозину Y допомагає оцінити активність власне транспортних АТФ-аз.

#### Матеріали та методи

Дослідження проводили на нелінійних щурах масою 170–240 г, яких утримували в стаціонарних умовах віварію. Усі маніпуляції з тваринами проводили згідно з Міжнародною конвенцією роботи з тваринами та Законом України «Про захист тварин від жорстокого поводження».

##### *Ізолювання секреторних клітин зовнішньоорбітальної слюзової залози щура*

Після наркотизації тварини хлороформом і декапітації швидко виділяли зовнішньоорбітальну слюзову залозу (*glandula orbitalis externa*) й очищали її від сполучної тканини.

Для ізолювання секреторних клітин зовнішньоорбітальної слюзової залози щура використали модифікований нами метод В. Герцога, Г. Сайдеса і Ф. Міллера [21]. Підібравши умови ізолювання, ми встановили, що оптимальним є використання дворазової почергової інкубації у позаклітинному Ca<sup>2+</sup>-вмісному середовищі, до складу якого входить суміш колагенази та лідази, і позаклітинному середовищі, яке містить ЕГТА (2 ммоль/л). Спочатку у відпрепаровану залозу ін'єкцією вводили суміш колагенази (690 од./мл) з лідазою (400 од./мл), розчинених на основі позаклітинного середовища такого складу (ммоль/л): NaCl – 119, KCl – 6, MgCl<sub>2</sub> – 1,2, HEPES – 10, CaCl<sub>2</sub> – 1, глюкоза – 10, NaHCO<sub>3</sub> – 25; pH 7,4. Після цього залозу інкубували 25 хв у водяному термостаті при температурі 37°C та помірному струшуванні. Після завершення інкубації змінювали розчин на позаклітинний, що містить ЕГТА (2 ммоль/л), та інкубували у ньому протягом 5 хв. Повторно інкубували у Ca<sup>2+</sup>-вмісному позаклітинному середовищі, до складу якого входить суміш колагенази та



лідази (15 хв), піпетували наконечниками з отвором різного діаметра у безкальцієвому ЕГТА-вмісному позаклітинному середовищі, після чого промивали у  $\text{Ca}^{2+}$ -вмісному розчині.

Кількість клітин підраховували за допомогою камери Горяєва. Інтактність плазматичної мембрани контролювали візуально, з використанням світлового мікроскопа. Для цього 0,2% розчин трипанового синього, виготовленого на основі номінально безкальцієвого позаклітинного середовища, змішували зі суспензією клітин в однакових об'ємах і через 2–3 хв розглядали під мікроскопом. Відсутність забарвлення ядра свідчить про цілісність плазматичних мембран клітин.

#### *Пермеабілізація плазматичної мембрани клітин*

Метод пермеабілізації плазматичної мембрани за допомогою дигітоніну часто застосовують для різних клітин [2, 14, 16, 22, 24].

Для сльозової зовнішньоорбітальної залози оптимальну концентрацію дигітоніну (50 мкг/мл у розрахунку на 0,5 млн клітин) ми підібрали експериментально. Спочатку клітини інкубували з дигітоніном протягом 10 хв при 37°C у середовищі, наближеному за іонним складом до внутрішньоклітинного (ммоль/л):  $\text{KCl}$  – 140,  $\text{MgCl}_2$  – 1,5,  $\text{CaCl}_2$  – 0,0274, ЕГТА – 0,1 ( $[\text{Ca}^{2+}] \approx 10^{-7}$  моль/л),  $\text{HEPES}$  – 10; рН 7,2. Концентрацію вільного  $\text{Ca}^{2+}$  розраховували за допомогою програми *MaxChelator* (<http://maxchelator.stanford.edu/CaMgATPEGTA-TS.htm>). Після пермеабілізації клітини двічі промивали наближеним за складом до внутрішньоклітинного розчином без дигітоніну. Ступінь пермеабілізації оцінювали візуально, шляхом фарбування трипановим синім.

#### *Визначення концентрації неорганічного фосфату і оцінка АТФ-азної активності*

Після відмивання клітин від дигітоніну суспензію розділяли на аліквоти й інкубували у відповідних середовищах протягом 15 хв. З метою блокування  $\text{Na}^+$ – $\text{K}^+$ -помпи до всіх середовищ додавали строфантин К (100 мкмоль/л) або оубаїн (25 мкмоль/л), для блокування дихального ланцюга – азид натрію (10 ммоль/л). АТФазну реакцію запускали додаванням до середовища АТФ (3 ммоль/л). Після інкубації центрифугували протягом 5 с при 1600 g і швидко відбирали проби для визначення концентрації неорганічного фосфату ( $P_n$ ) методом УФ-детекції та методом Фіске-Суббароу. Для серій встановлення часової та концентраційної залежності АТФ-азну реакцію зупиняли додаванням до середовища інкубації 20% трихлороцтової кислоти (ТХО). Вміст  $P_n$ , який визначали у середовищах із різними концентраціями АТФ, був постійним протягом часу інкубації, і прямо пропорційно залежав від концентрації АТФ. За умов інкубації клітин без АТФ рівень  $P_n$  відображав його базовий вміст у клітинах, а також той фосфат, який вивільнявся внаслідок гідролізу ендогенного АТФ.

Концентрацію  $\text{Ca}^{2+}$  у середовищі моделювали шляхом застосування  $\text{Ca}^{2+}$ -ЕГТА-буферу (100 мкмоль/л ЕГТА). Різницю між вмістом  $P_n$  у середовищі з низькою концентрацією  $\text{Ca}^{2+}$  ( $10^{-7}$  моль/л) і середовищем, котре містило 2 ммоль/л ЕГТА (безкальцієве), вважали показником  $\text{Ca}^{2+}$ -чутливої АТФ-азної активності, а зі середовищем, котре містило еозин Y, – показником еозин Y-чутливої АТФ-азної активності.

#### *Статистичний аналіз результатів досліджень*

Математично-статистичне опрацювання даних здійснювали з використанням пакету програм Microsoft Excel. Вірогідність різниці між статистичними групами визначали за Стьюдентом, за статистично достовірні приймали зміни з  $P < 0,05$  [5].

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

Для експериментального обґрунтування методу визначення АТФ-азної активності в умовах *in situ* спочатку визначили вміст  $P_n$  у середовищах, що містили (1) клітини, (2)

АТФ чи (3) клітини і АТФ після 15 хв інкубації при температурі 37°C. З'ясувалося, що рівень  $P_n$ , визначений як методом Фіске-Суббароу, так і методом УФ-детекції, був найнижчим у середовищі, котре містило лише пермеабілізовані клітини (табл. 1). Досить високою виявилася концентрація  $P_n$  у середовищі, що містило лише АТФ. Але у середовищі, яке містило і клітини, і АТФ, концентрація  $P_n$  була найвищою (табл. 1). При цьому його вміст у середовищі, що містило суміш АТФ і клітин, визначеного методом Фіске-Суббароу, був у  $21,07 \pm 4,33$  рази вищим, ніж у середовищі, котре містило лише клітини, а методом УФ-детекції – у  $16,93 \pm 2,46$  рази (табл. 1).

Алгебраїчна сума вмісту  $P_n$  в 1 мл середовища, що містило лише АТФ, і в середовищі, до якого додавали клітини, є суттєво нижчою, ніж його вміст у середовищі з клітинами та АТФ. Так, зокрема, вміст  $P_n$ , визначений методом Фіске-Суббароу, був на  $34,57 \pm 4,07\%$  нижчим, а методом УФ-детекції – на  $25,16 \pm 4,38\%$  (див. табл. 1). Отримані результати свідчать про функціонування за таких умов АТФ-аз у секреторних клітинах зовнішньоорбітальної слюзової залози щура.

Отже, обома методами (Фіске-Суббароу та УФ-детекції) отримано подібні результати. Проте визначення  $P_n$  методом УФ-детекції є значно швидшим, за чутливістю не поступається методу Фіске-Суббароу, тому в усіх подальших серіях експериментів було застосовано цей метод.

Таблиця 1

Вміст  $P_n$  у середовищах (мкмоль/л), що містять пермеабілізовані секреторні клітини слюзових залоз, АТФ та їх суміш ( $M \pm m$ )

Метод визначення $P_n$	Середовище, що містить			Сумарна АТФ-азна активність (мкмоль $P_n$ /л)
	АТФ і клітини	клітини	АТФ	
За Фіске-Суббароу, (n=6)	669,22±84,39	42,01±13,65 ***	386,97±45,59 **	240,23±48,54 ***
УФ-детекції (n=8)	438,12±27,99	32,86±8,01 ***	289,02±11,58 ***	116,24±25,57 ***

**Примітки.** АТФ-азну активність розраховували як різницю між вмістом  $P_n$  у середовищі, що містило АТФ та клітини, і сумою його вмісту в середовищах, що містили лише клітини та лише АТФ;  $[Ca^{2+}] = 10^{-7}$  моль/л,  $[K^+] = 140$  ммоль/л,  $[строфантин К] = 100$  мкмоль/л,  $[АТФ] = 3$  ммоль/л,  $[NaN_3] = 10$  ммоль/л; час інкубації 15 хв, 37°C; кількість клітин у пробах 130–635 тис; для пермеабілізації плазматичної мембрани використано дигітонін (30 мкг/мл розрахунку на 1 млн клітин); \*\* – різниця порівняно з контролем відповідної групи достовірна з  $P < 0,01$ , \*\*\* –  $P < 0,001$

У подальших серіях експериментів підбирали оптимальний час інкубації клітин і оптимальну концентрацію АТФ у середовищі для дослідження  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ -АТФ-азної активності за умов *in situ*. Для цього виділені та пермеабілізовані клітини розділяли на аліквоти й інкубували в середовищі (1) з низькою концентрацією  $Ca^{2+}$  без інгібітора  $Ca^{2+}$ -АТФаз, (2) з низькою концентрацією  $Ca^{2+}$  та еозином Y і (3) в ЕГТА-вмісному середовищі.

Встановлено, що вміст  $P_n$  у середовищі з низькою концентрацією  $Ca^{2+}$  без інгібітора (у контролі) достовірно зростав протягом часу інкубації клітин і на 1, 2,5, 5, 10 та 15 хв це зростання становило  $10,42 \pm 2,69$ ,  $17,47 \pm 2,89$ ,  $28,90 \pm 5,31$ ,  $47,91 \pm 8,82$  і  $59,90 \pm 13,56\%$  (табл. 2). Оскільки вміст  $P_n$  у середовищах зростав практично лінійно, ми можемо стверджувати, що субстрат (АТФ) у ході гідролісної реакції за 15 хв використовується не повністю. Це підтверджується і розрахунками. Так, із 3 мкмоль доданого АТФ (кількість АТФ за концентрації 3 ммоль/л в 1 мл розчину) може утворитися 3 мкмоль  $P_n$ . Ми ж визначили, що у контролі в 1 мл середовища інкубації вміст  $P_n$  в середньому становив 0,19 мкмоль, а, отже, за 15 хв інкубації використовується лише приблизно 6,3% доданого АТФ.

Вміст  $P_n$  у середовищах, що містили еозин Y (10 мкмоль/л) або ЕГТА (2 ммоль/л) також зростає зі збільшенням часу інкубації, проте у цьому випадку зміни були менш вираженими (табл. 2). Так, у середовищі, що містило еозин Y, вміст  $P_n$  зростає за 2,5, 5, 10 і 15 хв інкубації на  $15,87 \pm 4,37$ ,  $23,10 \pm 5,20$ ,  $38,96 \pm 8,47$  і  $47,84 \pm 11,61\%$  відповідно, а у ЕГТА-вмісному середовищі – на  $16,98 \pm 4,54$ ,  $31,44 \pm 7,96$ ,  $42,99 \pm 8,86$  і  $48,37 \pm 10,54\%$  порівняно з вмістом  $P_n$  до початку інкубації (0 хв). Правда, за наявності у середовищі еозину Y вміст  $P_n$  був достовірно менший, ніж у контролі, починаючи лише з 5 хв інкубації, а за наявності ЕГТА – лише на 15 хв (табл. 2). При дослідженні  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ -АТФ-азної активності суспензії мембранних везикул інгібітори діють вже на 1–2 хв інкубації [3, 4]. Певна часова затримка при дослідженні АТФ-азної активності в умовах *in situ*, можливо, спричинена тим, що проникнення речовин до транспортувальних систем крізь плазматичну мембрану є більш тривалим, ніж за їх додавання до фракції мембранних везикул або/і більшою дисперсією отриманих даних.

Таблиця 2

Часова динаміка вмісту  $P_n$  (мкмоль/млн клітин) у середовищах, що містили пермеабілізовані клітини сльозових залоз і АТФ ( $M \pm m$ )

Середовище	Час інкубації					
	0 хв	1 хв	2,5 хв	5 хв	10 хв	15 хв
Контроль	1,05±0,03	1,16±0,06 *	1,23±0,05 **	1,35±0,07 **	1,55±0,10 **	1,72±0,14 **
Еозин Y (10 мкмоль/л)	1,06±0,03	1,12±0,04	1,22±0,05 *	1,30±0,07 **, #	1,47±0,09 **, #	1,56±0,10 **, #
ЕГТА (2 ммоль/л)	1,05±0,03	1,11±0,04 *	1,22±0,06 *	1,38±0,10 *	1,50±0,10 **	1,55±0,11 **, #

**Примітки.**  $[Ca^{2+}] = 10^{-7}$  моль/л,  $[K^+] = 140$  ммоль/л,  $[ouabain] = 25$  мкмоль/л,  $[АТФ] = 3$  ммоль/л,  $[NaN_3] = 10$  ммоль/л; час інкубації 15 хв, 37°C; \* – різниця порівняно з вмістом  $P_n$  до початку інкубації (0 хв) достовірна з  $P < 0,05$ , \*\* – з  $P < 0,01$ ; # – різниця порівняно з контролем для відповідного часу інкубації достовірна з  $P < 0,05$ ; n=6–7.

Виходячи з даних, представлених у табл. 2, розраховували середню швидкість еозин Y-чутливої і  $Ca^{2+}$ -чутливої АТФ-азних реакцій досліджуваних клітин протягом часу інкубації (рис. 1). Певний максимум в обох випадках спостерігається на 1 хв інкубації, але він виявився недостовірним за рахунок значної дисперсії даних. На 2,5 хв інкубації показники еозин Y-чутливої і  $Ca^{2+}$ -чутливої АТФ-азних активностей зменшувалися до нуля, після чого плавно зростали і відповідно на 5 та 15 хв інкубації виходили на плато. З наведених результатів випливає, що оптимальний час інкубації для дослідження  $Ca^{2+}$ -АТФ-азної активності пермеабілізованих секреторних клітин досліджуваних залоз в умовах *in situ* становить 15 хв, оскільки саме у цій точці результати були найбільш стабільними. Зокрема, саме на 15 хв інкубації середні швидкості еозин Y-чутливої АТФ-азної реакції і  $Ca^{2+}$ -чутливої АТФ-азної реакції були однаковими і становили  $0,008 \pm 0,003$  мкмоль  $P_n$  / (млн клітин  $\times$  хв). Крім цього, значення АТФ-азної активності за такого часу інкубації виходить на плато, дисперсія даних є невеликою, що свідчить про високу відтворюваність отриманих даних.

У ході визначення оптимальної концентрації екзогенного АТФ у середовищі для дослідження  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ -АТФ-азної з'ясувалося, що вміст  $P_n$  у всіх середовищах інкубації суттєво залежить від кількості субстрату (табл. 3).

Розраховані еозин Y-чутлива та  $Ca^{2+}$ -чутлива АТФ-азні активності теж залежать від концентрації екзогенного АТФ у середовищі інкубації (рис. 2). Максимальна  $Ca^{2+}$ -чутлива АТФазна активність спостерігається при 2 ммоль/л екзогенного АТФ і становить  $0,21 \pm 0,01$  мкмоль  $P_n$  / (млн клітин  $\times$  15 хв), а еозин Y-чутлива АТФ-азна активність – при 3 ммоль/л у середовищі і становить  $0,23 \pm 0,05$  мкмоль  $P_n$  / (млн клітин  $\times$  15 хв).

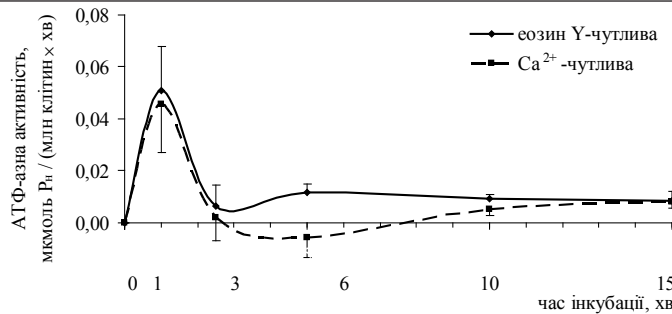


Рис. 1. Середня швидкість еозин Y-чутливої та Ca<sup>2+</sup>-чутливої АТФ-азних реакцій ізолюваних пермеабілізованих секреторних клітин зовнішньоорбітальної слюзової залози щура: первинні дані й умови дослідження представлені у табл. 2; середню швидкість Ca<sup>2+</sup>-чутливої АТФ-азної реакції розраховували відношення різниці вмісту P<sub>n</sub> у контролі ([Ca<sup>2+</sup>]=10<sup>-7</sup> моль/л) і середовищі, що містило ЕГТА (2 ммоль/л) до часу інкубації, а еозин Y-чутливої – різниці вмісту P<sub>n</sub> у контролі та його вмісту в середовищі, що містило еозин Y.

Таблиця 3

Залежність вмісту P<sub>n</sub> (мкмоль/млн клітин) від концентрації АТФ у середовищі інкубації пермеабілізованих секреторних клітин (M±m)

Середовища	АТФ				
	0 ммоль/л	1 ммоль/л	2 ммоль/л	3 ммоль/л	5 ммоль/л
Контроль	0,08±0,00	1,02±0,03 ***	1,48±0,04***	1,68±0,07 ***	2,10±0,02 ***
Еозин Y (10 мкмоль/л)	0,08±0,00	0,95±0,06 ***	1,28±0,03 ***, ##	1,45±0,03***, #	1,95±0,02 ***, #
ЕГТА (2ммоль/л)	0,08±0,00	0,86±0,05 ***, #	1,27±0,03 ***, ##	1,51±0,07 ***, #	2,01±0,04 ***, #

**Примітки.** [Ca<sup>2+</sup>]=10<sup>-7</sup> моль/л, [K<sup>+</sup>]=140 ммоль/л, [оубаїн]=25 мкмоль/л, [NaN<sub>3</sub>]=10 ммоль/л; час інкубації 15 хв, 37°C; \*\*\* – різниця порівняно з вмістом P<sub>n</sub> у середовищі, котре не містило АТФ для відповідної групи достовірна з P<0,001; # – різниця порівняно з контролем достовірна з P<0,05, ## – з P<0,01; n=5.

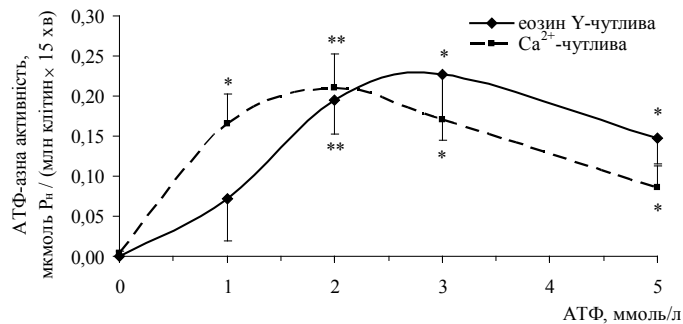


Рис. 2. Залежність еозин Y-чутливої і Ca<sup>2+</sup>-чутливої АТФ-азної активностей ізолюваних пермеабілізованих секреторних клітин зовнішньоорбітальної слюзової залози щура від концентрації екзогенного АТФ у середовищі інкубації: первинні дані й умови дослідження представлені у табл. 3; Ca<sup>2+</sup>-чутливу АТФ-азну активність розраховували як різницю вмісту P<sub>n</sub> у контролі (10<sup>-7</sup> моль/л Ca<sup>2+</sup>) та безкальцієвому (2 ммоль/л ЕГТА) середовищах, а еозин Y-чутливу – шляхом віднімання від вмісту P<sub>n</sub> у контролі його вмісту в середовищі з еозином Y; \* – зміна порівняно з клітинами, які інкубувалися у середовищах без екзогенного АТФ (0 ммоль/л АТФ), достовірна з P<0,05; \*\* – з P<0,05.

При дослідженні АТФ-азної активності фракції мембранних везикул клітин підщелепних залоз щура встановлено [1], що  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-азна активність змінюється двофазно, а саме стрімко зростає зі збільшенням концентрації АТФ у середовищі інкубації до 0,1 ммоль/л з подальшим виходом на плато при концентрації АТФ 0,1–0,2 ммоль/л. У діапазоні 0,7–3 ммоль/л у середовищі відбувалося подальше збільшення  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-азної активності, котра досягала максимуму за 2 ммоль/л АТФ у середовищі; подальше збільшення концентрації екзогенного АТФ до 3 ммоль/л призводить до деякого зменшення як тапсигаргіннечутливої  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-азної активності плазматичної мембрани, так і тапсигаргінчутливої  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-азної активності ендоплазматичного ретикулу (на що, правда, автори уваги не звернули). Фактично, за високих концентрацій АТФ наші дані відповідають цим результатам, отриманим на мембранних везикулах слинних залоз. Про залежність АТФ-азних активностей від концентрації АТФ за низького діапазону ми, на жаль, нічого не можемо говорити, оскільки рівень ендогенного АТФ у ізольованих клітинах є, очевидно, досить високий.

З'ясувалося також, що АТФ-азна активність суспензії пермеабілізованих секреторних клітин залежить від концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  у середовищі. Причому максимума як сумарної, так і еозин Y-нечутливої АТФ-азної активності спостерігаються при  $\text{pCa}6$  ( $10^{-6}$  моль/л  $\text{Ca}^{2+}$  у середовищі; рис. 3). Інгібуючий ефект еозину Y при  $\text{pCa}7$  становив 11,37%, при  $\text{pCa}6$  – 12,22%, а при  $\text{pCa}4$  – 15,25%. Тому ми нічого не можемо стверджувати про залежність еозин Y-чутливої АТФ-азної активності від концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  у середовищі.

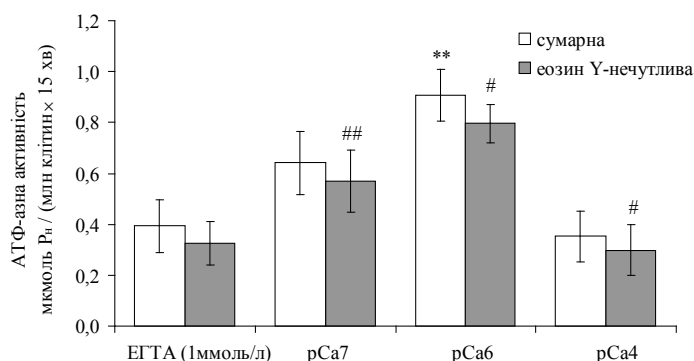


Рис. 3. Сумарна і еозин Y-нечутлива АТФ-азні активності пермеабілізованих клітин слизових залоз у середовищах із різною концентрацією  $\text{Ca}^{2+}$ :  $[\text{K}^+]=140$  ммоль/л, [строфантин К]=100 мкмоль/л, [АТФ]=3 ммоль/л,  $[\text{NaN}_3]=10$  ммоль/л; [еозин Y]=20 мкмоль/л; [EGTA]=1 ммоль/л; час інкубації 15 хв,  $37^\circ\text{C}$ ; для пермеабілізації плазматичної мембрани використано дигітонін (у концентрації 30 мкг/мл у розрахунку на 1 млн клітин); \*\* – різниця порівняно з 1 ммоль/л EGTA достовірною з  $P<0,01$ ; # – різниця порівняно з контролем для відповідної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  достовірною з  $P<0,05$ ; ## –  $P<0,01$ ;  $n=6-7$ .

Дані літератури стосовно залежності АТФ-азної активності від концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  у середовищі інкубації суттєво відрізняються між собою. Зокрема, на фракції мембранних везикул підщелепної залози щура встановлено [1], що при концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  у середовищі інкубації 0,007–0,020 мкмоль/л спостерігали зростання активності  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-аз як ендоплазматичного ретикулу, так і плазматичної мембрани. Подальше підвищення концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  до 0,05 мкмоль/л не викликало змін  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-азної активності, а у концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  0,08–1,20 мкмоль/л (приблизно  $\text{pCa}8-6$ ) призводило до вираженішої

активації АТФ-азної активності й ендоплазматичного ретикулуому та плазматичної мембрани. Вищих концентрацій автори не перевіряли.

Дані інших авторів свідчать про куполоподібність залежності  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-азних активностей від концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  у середовищі інкубації. Зокрема, дослідженнями, проведеними на слинних залозах личинки комара-дергуна, встановлено, що залежність  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-азної активності фракції клітинних мембран від концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  має куполоподібний характер із максимумом при  $p\text{Ca}4$ . Вищі концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  пригнічували  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-азну активність мембран цих клітин [7, 11].  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-азна активність плазматичної мембрани еритроцитів свиней і курей також залежить від концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  у середовищі, ця залежність має куполоподібний характер із максимумом при  $p\text{Ca}6$  [17].

На наступному етапі нами було досліджено вплив еозину Y різної концентрації на власне  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-азну активність секреторних клітин зовнішньоорбітальної слюзової залози щура. З'ясувалося, що при концентрації еозину Y у середовищі 5, 20, 50 і 100 мкмоль/л зменшення вмісту  $P_n$  становило  $6,20 \pm 1,19$ ,  $10,14 \pm 3,52$ ,  $12,20 \pm 1,88$  і  $16,98 \pm 2,63\%$  відповідно (табл. 4).

Таблиця 4

Концентраційна залежність впливу еозину Y на вміст  $P_n$  (мкмоль / млн клітин) у середовищах, що містили пермеабілізовані клітини слюзових залоз і АТФ ( $M \pm m$ )

Еозин Y					ЕГТА
0 мкмоль/л	5 мкмоль/л	20 мкмоль/л	50 мкмоль/л	100 мкмоль/л	
$2,96 \pm 0,18^{**}$	$2,77 \pm 0,14^*$	$2,65 \pm 0,16^{**}$	$2,59 \pm 0,15^{**}$	$2,46 \pm 0,18^{**}$	$2,66 \pm 0,15^{**}$

**Примітки.**  $[\text{Ca}^{2+}] = 10^{-7}$  моль/л,  $[\text{K}^+] = 140$  ммоль/л, [оубаїн] = 25 мкмоль/л, [АТФ] = 3 ммоль/л,  $[\text{NaN}_3] = 10$  ммоль/л; [ЕГТА] = 1 ммоль/л; n=6; час інкубації 15 хв, 37°C; \* – різниця порівняно з контролем (0 мкмоль/л еозину Y) достовірна з  $P < 0,05$ , \*\* – з  $P < 0,01$ .

Встановлено, що еозин Y дозозалежно зменшує  $\text{Ca}^{2+}$ -чутливу АТФ-азну активність пермеабілізованих клітин зовнішньоорбітальної слюзової залози щура: у концентрації 5 мкмоль/л – до  $31,78 \pm 11,15\%$  від контролю, а у концентрації 20 мкмоль/л показано повне інгібування  $\text{Ca}^{2+}$ -чутливої АТФ-азної активності досліджуваних клітин в умовах *in situ* (рис. 4). За вищих концентрацій (50 і 100 мкмоль/л) еозин Y неспецифічно пригнічував, очевидно, інші АТФ-ази, які не пов'язані з функціонуванням транспортувальних систем (транспорт секреторних везикул, переміщення елементів цитоскелету, синтетичні процеси тощо).

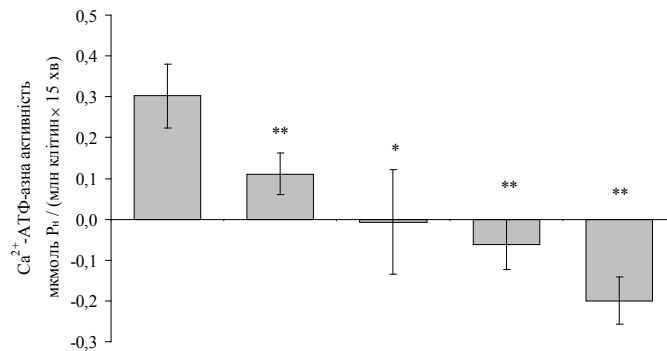


Рис. 4. Концентраційна залежність впливу еозину Y на  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-азну активність ізольованих пермеабілізованих клітин зовнішньоорбітальної слюзової залози щура: первинні дані й умови дослідження представлені у табл. 3;  $\text{Ca}^{2+}$ -чутливу АТФ-азну активність розраховували як різницю вмісту  $P_n$  у  $\text{Ca}^{2+}$ -вмісному середовищі з відповідною концентрацією еозину Y та безкальцієвому (2 ммоль/л ЕГТА) середовищах; \* – різниця порівняно з контролем (без інгібітора) достовірна з  $P < 0,05$ , \*\* –  $P < 0,01$ .

Відомо, що еозин Y інгібує  $\text{Ca}^{2+}$ -помпу як плазматичної мембрани, так і ендоплазматичного ретикулулу [9, 20], а специфічним інгібітором усіх відомих ізоформ  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-аз ендоплазматичного ретикулулу є тапсигаргін [26]. Тому в наступній серії експериментів було порівняно вплив еозину Y і тапсигаргину на вміст  $\text{P}_n$  у середовищі після інкубації пермеабілізованих секреторних клітин слизових залоз.

Відсоток зменшення вмісту  $\text{P}_n$  у пробах під впливом тапсигаргину (1 мкмоль/л) та еозину Y (10 мкмоль/л) був практично однаковим і становив  $7,94 \pm 2,16$  і  $8,65 \pm 2,30\%$  відповідно ( $P < 0,05$ ,  $n=5$ ; табл. 5).

Таблиця 5

Вміст  $\text{P}_n$  (мкмоль  $\text{P}_n$  / млн клітин) у середовищі після інкубування пермеабілізованих клітин слизової залози за дії еозину Y і тапсигаргину ( $M \pm m$ )

Контроль	Еозин Y	Тапсигаргін	ЕГТА
$3,10 \pm 0,20$	$2,83 \pm 0,16$ *	$2,85 \pm 0,16$ *	$2,77 \pm 0,13$ *

**Примітки.**  $[\text{Ca}^{2+}] = 10^{-7}$  моль/л,  $[\text{K}^+] = 140$  ммоль/л, [оубаїн] = 25 мкмоль/л, [АТФ] = 3 ммоль/л,  $[\text{NaN}_3] = 10$  ммоль/л; [еозин Y] = 10 мкмоль/л; [тапсигаргін] = 1 мкмоль/л; [ЕГТА] = 2 ммоль/л; час інкубації – 15 хв; \* – різниця порівняно з контролем (без інгібіторів) достовірна з  $P < 0,05$ ;  $n=5$ .

Розрахована  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-азна активність досліджуваних клітин повністю інгібується еозином Y (10 мкмоль/л), тоді як тапсигаргін у концентрації 1 мкмоль/л зменшує її лише на  $72,02 \pm 15,44\%$  (рис. 5). Оскільки ця концентрація тапсигаргину є досить високою (відомо, наприклад, що за цієї концентрації  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-аза саркоплазматичного ретикулулу скелетних м'язів кролів інгібується повністю [27]), ми припускаємо, що тапсигаргіннечутлива  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-азна активність пов'язана із функціонуванням  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи плазматичної мембрани. Хоча, звичайно, повністю відкидати внесок інших АТФ-аз (нетранспортних) у цей показник ми не маємо підстав. Отже,  $\text{Ca}^{2+}$ -помпа і плазматичної мембрани, і ендоплазматичного ретикулулу відіграє важливу роль у функціонуванні досліджуваних клітин.

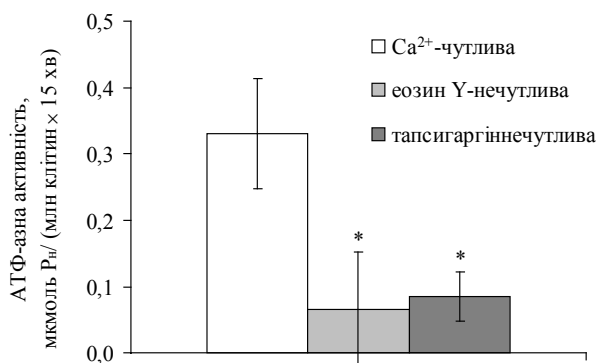


Рис. 5. Вплив еозину Y і тапсигаргину на АТФ-азну активність ізольованих пермеабілізованих секреторних клітин слизової залози: первинні дані й умови дослідження представлені у табл. 5; АТФ-азну активність розраховували як різницю вмісту  $\text{P}_n$  у контролі або середовищі, що містить еозин Y чи тапсигаргін ( $10^{-7}$  моль/л  $\text{Ca}^{2+}$ ), та безкальцієвому (2 ммоль/л ЕГТА) середовищі; \* – зміна порівняно з контролем достовірна з  $P < 0,05$ .

З метою з'ясування особливостей функціонування  $\text{Ca}^{2+}$ -помп плазматичної мембрани чи ендоплазматичного ретикулулу визначають  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-азну активність на її очищених препаратах [15] або везикулах плазматичної мембрани чи ендоплазматичного ретикулулу, отриманих шляхом диференційного центрифугування [3, 4].

Використання очищеної  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-ази є доцільним лише у дослідженнях впливу інгібіторів/активаторів на конкретну транспортувальну систему, які, однак, не дають жодних уявлень про функціонування цієї системи у цілісній клітині. В інтактних клітинах існують складні взаємозв'язки між  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальними системами різних органел [11, 18, 19], які руйнуються у процесі отримання не лише очищеної  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-ази, а й мембранних препаратів. Властивості клітинних  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальних систем неможливо пояснити без урахування цих складних взаємозв'язків. Крім того, слід зазначити, що при диференціальному центрифугуванні складно оцінити у кожній пробі характер везикульованості мембран (визначити тип везикул – *inside-out* чи *outside-out*), що також може суттєво впливати на інтерпретацію результатів досліджень.

Дослідження на пермеабілізованих клітинах (*in situ*) дає змогу визначати активність  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-аз, не порушуючи внутрішньоклітинних зв'язків між органелами та їх транспортувальними системами, тобто в умовах, найбільш наближених до природних. Крім того, такий підхід значно спрощує процедуру досліду, мінімізує вплив часової складової та вплив проведення самих процедур на результат досліджень. Причому, використовуючи метод визначення АТФ-азної активності й інгібіторний аналіз, можна досліджувати властивості не лише  $\text{Ca}^{2+}$ -помп ендоплазматичного ретикулуму, а й помп плазматичної мембрани. Звичайно, з урахуванням того, що  $\text{Ca}^{2+}$ - чи  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -помпа плазматичної мембрани не виконують своїх транспортних функцій.

Власне, використовуючи метод визначення АТФ-азної активності й інгібіторний аналіз, ми отримали підтвердження наявності  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи ендоплазматичного ретикулуму пермеабілізованих клітин зовнішньоорбітальної слізозової залози щура. Ця помпа ефективно інгібується еозином Y (10–20 мкмоль/л) і тапсигаргіном (1 мкмоль/л), що узгоджується з попередньо проведеними дослідженнями їх впливу на вміст  $\text{Ca}^{2+}$  у цих клітинах [10].

Зокрема, зменшення вмісту  $\text{Ca}^{2+}$  у пермеабілізованих клітинах слізозових залоз протягом часу їхньої інкубації найбільш чітко виражене на 1 хв [10], що збігається з піком  $\text{Ca}^{2+}$ -чутливої та еозин Y-чутливої АТФ-азної активності досліджуваних клітин (див. рис. 1). Причиною такого зменшення вмісту  $\text{Ca}^{2+}$  у пермеабілізованих клітинах є його вивільнення з внутрішньоклітинних депо. У свою чергу, вивільнений у цитозоль  $\text{Ca}^{2+}$  активує  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-ази і не лише ендоплазматичного ретикулуму. Але оскільки транспортна функція  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи плазматичної мембрани порушена, то це не супроводжується зменшенням рівня  $\text{Ca}^{2+}$  у цитозолі. Фактично, порушується механізм, що (само)обмежує перебіг  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-азної реакції. Тому  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-азна активність пермеабілізованих клітин ще більше інтенсифікується, внаслідок чого рівень АТФ у цитозолі починає зменшуватися, а це призводить, у кінцевому випадку, до пригнічення функціонування  $\text{Ca}^{2+}$ -помп ендоплазматичного ретикулуму і стрімкого зменшення вмісту депонованого  $\text{Ca}^{2+}$ .

Сповільнення вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  на 2,5–5 хв та його дифузія з цитозолу пермеабілізованих клітин у позаклітинне середовище, як свідчать наші попередні результати [10], спричиняє пригнічення  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-азної активності, і лише на 10–15 хв інкубації система стабілізується.

Отже, оптимальний час інкубації для дослідження  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-азної активності пермеабілізованих секреторних клітин зовнішньоорбітальної слізозової залози щура в умовах *in situ* становить 15 хв, а оптимальна концентрація екзогенного АТФ – 2–3 ммоль/л. Ця  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-азна активність ефективно інгібується еозином Y (10–20 мкмоль/л) і тапсигаргіном (1 мкмоль/л), що слугує підтвердженням функціонування у досліджуваних клітинах  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи ендоплазматичного ретикулуму.



## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Вац Ю. О., Клевець М. Ю., Федірко Н. В. Кінетичні характеристики  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФаз клітин підщелепної слинної залози щурів // Укр. біохім. журнал. 2004. Т. 76. № 6. С. 44–54.
2. Великопольська О. Ю., Манько Б. О., Манько В. В. Ендоплазматично-мітохондріальна  $\text{Ca}^{2+}$ -функціональна одиниця: залежність дихання секреторних клітин від активності ріанодин- та  $\text{I}\Phi_3$ -чутливих  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів // Укр. біохім. журнал. 2012. Т. 84. № 5. С. 76–88.
3. Гричан Н., Копач О., Макаровська Р. та ін. Взаємодія  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортних систем плазматичної мембрани та мембран внутрішньоклітинних депо  $\text{Ca}^{2+}$  в ацинарних клітинах підщелепної слинної залози // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2010. Вип. 53. С. 167–180.
4. Гричан Н. Я., Котлярова А. Б., Копач О. В., Федірко Н. В. Взаємодія між кальцієвим уніпортером мітохондрій та  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазами плазматичної мембрани та ендоплазматичного ретикулулу у клітинах підщелепної слинної залози // Біофізичні механізми функціонування живих систем : мат-ли міжнар. наук. конф. (Львів, 16–18 жовтня 2008 р). Львів, 2008. С. 39.
5. Деркач М. П., Гумецький Р. Я., Чабан М. Е. Курс варіаційної статистики. К.: Вища школа, 1977. 206 с.
6. Дубицький Л. О. Енергозалежні  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальні системи секреторних клітин екзокринних залоз та механізми взаємодії їх з катіонами металів: автореф. дис. ... д-ра біол. наук. К., 2006. 39 с.
7. Король Т. В., Манько В. В., Клевець М. Ю. Дослідження активного транспорту  $\text{Ca}^{2+}$  у секреторних клітинах слинних залоз личинки *Chironomus plumosus* L. // Біологія тварин. 2000. Т. 2. № 1. С. 92–97.
8. Костерин С. А., Браткова Н. Ф., Бабич Л. Г. и др. Влияние ингибиторов энергозависимых  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортирующих систем на кальциевые насосы гладкомышечной клетки // Укр. біохім. журнал. 1996. Т. 68. № 6. С. 50–61.
9. Костерин С. А., Бурдыга Н. В. Транспорт и внутриклеточный гомеостаз  $\text{Ca}^{2+}$  в миомерии // Успехи современ. биологии. 1993. Т. 113. № 4. С. 485–506.
10. Котлярова А. Б., Манько В. В.  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальні системи секреторних клітин зовнішньоорбітальної слюзової залози щура. I.  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи плазматичної мембрани та ендоплазматичного ретикулулу // Біологічні студії / *Studia Biologica*. 2012. Т. 6. № 2. С. 99–114.
11. Манько В. В. Системи транспортування  $\text{Ca}^{2+}$  у секреторних клітинах екзокринних залоз: Монографія. Львів: ЛНУ імені Івана Франка, 2011. 271 с.
12. Манько В. В., Бичкова С. В., Клевець М. Ю. Ідентифікація каналів вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  у секреторних клітинах слинних залоз личинки комара-дергуна // Укр. біохім. журнал. 2004. Т. 76. № 1. С. 65–71.
13. Манько В. В., Клевець М. Ю., Федірко Н. В., Король Т. В. Вплив хлорпромазину на  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортні системи плазматичної мембрани секреторних клітин слинної залози личинки *Chironomus plumosus* L. // Укр. біохім. журн. 2000. Т. 72. № 2. С. 36–41.
14. Мерлавський В. М., Манько Б. О., Іккерт О. В., Манько В. В. Енергетичні процеси ізольованих гепатоцитів за різної тривалості дії інсуліну // Біологічні Студії / *Studia Biologica*. 2010. Т. 4. № 3. С. 15–22.
15. Слінченко Н. М., Ченниш І. Г., Костерин С. О. Використання очищеної  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФази плазматичної мембрани клітин біометрія для порівняльної оцінки ефективності дії інгібіторів енергозалежного транспортування іонів кальцію // Укр. біохім. журнал. 2003. Т. 75. №. 2. С. 33–38.
16. Шлыков С. Г., Бабич Л. Г., Костерин С. А. Суспензия гладкомышечных клеток, обработанных раствором дигитонина, как модель для изучения кальциевого насоса эндоплазматического ретикулула миомерии // Биохимия. 1997. Т. 62. С. 1666–1671.

17. *Alves-Ferreira M., da Silva E. C., Ferreira-Pereira A., Scofano H. M.* Regulatory differences between  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in plasma membranes from chicken (nucleated) and pig (enucleated) erythrocytes // *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 2002. Vol. 131. N 4. P. 405–415.
18. *Armstrong C. F.* ER-mitochondria communication. How privileged? // *Physiol.* 2007. N 22. P. 261–268.
19. *Frieden M., Arnaudeau S., Castelbou C., Demaurex N.* Subplasmalemmal mitochondria modulate the activity of plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases // *J. Biol. Chem.* 2005. Vol. 280. N 52. P. 43198–43208.
20. *Gatto C., Milanick M. A.* Inhibition of the red blood cell calcium pump by eosin and other fluorescein analogues // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 1993. Vol. 264. N 6. P. 1577–1586.
21. *Herzog V., Sies H., Miller F.* Exocytosis in secretory cells of rat lacrimal gland peroxidase release from lobules and isolated cells upon cholinergic stimulation // *J. Cell Biol.* 1976. Vol. 70. P. 692–706.
22. *Horbay R. O., Manko B. O., Manko V. V.* et al. Respiration characteristics of mitochondria in parental and giant transformed cells of the murine Nemeth-Kellner lymphoma // *Cell Biol. Int.* 2012. Vol. 36. N 1. P. 71–77.
23. *Lee M. G., Xu X., Zeng W.* et al. Polarized expression of  $\text{Ca}^{2+}$  channels in pancreatic and salivary gland cells. Correlation with initiation and propagation of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  waves // *J. Biol. Chem.* 1997. Vol. 272. N 25. P. 15765–15770.
24. *Manko B. O., Klevets M. Y., Manko V. V.* An implication of novel methodology to study pancreatic acinar mitochondria under in situ conditions // *Cell Biochem. Funct.* 2012. DOI: 10.1002/cbf.2864.
25. *Tepikin A. V., Voronina S. G., Gallacher D. V., Petersen O. H.* Acetylcholine-evoked increase in the cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration and  $\text{Ca}^{2+}$  extrusion measured simultaneously in single mouse pancreatic acinar cells // *J. Biol. Chem.* 1992. Vol. 267. N 6. P. 3569–3572.
26. *Thastrup O., Dawson A.P., Scharff O.* et al. Thapsigargin, a novel molecular probe for studying intracellular calcium release and storage // *Agents Action.* 1989. Vol. 27. N 1–2. P. 17–23.
27. *Xu Ch., Ma H., Inesi G.* et al. Specific structural requirements for the inhibitory effect of thapsigargin on the  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase SERCA // *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 279. N 17. P. 17973–17979.

Стаття: надійшла до редакції 07.07.12

доопрацьована 29.10.12

прийнята до друку 31.10.12

## ATPASE ACTIVITY OF ISOLATED CELLS OF THE RAT EXORBITAL LACRIMAL GLAND UNDER *IN SITU* CONDITION

**A. Kotliarova, V. Manko**

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

Derivation of  $\text{Ca}^{2+}$  from the cytosol is energy-dependent processes in which SERCA and PMCA play fundamental role. One of the experimental approaches for the  $\text{Ca}^{2+}$ -pumps of various cells study is to determine the  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase activity of purified enzymes or vesicle of plasma membrane and endoplasmic reticulum. However, an important aspect of physiological research is the study of intracellular processes in conditions that are close to the native ones, without breaking relationships between transport systems of different

organelles as it is in *in situ* condition. The aim of this work was to evaluate the possibility of using isolated permeabilized secretory cells of lacrimal glands to study  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase activity. Research was carried out on permeabilized by digitonin secretory cells of rats exorbital lacrimal gland.  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity was evaluated based on changes in the content of inorganic phosphate in the medium, which was determined by UV detection. It was found that the optimal incubation time for ATPase activity research of exorbital lacrimal glands secretory under *in situ* condition is 15 minutes. Maximum of  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive ATPase activity was observed with 2 mmol/l of exogenous ATP and maximum eosin Y-sensitive ATPase activity was observed with 3 mmol/l.  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity was effectively inhibited by eosin Y (10–20  $\mu\text{mol/l}$ ) and thapsigargin (1  $\mu\text{mol/l}$ ). These data proved a  $\text{Ca}^{2+}$ -pump activity in endoplasmic reticulum of studied cells. Thus, a determination of the  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase activity under *in situ* condition is an adequate and sensitive method for the study of the exorbital lacrimal glands.

*Keywords:*  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase activity, eosin Y, thapsigargin, permeabilization, secretory cells, lacrimal gland,  $\text{Ca}^{2+}$  ions.

## АТФАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ ИЗОЛИРОВАННЫХ КЛЕТОК ВНЕГЛАЗНИЧНОЙ СЛЕЗНОЙ ЖЕЛЕЗЫ КРЫСЫ В УСЛОВИЯХ *IN SITU*

А. Котлярова, В. Манько

*Львовский национальный университет имени Ивана Франко  
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина  
e-mail: annkotliarova@gmail.com*

Выведение  $\text{Ca}^{2+}$  из цитозоля представляет собой энергозависимый процесс, основную роль в котором играют  $\text{Ca}^{2+}$ -помпы плазматической мембраны и эндоплазматического ретикулума. Одним из экспериментальных подходов для исследования  $\text{Ca}^{2+}$ -помп различных клеток является определение  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-азной активности ее очищенных препаратов, везикул плазматической мембраны или эндоплазматического ретикулума. Тем не менее, более ценными являются физиологические исследования внутриклеточных процессов в максимально приближенных к естественным условиям, когда не разрываются взаимосвязи между транспортными системами различных органелл. Целью настоящей работы было оценить возможность использования изолированных пермеабилizированных секреторных клеток слезных желез для исследования  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-азной активности. Исследование проведено на пермеабилizированных дигитонином секреторных клетках внеглазничной слезной железы крысы.  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-азную активность оценивали на основании изменений содержания неорганического фосфата в среде инкубации, который определяли методом УФ-детекции. Установлено, что оптимальное время инкубации для исследования АТФ-азной активности секреторных клеток внеглазничной слезной железы в условиях *in situ* составляет 15 мин. Максимум  $\text{Ca}^{2+}$ -чувствительной АТФазной активности наблюдается при 2 ммоль/л экзогенного АТФ, а эозин Y-чувствительной – при 3 ммоль/л.  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-азная активность эффективно ингибируется эозином Y (10–20 мкмоль/л) и тапсигаргином (1 мкмоль/л), что служит подтверждением функционирования в исследуемых клетках  $\text{Ca}^{2+}$ -помпы эндоплазматического ретикулума. На основании полученных нами результатов можно утверждать об адекватности предложенного метода исследования АТФ-азной активности в условиях *in situ*.

*Ключевые слова:*  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-азная активность, эозин Y, тапсигаргин, пермеабилizация, секреторные клетки, слезные железы, катионы  $\text{Ca}^{2+}$ .

## АКТИВНІСТЬ ДЕГІДРОГЕНАЗ ВУГЛЕВОДНОГО ОБМІНУ В ОРГАНІЗМІ ЩУРІВ ЗА ДІЇ ХРОМ ЦИТРАТУ

**Р. Іскра**

*Інститут біології тварин НААН  
вул. В.Стуса, 38, Львів 79034, Україна  
e-mail: iskra\_r@ukr.net*

Досліджували активність дегідрогеназ вуглеводного обміну в крові і тканинах щурів за умови додавання до їх раціону хром цитрату (10 мкг Cr/кг маси тіла). Встановлено зниження вмісту глюкози у крові щурів, підвищення вмісту глікогену в печінці та зростання активності глюкозо-6-фосфатдегідрогенази і лактатдегідрогенази у крові й тканинах щурів дослідної групи, порівняно з тваринами контрольної групи.

*Ключові слова:* щур, хром цитрат, глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа, лактатдегідрогеназа.

Тривалентний хром ( $Cr^{3+}$ ) – есенціальний елемент, який має важливе значення для життєдіяльності організму людини і тварин, бере участь у регуляції вуглеводного, білкового та ліпідного обміну. Встановлено, що хром підсилює дію інсуліну в складі хромодуліну – специфічного білка, який використовується в активації рецепторів цього гормону [13]. За недостатнього надходження хрому в організмі виникають метаболічні порушення, симптоми яких подібні до таких, що спостерігаються при діабеті та серцево-судинних хворобах [15]. Додаткове введення в дієту хворим пацієнтам Cr приводить до нормалізації рівня глюкози й інсуліну в крові [10].

На сьогодні встановлені чіткі переваги застосування мікроелементів, у т.ч. хрому, у вигляді органічних сполук, порівняно з їхніми мінеральними солями. Перспективним напрямом у вирішенні проблеми ліквідації дефіциту хрому є збагачення продуктів харчування мікроелементом у вигляді цитратів – солей лимонної кислоти, які синтезуються в організмі людини й тварин, і беруть участь в циклі Кребса. Обґрунтовані механізми значного посилення метаболічної активності й корисності хром цитратів, отриманих за аквананотехнологією [1].

Метою досліджень було встановити вплив хром цитрату в дозі 10 мкг Cr/кг маси тіла на активність дегідрогеназ гліколітичного та пентозофосфатного шляхів метаболізму глюкози в організмі самців щурів.

### **Матеріали та методи**

Дослід проведений на самцях білих лабораторних щурів лінії Вістар, масою тіла 180–200 г, яких було поділено на дві групи – контрольна і дослідна, по 4 тварини у кожній. Годівлю проводили стандартним комбікормом для щурів, з вільним доступом до кормів і води. Самцям щурів дослідної групи, на відміну від контрольної, до дистильованої води додавали розчин хром цитрату ( $C_6H_5CrO_7$ ), в дозі 10 мкг Cr/кг маси тіла. Розчин хром цитрату був одержаний методом ерозійно вибухової нанотехнології [6]. Суть цього методу полягає в отриманні водного колоїдного розчину наночастинок хрому за допомогою електроімпульсної аквананотехнології, які після безпосередньої взаємодії з лимонною кислотою утворюють розчин хром цитрату високої чистоти.

На 30-ту добу експерименту здійснювали забій самців під ефірним наркозом із дотриманням біоетичних принципів експериментів на тваринах. Матеріалом для досліджень слугували кров і тканини щурів: печінка, нирки, мозок, прямий м'яз стегна, легені, серце, селезінка. У крові та тканинах щурів визначали вміст глюкози, глікогену, активність глюкозо-6-фосфатдегідрогенази та лактатдегідрогенази [3]. Одержані експериментальні дані опрацьовували статистично з використанням методів варіаційної статистики.

### Результати і їхнє обговорення

У результаті проведених досліджень на щурах-самцях, яким вipoювали хром цитрат у концентрації 10 мкг Сг/кг маси тіла, встановлені зміни показників вуглеводного обміну в крові та тканинах внутрішніх органів. Так, у плазмі крові самців дослідної групи встановлено зниження вмісту глюкози в 1,2 разу, порівняно з показниками тварин контрольної групи, що, очевидно, зумовлене кращим надходженням глюкози до клітин різних тканин (табл. 1).

Відомо, що фізіологічну концентрацію глюкози у крові підтримує глікоген печінки. За дії хром цитрату його вміст підвищується в 1,1 разу (табл. 1), що свідчить про стимуляцію глікогенезу. У той же час вміст глікогену в м'язах стегна за дії хром цитрату знижується в 1,1 разу ( $P < 0,01$ ). Слід наголосити, що м'язовий глікоген є джерелом глюкози для самих м'язів і не регулює вміст глюкози у крові.

Таблиця 1

Вміст глюкози у крові та глікогену в тканинах щурів самців за дії хром цитрату в концентрації 10 мкг Сг/кг маси тіла ( $M \pm m$ ,  $n=4$ )

Група	Глікоген, г/кг		Глюкоза, ммоль/л
	Печінка	М'яз стегна	Кров
К	2,20±0,35	1,10±0,02	8,96±1,19
Д	2,48±0,13	0,99±0,01**	7,48±0,73

**Примітка.** У табл. 1 і 2 вірогідні різниці показників дослідної групи щодо контрольної: \* –  $P < 0,05$ , \*\* –  $P < 0,01-0,025$ , \*\*\* –  $P < 0,001-0,002$ .

Слід відзначити, що транспортування глюкози з крові у клітини відбувається за механізмом полегшеної дифузії, тобто за градієнтом концентрації за участі білка-переносника [5]. Ефективність роботи цієї транспортної системи в клітинах більшості органів і тканин (жирова тканина, скелетні м'язи) залежить від інсуліну, який збільшує проникність зовнішньоклітинної мембрани для глюкози, збільшуючи тим самим кількість білка-переносника за рахунок додаткового його надходження з цитозолу у плазмалему [12]. Однак у клітинах інсулінонезалежних тканин (печінки, мозку, клітин крові, мозкового шару нирок) ефективність переносу глюкози через їхні зовнішні мембрани не залежить від інсуліну. Тому за певних умов глюкоза незалежно від інсуліну може частково надходити у клітини цих тканин і там метаболізуватись як по шляху гліколізу, так і по пентозофосфатному шляху.

Встановлено, що за дії хром цитрату у крові і тканинах самців щурів зростає активність глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (Г-6-ФДГ) – ензиму пентозофосфатного шунту. В еритроцитах самців щурів дослідної групи активність ензиму зростає в 2,0 рази ( $P < 0,01$ ), порівняно з тваринами контрольної групи (табл. 2). Основна роль пентозофосфатного шунту гліколізу в еритроцитах полягає в утворенні НАДФН, необхідного для підтримання активності глутатіонредуктази. Таким чином реалізується зв'язок між метаболізмом моносахаридів і функціонуванням антиоксидантної системи клітин [14].

У тканинах тварин за дії хром цитрату активність Г-6-ФДГ зростає в печінці (у 2,6 рази,  $P < 0,01$ ), нирках (у 3,8 рази,  $P < 0,01$ ), мозку (в 1,2 рази), м'язі (у 2,9 рази,  $P < 0,01$ ), легенях (у 2,3 рази,  $P < 0,01$ ), серці (у 2,4 рази,  $P < 0,05$ ), селезінці (в 3,9 рази,  $P < 0,05$ ) (табл. 2).

У клітинах цих тканин організму продукт пентозофосфатного шунту – рибозо-5-фосфат є необхідний для синтезу пуринових нуклеотидів і, відповідно, нуклеїнових кислот. Отже, підтримання активності реакцій шунту на відповідному рівні має істотне значення для забезпечення пластичним матеріалом проліфераційних процесів у клітинах. Крім того, за участю Г-6-ФДГ відновлюються молекули НАДФ, які можуть використовуватися під час синтезу жирних кислот або окиснюватись ензимами дихального ланцюга [4].

Таблиця 2

Активність ензимів вуглеводного обміну в тканинах щурів-самців  
за дії хрому цитрату в концентрації 10 мкг Ст/кг маси тіла ( $M \pm m$ ,  $n=4$ )

Тканина	Глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа, мкмоль НАДФ <sup>+</sup> /хв x мг протеїну		Лактатдегідрогеназа, мкмоль НАДН /хв x мг протеїну	
	К	Д	К	Д
Кров	3,64±0,56	7,37±0,55**	38,92±1,99	48,43±2,77*
Печінка	0,35±0,08	0,90±0,04**	0,37±0,01	0,68±0,06**
Нирка	0,32±0,01	1,21±0,21**	0,33±0,05	1,24±0,05***
Мозок	0,47±0,19	0,58±0,06	2,24±0,09	0,75±0,04***
М'яз стегна	0,24±0,04	0,71±0,08**	0,31±0,05	0,42±0,08
Легеня	0,56±0,01	1,30±0,15**	0,32±0,03	0,93±0,06***
Серце	0,17±0,03	0,42±0,11*	0,44±0,04	1,44±0,21**
Селезінка	0,87±0,09	3,43±0,92*	0,25±0,02	0,67±0,07**

Активність лактатдегідрогенази (ЛДГ) – ензиму кінцевої ланки гліколізу, за дії хрому цитрату в крові зростає в 1,2 разу ( $P < 0,05$ , табл. 2). Можна припустити, що активація ензиму в еритроцитах (яким властивий анаеробний тип метаболізму) зумовлена перерозподілом в ізоензимному складі ЛДГ у напрямі збільшення частки мономерів М-типу, що забезпечує зростання співвідношення лактат/піруват [2]. Активація ЛДГ в еритроцитах свідчить про мобілізацію енергетичних ресурсів для максимального утворення молекул АТФ, необхідних для внутрішньоклітинних процесів [9].

Активність ЛДГ у тканинах щурів дослідної групи зростає в печінці (в 1,8 разу,  $P < 0,01$ ), нирках (у 3,8 разу,  $P < 0,001$ ), м'язі стегна (в 1,3 разу), легенях (у 2,9 разу,  $P < 0,001$ ), серці (у 3,3 разу,  $P < 0,01$ ) та селезінці (у 2,7 разу,  $P < 0,01$ ), за винятком мозку, де активність її знижується у 3,0 рази ( $P < 0,001$ ), порівняно з тваринами контрольної групи (табл. 2). Оскільки відомо, що у клітинах тканин з аеробним типом метаболізму (серце, нирка, печінка) переважають Н-субодиниці ЛДГ, то збільшення її ензиматичної активності в цих тканинах може вказувати на зміщення рівноваги реакції в бік утворення пірувату. Це сприяє перетворенню останнього в циклі трикарбонних кислот [11].

Тканини скелетних м'язів прийнято відносити до анаеробних тканин, хоча відомо, що вони містять два типи волокон, яким властивий гліколітичний і окисний обмін [8]. У скелетних м'язах в анаеробних умовах швидкість утворення пірувату на шляху гліколізу перевищує швидкість його окиснення в циклі трикарбонних кислот. А швидкість утворення НАДН при гліколізі вища, ніж швидкість його окиснення в дихальному ланцюгу. Тому зростання активності ЛДГ у м'язах свідчить про стимуляцію утворення лактату і НАД<sup>+</sup>, який у подальшому бере участь в окисненні гліцеральдегід-3-фосфату.

Зростання активності ЛДГ у тканинах легень і селезінки свідчить про активацію як аеробних, так і анаеробних шляхів гліколізу в цих тканинах, оскільки є дані, що в них переважають гібридні фракції ізоензимів [8].

У мозку, де глюкоза є єдиним джерелом енергії, активність ЛДГ за дії хрому цитрату знижується, що свідчить про активний перебіг окисних процесів у цій тканині, а саме – активації окисного декарбоксілювання пірувату.

Таким чином, зростання активності ензимів гліколізу (ЛДГ) та пентозофосфатного шляху (Г-6-ФДГ) у крові і тканинах щурів дослідної групи свідчить про активацію цих ланок метаболізму за дії хром цитрату. Вплив хрому може бути пов'язаний зі стимулюючою дією мікроелементу на інсулін у клітинах інсулінозалежних тканин. Однак відомо, що лише 15% глюкози поглинається інсулінозалежними тканинами, а 25% її надходить в інсулінонезалежні тканини [7], що, очевидно, відбувається за рахунок збільшення експресії генів, які визначають синтез специфічних транспортних білків за дії хрому. Зростання активності дегідрогеназ вуглеводного обміну, очевидно, відбувається за рахунок наявності достатньої кількості глюкози всередині клітини та стимуляції синтезу молекул ензимів за дії хром цитрату.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Борисевич В. Б., Борисевич Б. В., Хомин Н. М.* та ін. Здобутки нанотехнології в лікуванні та профілактиці хвороб тварин. Нановетеринарія (впровадження інноваційних технологій). К.: ДІА, 2009. 184 с.
2. *Великий М. М., Верніковська Я. І., Старикович Л. С.* Дослідження впливу вітаміну Д<sub>3</sub> на метаболічні процеси в еритроцитах щурів за умов дії екстремальних факторів // Укр. біохім. журн. 1999. Т. 71. № 6. С. 17–22.
3. *Влізло В. В., Федорук Р. С., Макар І. А.* та ін. Фізіолого-біохімічні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині: довідник. Львів: ВМС, 2004. 399 с.
4. *Гаврилов О. К., Козинец Г. И., Черняк Н. В.* Клетки костного мозга и периферической крови. М.: Медицина, 1985. 286 с.
5. *Галенова Т. І., Ракиша Н. Г., Савчук О. М., Остапенко Л. І.* Функціонування деяких ключових ферментів вуглеводного обміну у щурів за умов експериментального цукрового діабету 2-го типу // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. 2011. №2. С. 13–21.
6. Патент України на корисну модель № 29856. Спосіб отримання аквахелатів нанометалів «Ерозійно-вибухова нанотехнологія отримання аквахелатів нанометалів» / Косінов М. В., Каплуненко В. Г.; МПК (2006): B01J 13/00, B82B 3/00; Опубл. 25.01.2008; Бюл. № 2/2008.
7. *Теппермен Дж., Теппермен Х.* Физиология обмена веществ и эндокринной системы / пер. с англ. М.: Мир, 1989. 656 с.
8. *Унжаков А. Р., Илюха В. А., Мацук Н. В., Белкин В. В.* Роль изоферментов лактатдегидрогеназы в адаптациях млекопитающих Карелии // Экология. Экспериментальная генетика и физиология. Труды Карельск. науч. центра РАН. 2007. Вып. 11. С. 118–126.
9. *Agre P., Parker J. C.* Red blood cell membranes: structure, function, clinical implications // Hematology. New York: CRC Press. 1989. Vol. 11. P. 733.
10. *Cefalu W. T., Hu F. B.* Role of Chromium in Human Health and in Diabetes // Diabetes Care. 2004. Vol. 27. N 11. P. 2741–2751
11. *Quistorff B., Grunnet N.* The isoenzyme pattern of LDH does not play a physiological role; except perhaps during fast transitions in energy metabolism // Aging. 2011. Vol. 3. N 5. P. 457–460.
12. *Shigematsu S., Khan Ahmir H., Kanzaki M., Pessin J.* Intracellular insulin-responsive glucose transporter (GLUT4) distribution but not insulin-stimulated GLUT4 exocytosis and recycling are microtubule dependent // Molecular endocrinology. 2002. Vol. 16. N 5. P. 1060–1068.

13. *Vincent J. B.* The Nutritional Biochemistry of Chromium (III) / Department of Chemistry, The University of Alabama Tuscaloosa, USA, 2007. 277 p.
14. *Wiback S. J., Palsson B. O.* Extreme pathway analysis of human red blood cell metabolism // *Biophys. J.* 2002. Vol. 83. N 2. P. 808–818.
15. *Wiernsperger N. F.* Membrane physiology as a basis for the cellular effects of metformin in insulin resistance and diabetes // *Diabetes Metab.* 1999. Vol. 25. P. 110–127.

*Стаття: надійшла до редакції 27.12.11*

*доопрацьована 21.08.12*

*прийнята до друку 04.09.12*

### **THE ACTIVITY OF DEHYDROGENASES OF CARBOHYDRATE METABOLISM IN RATS UNDER THE ACTION OF CHROMIUM CITRATE**

**R. Iskra**

*Institute of Animal Biology UAAS  
38, Stus St., Lviv 79034, Ukraine  
e-mail: iskra\_r@ukr.net*

The activity of dehydrogenases of carbohydrate metabolism in blood and tissues of rats after addition to their diet of chromium citrate (10 µg Cr/kg of body weight) was investigated. It was established a reduction of glucose level in the blood of rats, increasing concentrations of glycogen in the liver and the growth of activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase and lactate dehydrogenase in the blood and tissues of rats of experimental group, compared with animals of the control group.

*Keywords:* rat, chromium citrate, glucose-6-phosphate dehydrogenase, lactate dehydrogenase.

### **АКТИВНОСТЬ ДЕГИДРОГЕНАЗ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА В ОРГАНИЗМЕ КРЫС ПРИ ДЕЙСТВИИ ХРОМ ЦИТРАТА**

**Р. Іскра**

*Институт биологии животных НААН  
ул. В.Стуса, 38, Львов 79034, Украина  
e-mail: iskra\_r@ukr.net*

Исследовали активность дегидрогеназ углеводного обмена в крови и тканях крыс при условии добавления к их рациону хром цитрата (10 мкг Cr/кг веса тела). Установлено снижение содержания глюкозы в крови крыс, повышение содержания гликогена в печени и повышение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и лактатдегидрогеназы в крови и тканях крыс опытной группы в сравнении с животными контрольной группы.

*Ключевые слова:* крыса, хром цитрат, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, лактатдегидрогеназа.



УДК 581.19:577.156

**ДЛЯ ВОДНОГО І ТЕПЛОВОГО СТРЕС-ФАКТОРІВ  
НА АКТИВНІСТЬ ІЗОЦИТРАТДЕГІДРОГЕНАЗИ (НАДФ<sup>+</sup>)  
ТА ВМІСТ  $\alpha$ -КЕТОКИСЛОТ У ПРОРОСТКАХ КУКУРУДЗИ**

**О. Рищакова<sup>1</sup>, О. Молодченкова<sup>2</sup>, С. Петров<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Селекційно-генетичний інститут – Національний центр  
насіннезнавства та сортовивчення НААН  
Овідіопольська дор., 3, Одеса 65036, Україна  
e-mail: olyaspring@rambler.ru*

<sup>2</sup>*Одеський національний університет імені І. І. Мечникова  
вул. Дворянська, 2, Одеса 65026, Україна*

Вивчено вплив водного дефіциту й теплового шоку на активність НАДФ<sup>+</sup> ізоцитратдегідрогенази (КФ.1.1.1.42) – ферменту, що каталізує реакцію окиснювального декарбоксілювання ізоцитрату в 2-оксоглутарат, а також вміст пірувату і 2-оксоглутарату в проростаючих зернівках контрастних за ознакою посухостійкості ліній кукурудзи (*Zea mays* L.). Показано, що активність ферменту і вміст кетокислот залежить від стійкості лінії та діючого чинника.

*Ключові слова:* *Zea mays* L, ізоцитратдегідрогеназа, піруват, 2-оксоглутарат, водний дефіцит, тепловий шок.

Різні сорти рослин, як правило, характеризуються неоднаковою чутливістю до несприятливих факторів середовища. Такі відмінності часто називають генетичною або сортовою специфічністю. З отриманих до теперішнього часу даних можна зробити висновок, що механізм, який забезпечує сортову специфічність рослин, інтегрує багато фізіологічних і біохімічних процесів, а це відбивається на метаболічних змінах рослин. Дослідження в цьому напрямку цікаві з точки зору виявлення біохімічних ознак високої посухостійкості, що відображають адаптивний метаболізм клітини і забезпечують можливість протистояти зневодненню. Зразки, що володіють такою властивістю, можуть бути використані як вихідний матеріал у селекції на посухостійкість.

Відомо, що стійкість до несприятливих факторів середовища забезпечується в більшості випадків зміною питомої активності або вмісту ферментів. Вивчення окремих шляхів метаболізму, які забезпечують перебудову обмінних процесів при зміні умов, дає можливість намітити підходи до виявлення природи посухостійкості рослин.

Згідно з літературними даними [4], в умовах осмотичного стресу відбувається інтенсифікація процесів дихання, що призводить до окиснення не тільки вуглеводів – головних субстратів процесу, але й фізіологічно важливих оксикислот, які, як відомо, також можуть слугувати субстратом для процесів дихання. Так, **піровиноградна та 2-оксоглутарова кислоти** (одні з основних кислот циклу трикарбонових кислот) беруть активну участь у процесах детоксикації рослини за допомогою системи кетокислоти↔дикарбонові амінокислоти. Автори розглядають надмірне накопичення цих кислот і їх знижений вміст як свідчення порушення циклу трикарбонових кислот, а також активації подальших окиснювальних процесів.

Останнім часом дедалі більше з'являється робіт, присвячених дослідженню різних дегідрогеназ – ферментів, безпосередньо пов'язаних із рівнем окиснювально-віднов-

ного потенціалу клітини. До числа таких ферментів належать і ізоцитратдегідрогеназа (КФ.1.1.1.42), фермент циклу трикарбонових кислот, що каталізує реакцію окиснювального декарбоксілювання ізоцитрат в  $\alpha$ -кетоглутарат. Також, згідно з літературними даними, ізоцитратдегідрогеназа виконує ключову роль у захисних механізмах клітини від окиснювального стресу, викликаного екстремальними умовами навколишнього середовища [8-10]. У даних роботах захисна функція ізоцитратдегідрогенази розглянута у виробництві НАДФН у мітохондріях, де і відбувається вироблення активних форм кисню при стресі. НАДФН – незамінний донор електронів численних біосинтетичних і детокс-реакцій, а також необхідний компонент антиоксидантних захисних механізмів клітини.

У зв'язку з цим метою даної роботи було порівняння активності НАДФ<sup>+</sup>-залежної ізоцитратдегідрогенази, а також визначення вмісту пірвіноградної і 2-оксоглутарової кислот у тканинах проростків ліній кукурудзи, контрастних за ознакою посухостійкості в умовах водного дефіциту і теплового шоку.

#### Матеріали та методи

Дослідження проводили на тридобових проростках ліній кукурудзи (*Zea mays* L.), контрастних за ознакою посухостійкості (стійка лінія – Од329зМ, нестійка – См7SL 3М). У дослідах використовували неушкоджені зернівки кукурудзи, які пророщували на фільтрувальному папері в термостаті при температурі 25°C при відносній вологості повітря (ввп) 60%. Водний дефіцит (вд) створювали, розміщуючи проростки в камері з відносною вологістю повітря 35–40%. Тепловий шок (тш) створювали шляхом розміщення проростків у термостаті при 37°C. Тривалість дії стресових факторів – 6 год. Рослини контрольного варіанта протягом досліду перебували в умовах оптимального зволоження при температурі 25°C. Після закінчення експозиції препаративні надземні частини проростків (нчп), ендосперм і корені заморозували при температурі –40°C.

Активність ізоцитратдегідрогенази (КФ.1.1.1.42) визначали спектрофотометрично при 340 нм за зростанням оптичної густини в результаті відновлення НАДФ<sup>+</sup> під час реакції перетворення ізоцитрат у 2-оксоглутарат [3]. Отримання рослинного екстракту: матеріал гомогенізували у ступці в середовищі виділення в співвідношенні 1:4. Як середовище виділення використовували 22 мМ калій-фосфатний буфер, рН 7,8, що містив 1,5 мМ ізоцитрат, 2 мМ MnCl<sub>2</sub>. Суміш центрифугували при 10 000 г протягом 10 хв. Надосадову рідину використовували для подальшого визначення активності ферменту. Реакцію проводили в середовищі: 0,1М трис-буфер, рН 7,8, що містив 1,5 мМ ізоцитрат, 2 мМ MnCl<sub>2</sub> і 1,5 мМ НАДФ<sup>+</sup>. За одиницю ферментативної активності приймали кількість ферменту, що утворює 1 нмоль продукту реакції за 1 хв при 25°C.

Вміст пірвіноградної та 2-оксоглутарової кислот визначали за стандартною методикою [2]. Метод заснований на тому, що кетокислоти утворюють із фенілгідразинном гідрозони, важкорозчинні у воді. Використовуючи окремі розчинники, такі як бензол чи н-бутанол, і вимірюючи оптичну густину при визначеній для гідрозону кожної кетокислоти довжині хвилі, можна визначити окрему кетокислоту.

Вміст білка визначали за методом Лоурі [11].

Статистичну обробку даних проводили з використанням критерію Стьюдента [5]. На рисунках наведені середні значення та їх похибки ( $M \pm m$ ).

#### Результати і їхнє обговорення

Результати дослідження впливу водного і теплового стрес-факторів на вміст пірвіноградної та 2-оксоглутарової кислот і активність ізоцитратдегідрогенази представлені на рис. 1–3.

Аналіз вмісту пірвіноградної та 2-оксоглутарової кислот (рис. 1, 2) показав слідові кількості цих метаболітів у ендоспермі, що, ймовірно, пов'язано з відсутністю або незначним рівнем їх метаболізму у зазначеній частині проростка. Це припущення підтверджується результатами визначення активності ізоцитратдегідрогенази, згідно з якими дана активність була виявлена лише в надземній частині проростка і коренях. Слід зазначити, що вміст пірвіноградної кислоти значно перевищує вміст 2-оксоглутарової кислоти. Це, ймовірно, пояснюється, по-перше, набагато більшою інтенсивністю гліколізу порівняно з кислотним метаболізмом рослини, в тому числі і циклом трикарбонових кислот, по-друге, тим, що 2-оксоглутарат менш активно залучений в обмінних процесах і перетвореннях.

Дія водного дефіциту і його співдія з тепловим шоком призвела до достовірного зниження вмісту пірвіноградної кислоти у тканинах нчп і коренів нестійкої лінії на 30–40%. При тепловому шоку достовірних відмінностей у тканинах нестійкої лінії не виявлено. У тканинах стійкої лінії достовірних відмінностей виявлено не було, за винятком підвищення вмісту пірватату у тканинах коренів при тепловому шоку на 75% щодо контролю.

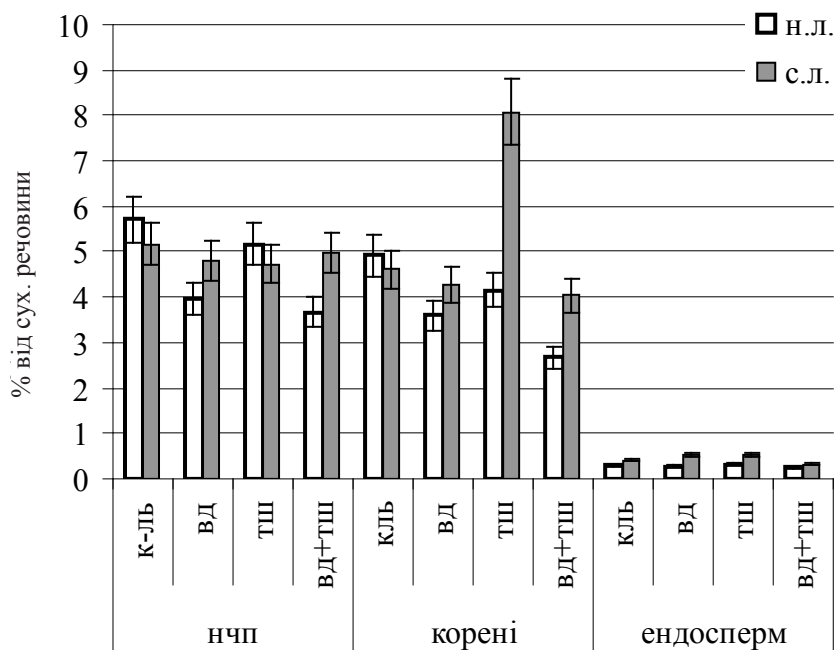


Рис. 1. Вміст пірвіноградної кислоти у 3-добових проростках ліній кукурудзи в умовах дії водного та теплового стрес-факторів упродовж 6 год: с.л. – стійка лінія Од329зМ, н.л. – нестійка лінія СМ7SLзМ, к-ль – контроль (t 25°C, ввп 60%), вд – водний дефіцит (t 25°C, ввп 35–40%), тш – тепловий шок (t 37°C, ввп 60%).

Зміст 2-оксоглутарової кислоти (рис. 2) у тканинах нестійкої лінії достовірно знижувався на 30–35% в умовах співдії водного дефіциту й теплового шоку. Дія зазначених стресорів окремо не призвела до достовірних відхилень вмісту 2-оксоглутарової кислоти. Щодо стійкої лінії була отримана схожа з результатами по визначенню вмісту пірвіноградної кислоти закономірність: до достовірного підвищення вмісту 2-оксоглутарової кислоти призвела дія теплового шоку в коренях. В інших варіантах дослідів достовірних відмінностей виявлено також не було.

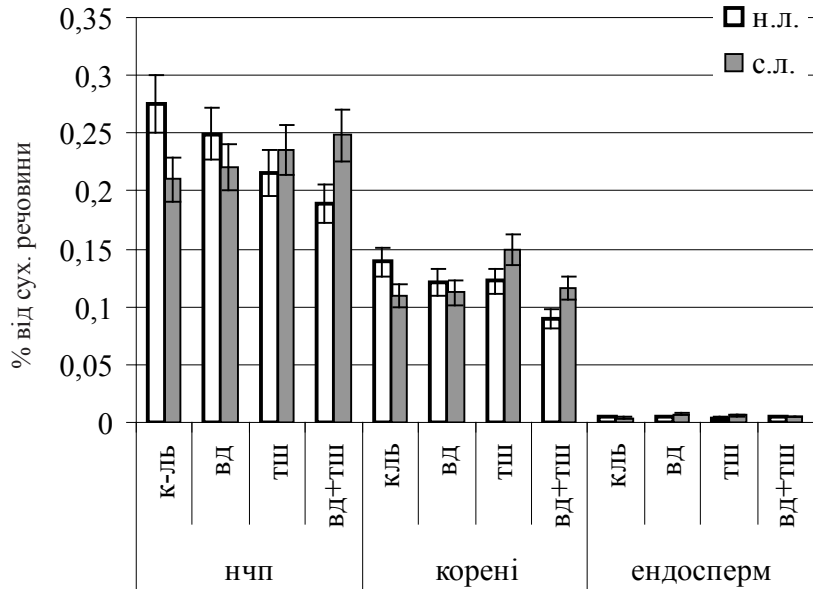


Рис. 2. Вміст 2-оксоглутарової кислоти в 3-добових проростках ліній кукурудзи в умовах дії водного і теплового стрес-факторів упродовж 6 год: с.л. – стійка лінія Од329зМ, н.л. – нестійка лінія См7SLзМ, к-ль – контроль (t 25°C, ввп 60%), вд – водний дефіцит (t 25°C, ввп 35–40%), тш – тепловий шок (t 37°C, ввп 60%).

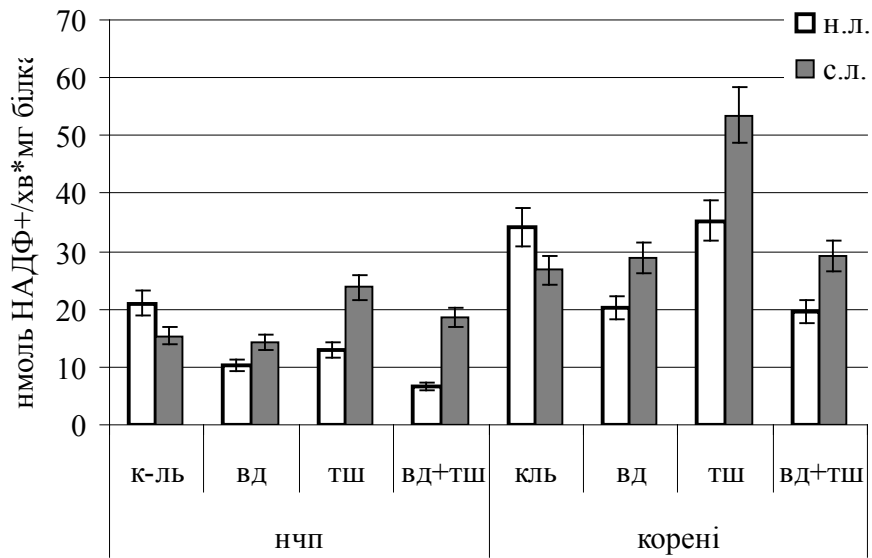


Рис. 3. Активність ізоцитратдегідрогенази в 3-добових проростках ліній кукурудзи в умовах дії водного та теплового стрес-факторів упродовж 6 год: с.л. – стійка лінія Од329зМ, н.л. – нестійка лінія См7SLзМ, к-ль – контроль (t 25°C, ввп 60%), вд – водний дефіцит (t 25°C, ввп 35–40%), тш – тепловий шок (t 37°C, ввп 60%).

Аналіз активності ізоцитратдегідрогенази показав, що дія водного дефіциту і спільна його дія з тепловим шоком призвела до достовірного зниження активності ферменту у тканинах надземної частини проростків (на 50 і 70% від контролю) і коренів (40 і 43% від контролю) нестійкої лінії. Так само було відзначено зниження активності при тепловому шоку в надземній частині проростків на 40%.

У тканинах стійкої лінії достовірні відмінності щодо контролю були виявлені лише в умовах теплового шоку, де активність ізоцитратдегідрогенази підвищувалася на 55% у надземній частині проростків і на 100% у коренях.

Показано, що у стійкої лінії визначені показники інтенсивності функціонування метаболізму трикарбонних кислот залишалися на контрольному рівні, що свідчить про відносну стабільність метаболізму стійкої до засухи лінії за дії водного дефіциту. Водночас у проростках нестійкої лінії відбувалося достовірне зниження показників функціонування циклу трикарбонних кислот. Отримані дані, ймовірно, свідчать про можливість тимчасової підтримки загального кислотного метаболізму рослин стійкої лінії, у тому числі й циклу трикарбонних кислот, в активному стані для збереження рівнів обмінних процесів в умовах дії стрес-фактора до можливої адаптації. Отже, встановлені особливості функціонування метаболізму трикарбонних кислот у проростках різних за посухостійкістю ліній кукурудзи можуть слугувати показником життєздатності й адаптації до несприятливих факторів середовища. Ці відмінності, мабуть, позначаються на рослинах і в період вегетації, обумовлюючи їх подальший ріст, розвиток і стійкість до посухи.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Даффус К., Даффус Дж.* Углеводный обмен растений / пер. с англ. и предисл. Э.Е. Хавкина. М.: Агропромиздат, 1987. С. 150.
2. *Ермаков А. И., Арасимович В. В., Ярош Н. П.* и др. Методы биохимического исследования растений / под ред. А.И. Ермакова. Л.: Агропромиздат, 1987. 430 с., ил. С. 54–57.
3. *Попова Т. Н., Землянухин Л. А., Епринцев А. Т.* и др. Регуляция активности и каталитические свойства гомогенной изоцитратдегидрогеназы из гороха // Биохимия. 1986. Т. 51. № 6. С. 952–957.
4. *Приходько Л. С.* Обмен окси- и кетокислот у проростков гороха и кукурузы в условиях засоления субстрата // Физиология растений. 1986. Т. 15. № 5. С. 806–812.
5. *Рокицкий П. Ф.* Биологическая статистика. Минск: Вышш. школа, 1967. 326 с.
6. *Cecilia A. M., David J. O.* NAD<sup>+</sup>-Linked Isocitrate Dehydrogenase: Isolation, Purification, and Characterization of the Protein from Pea Mitochondria // Plant Physiol. 1992. Vol. 100. P. 69–75.
7. *Francisco J. C., Juan B. B., Luisa M. S.* Peroxisomal NADP-Dependent Isocitrate Dehydrogenase. Characterization and Activity Regulation during Natural Senescence // Plant Physiol. 1999. Vol. 121. P. 921–928.
8. *Jo S. H., Son M. K., Koh H. J.* Control of mitochondrial redox balance and cellular defence against oxidative damage by mitochondrial NADP<sup>+</sup>-dependent isocitrate dehydrogenase // J. Biol. Chem. 2001. Vol. 276. P. 16168–16176.
9. *Kim H. J., Kang B. S., Park J. W.* Cellular defence against heat shock-induced oxidative damage by mitochondrial NADP<sup>+</sup>-dependent isocitrate dehydrogenase // Free Radic Res. 2005. Vol. 39. P. 441–448.
10. *Kim S. Y., Park J. W.* Cellular defence against singlet oxygen-induced oxidative damage by cytosolic NADP<sup>+</sup>-dependent isocitrate dehydrogenase // Free Radic Res. 2003. Vol. 37. P. 309–316.

11. Lowry O. H., Rosenbrough N. I., Fan A. Z., Randol R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. 1951. Vol. 193. P. 265–275.

Стаття: надійшла до редакції 11.07.12

доопрацьована 27.09.12

прийнята до друку 08.10.12

## ISOCITRATE DEHYDROGENASE(NADP<sup>+</sup>) ACTIVITY AND THE CONTENT OF $\alpha$ -KETO ACIDS IN GERMINATION SEEDS OF MAIZE IN THE CONDITIONS OF WATER AND HEAT STRESS-FACTORS

O. Rischakova<sup>1</sup>, O. Molodchencova<sup>2</sup>, S. Petrov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Plant Breeding and Genetics Institute – National Center of Seed and Cultivar Investigation, National Academy of Agricultural Sciences  
3, Ovidiopol'ska Road, Odessa 65036, Ukraine  
e-mail: olyaspring@rambler.ru

<sup>2</sup>I.I. Mechnikov Odessa National University  
2, Dvoryanska St., Odessa 65026, Ukraine

The influence of water deficit and heat shock on activity of NADP-dependent isocitrate dehydrogenase (EC 1.1.1.42) – enzyme that catalyzes the oxidative decarboxylation of isocitrate to 2-oxoglutarate, and the content and pyruvic and 2-oxoglutaric acids in seeds of maize lines (*Zea mays* L.) contrasting by the trait of drought-resistance has been studied. It was shown that enzyme activity, and the content of pyruvate and 2-oxoglutarate dependent on drought resistance lines and impacting factor.

*Keywords:* *Zea mays* L, isocitrate dehydrogenase, pyruvate, 2-oxoglutarate, water deficit, heat shock.

## ДЕЙСТВИЕ ВОДНОГО И ТЕПЛООВОГО СТРЕСС-ФАКТОРОВ НА АКТИВНОСТЬ ИЗОЦИТРАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ (НАДФ<sup>+</sup>) И СОДЕРЖАНИЕ $\alpha$ -КЕТОКИСЛОТ В ПРОРОСТКАХ КУКУРУЗЫ

О. Рыщакова<sup>1</sup>, О. Молодченкова<sup>2</sup>, С. Петров<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Селекционно-генетический институт – Национальный центр семеноведения и сортоизучения НААН  
Овидиопольская дор., 3, Одесса 65036, Украина  
e-mail: olyaspring@rambler.ru

<sup>2</sup>Одесский национальный университет имени И.И.Мечникова  
ул. Дворянская, 2, Одесса 65026, Украина

Изучено влияние водного дефицита и теплового шока на активность НАДФ<sup>+</sup> изоцитратдегидрогеназы (КФ.1.1.1.42) – фермента, катализирующего реакцию окислительного декарбоксилирования изоцитрата в 2-оксоглутарат, а также содержание пировиноградной и 2-оксоглутаровой кислот в прорастающих зерновках контрастных по признаку засухоустойчивости линий кукурузы (*Zea mays* L.). Показано, что активность фермента, а также содержание пирувата и 2-оксоглутарата зависит от устойчивости линии и воздействующего фактора.

*Ключевые слова:* *Zea mays* L., изоцитратдегидрогеназа, пируват, 2-оксоглутарат, водный дефицит, тепловой шок.

**РОЛЬ АНТИОКСИДАНТНИХ ФЕРМЕНТІВ У СТІЙКОСТІ ПРЕДСТАВНИКІВ  
РОДУ *ACER* L. В УМОВАХ АНТРОПОГЕННОГО ЗАБРУДНЕННЯ**

**Г. Россихіна-Галича**

*Науково-дослідний інститут  
Дніпропетровського національного університету  
імені Олеся Гончара, НДІ біології  
пр. Гагаріна, 72, Дніпропетровськ 49010, Україна  
e-mail: anna-rossihina@rambler.ru*

Проведено дослідження ролі антиоксидантних ферментів у формуванні стійкості представників роду *Acer* L. до умов техногенно забрудненого середовища м. Дніпропетровська. Встановлено, що за дії комплексу аерополітантів зміни функціонування системи антиоксидантного захисту відбуваються у досліджуваних видів неоднаковою мірою. Отримані результати показали, що у *A. negundo* L. та *A. pseudoplatanus* L. активність супероксиддисмутази, каталази і пероксидази зростає в 1,4–2,1 разу. Для *A. platanoides* L. характерне пригнічення ферментів-нейтралізаторів перексиду водню.

*Ключові слова:* *Acer platanoides* L., *Acer pseudoplatanus* L., аерополітанти, супероксиддисмутаза (СОД), каталаза, пероксидаза.

У зв'язку із загостренням екологічної ситуації м. Дніпропетровська, пов'язаним зі збільшенням викидів автотранспорту і підприємств у біосферу, важливого значення набуває вивчення комплексного впливу антропогенних чинників на рослинні організми і, особливо, на дерева, які, ростучи в умовах постійного екологічного стресу в урбофітоценозах є біологічним фільтром, який здатен поглинати аерозольні частинки й акумулювати токсичні сполуки (важкі метали, пил, сполуки азоту, сірки, аміаку) [3, 13, 23, 24, 26]. Встановлено, що у рослин фітоценозів придорожних смуг відбувається скорочення строків вегетації, зменшення площі асимілюючих органів, гальмування ростових процесів [2, 5, 10, 12, 15]; порушення діяльності багатьох ферментів, електрон-транспортних ланцюгів, зміни у функціонуванні антиоксидантів, посилене утворення активних форм кисню (АФК) [4, 6, 7, 9, 22, 28]. Зростання внутрішньоклітинної концентрації АФК за дії стресорів призводить до пошкодження молекул ліпідів, нуклеїнових кислот і білків [11, 30], а також фотосинтетичного апарату загалом [18]. Для підтримання клітинного гомеостазу активується антиоксидантна система захисту (супероксиддисмутаза, каталаза, пероксидаза та ін.) [9], компоненти якої інтенсивно досліджуються. Представники роду *Acer* L. є одними з найпоширеніших вуличних і автомагістральних насаджень м. Дніпропетровська, серед яких домінують *A. platanoides* L., *A. pseudoplatanus* L., *A. negundo* L. Слід зазначити, що, згідно з літературними даними, ці види різняться за стійкістю до антропогенних забруднювачів [2, 10].

У зв'язку з цим мета даної роботи – дослідження ролі компонентів антиоксидантної системи рослин кленів: супероксиддисмутази, каталази, пероксидази, в адаптивних реакціях даних рослин на різних етапах онтогенезу на дію аерогенних викидів автотранспорту м. Дніпропетровська.

**Матеріали та методи**

Об'єктами досліджень були листки клена гостролистого (*Acer platanoides* L.) (аборигенний вид), клена несправжньо-платанового (*Acer pseudoplatanus* L.) (інтродуцент) і клена

ясенелистого (*Acer negundo* L.) (інтродуцент), зібрані на моніторингових ділянках у ботанічному саду ДНУ (умовно чиста зона – контроль (I)) і в окремих точках автомагістралей головних проспектів м. Дніпропетровська: пр. Гагаріна (II), пр. Кірова (III). Для вивчення ролі антиоксидантних ферментів у стійкості дослідних об'єктів у процесі онтогенезу листки збирали в основні фази розвитку: активного, вторинного росту і початку фізіологічного спокою. Активність СОД визначали фотоелектроколориметрично за Переслегіною [16], каталази за кількістю розкладеного перекису водню титриметрично за Плешковим [17], пероксидази за швидкістю реакції окислення бензидину фотоелектроколориметрично за [14]. Статистичну обробку даних проводили за допомогою статистичного пакету Microsoft Excel 2000. Різницю між вибірками вважали достовірною при  $p \leq 0,05$ .

### Результати і їхнє обговорення

Одержані результати вказують, що активність супероксиддисмутази – одного з найважливіших ферментів антиоксидантного захисту в листках *A. platanoides*, що ростуть на проспектах Гагаріна та Кірова на початку онтогенезу (в травні) на 13–29% вища, порівняно з контролем (табл. 1). Згідно з літературними даними, це може бути пов'язано зі синтезом ферменту *de novo* або активацією його латентних форм [8, 32]. У рослинах *A. pseudoplatanus* і *A. negundo* в цей період активність ферменту була вищою на 131–149% та 91–100% відповідно порівняно з *A. platanoides*. Динаміка активності СОД при переході від фази активного росту до фази вторинного росту в районах з інтенсивним антропогенним навантаженням, як у чутливих рослин, так і у стійких, була спрямована в бік підвищення активності в 1,3 разу в листках клену гостролистого та в 1,4–1,5 разу в листках кленів несправжньо-платанового та ясенелистого. Перехід рослин до фази фізіологічного спокою супроводжувався зниженням активності ферменту. Однак, на відміну від інтродукованих рослин, аборигенний вид мав достатньо низькі значення СОД. Активність ферменту в рослин *A. platanoides* удвічі знижувалася порівняно з фазою вторинного росту (табл. 1).

Зниження активності СОД у кінці періоду вегетації, згідно з Е. Л. Кордюм зі співавторами, пояснюється тим, що здатність рослинної тканини знешкоджувати АФК з віком зменшується [9]. Відомо, що старіння – окисний процес, зумовлений посиленням утворенням активних форм кисню в клітинах і тканинах і зменшенням активності антиоксидантної системи [31]. Так, якщо в молодих листках ячменю активність СОД при фотоокисному стресі збільшується, то у старіючих листках вона знижується [29]. У наших дослідженнях відзначено більш суттєве зменшення активності СОД у період старіння в *A. platanoides* порівняно з *A. pseudoplatanus* та *A. negundo*, що може бути обумовлене суттєвим виснаженням пулу ферменту внаслідок посиленого використання його на гасіння радикалів супероксиду.

Відомо, що СОД не забезпечує повного захисту клітин від окисного стресу, оскільки за її дії утворюється перексид водню. Руйнування останнього здійснюється системою, яка включає пероксидазу та каталазу. Ці ферменти каталізують двоелектронне відновлення  $H_2O_2$  до води, використовуючи як донор електрона перексид водню у випадку каталази та різних відновників у випадку пероксидази [20].

Встановлено, що компоненти аеровикидів впливають на активність пероксидази. Для *A. platanoides* у фазу активного росту відзначено достовірне підвищення активності ферменту в II і III точках відбору проб порівняно з контролем в 1,5 разу (I). У *A. pseudoplatanus* і *A. negundo* значення активності пероксидази виявилися вищими за *A. platanoides* в 1,3 разу (табл. 2). При переході рослин *A. pseudoplatanus* і *A. negundo* до фази вторинного росту реєстрували підвищення активності пероксидази. Це може свідчити про участь ферменту в руйнуванні  $H_2O_2$ , утвореного за дії СОД [27]. Протилежну тенденцію спостеріга-



ли у рослин *A. platanoides*, активність ферменту в листках якого в цей період достовірно знижувалася в 1,5 та 1,4 разу відповідно (II та III точки). Аналогічні зміни активності пероксидази в листках кленів спостерігали у фазу фізіологічного спокою. Досліджуваний показник по мірі старіння листків продовжував суттєво знижуватися у *A. platanoides* в 1,7–1,6 разу щодо фази вторинного росту. Для *A. pseudoplatanus* і *A. negundo* ступінь цього зниження менш виражений, всього лише в 1,3 разу. Отримані нами результати узгоджуються з літературними, згідно з якими максимальна ферментативна активність пероксидази у конюшини та вівсяниці спостерігається у генеративному стані, а перехід до постгенеративного періоду розвитку приводить до зниження активності пероксидази [19].

Захисні функції від окисного ефекту пероксиду водню в клітині виконує не лише пероксидаза, але й інший антиоксидантний фермент – каталаза. Вона прискорює реакцію двох типів – каталазну та пероксидазну, цей фермент здатен використовувати за певних умов окрім пероксиду водню, органічні перекиси. При пероксидазному типі реакції знешкодження перекису супроводжується окисненням метаболітів і ксенобіотиків.

Таблиця 1

Активність супероксиддисмутази листків кленів з різних районів м. Дніпропетровська (відн.од./хв. г сирової речовини)

Назва виду	Фази онтогенезу		
	Активний ріст	Вторинний ріст	Фізіологічний спокій
	Ботанічний сад ДНУ (I точка відбору проб)		
<i>Acer platanoides</i> L.	23,6±0,3	28,9±0,4	39,2±0,9
<i>Acer pseudoplatanus</i> L.	45,6±1,3	49,6±1,2	56,1±1,2
<i>Acer negundo</i> L.	34,5±1,2	38,7±1,1	46,2±1,3
	Пр. Гагаріна (II точка відбору проб)		
<i>Acer platanoides</i> L.	26,7±0,5	34,7±0,6	16,5±0,8
<i>Acer pseudoplatanus</i> L.	66,4±1,4	92,3±1,5	76,3±1,3
<i>Acer negundo</i> L.	54,3±1,4	81,5±1,2	67,9±1,2
	Пр. Кірова (III точка відбору проб)		
<i>Acer platanoides</i> L.	30,5±0,4	38,6±0,3	20,2±0,8
<i>Acer pseudoplatanus</i> L.	70,6±1,3	96,6±1,4	80,1±1,2
<i>Acer negundo</i> L.	58,2±1,3	85,6±1,3	71,4±1,5

Таблиця 2

Активність пероксидази листків кленів різних районів м. Дніпропетровська (відн.од./хв. г сирової речовини)

Назва виду	Фази онтогенезу		
	Активний ріст	Вторинний ріст	Фізіологічний спокій
	Ботанічний сад ДНУ (I точка відбору проб)		
<i>Acer platanoides</i> L.	211,2±15,3	295,7±14,6	227,5±19,3
<i>Acer pseudoplatanus</i> L.	566,6±13,5	679,9±13,1	618,1±12,4
<i>Acer negundo</i> L.	531,2±14,3	642,8±11,4	584,4±13,1
	Пр. Гагаріна (II точка відбору проб)		
<i>Acer platanoides</i> L.	326,7±15,2	217,8±16,4	128,15±18,2
<i>Acer pseudoplatanus</i> L.	736,6±14,1	957,6±15,1	766,1±13,3
<i>Acer negundo</i> L.	690,6±14,5	966,8±12,4	773,4±12,4
	Пр. Кірова (III точка відбору проб)		
<i>Acer platanoides</i> L.	330,5±12,4	239,5±13,8	149,7±0,8
<i>Acer pseudoplatanus</i> L.	725,2±13,4	942,8±14,2	725,2±12,8
<i>Acer negundo</i> L.	685,2±16,5	959,3±13,4	767,4±15,4

Активність каталази листків рослин *A. platanoides* за хронічної дії аерозабруднювачів знижувалася в усіх фазах онтогенезу. У фазу активного росту даний фермент володів найбільшою активністю, а по мірі подальшого розвитку рослин активність послаблюва-

лась (табл. 3). Зниження активності каталази може бути спричинене як інактивацією ферменту певними токсикантами аеровикідів, так і пригніченням білкового синтезу внаслідок підвищеного генерування АФК [25].

Рослини *A. pseudoplatanus* та *A. negundo* порівняно з *A. platanoides*, як і у випадку з пероксидазою, мали більш високу активність каталази. У рослин ботанічного саду максимальна активність ферменту спостерігалась у фазі вторинного росту. Зниження даного показника відбувалося при переході рослин до фази фізіологічного спокою (старіння), що пов'язано з виснаженням каталази і, як наслідок, зниженням здатності рослинних клітин знешкоджувати пероксид водню.

На забруднених ділянках міста активність каталази листків стійких видів збільшувалась порівняно з контрольними рослинами в фазу активного росту в 1,3–1,5 разу. Перехід дерев до вторинного росту супроводжувався наростанням ферментативної активності в 1,6–1,7 рази для кленів, що ростуть на пр. Гагаріна та в 1,7–1,8 разу для рослин з пр. Кірова. В умовах окисного стресу цей факт забезпечує запобігання процесам пероксидного окислення. У період фізіологічного спокою рівень каталазної активності мав тенденцію до зниження щодо фази вторинного росту в 1,2–1,3 разу. Згідно з даними М. С. Радюк і співавторів за дії стресового впливу у більш стійких видів (просо, картопля) відбувається збільшення активності каталази, тоді як у чутливих видів (огірок, кукурудза) активність цього ферменту знижувалась або залишалась незмінною [21].

Таблиця 3

Активність каталази листків кленів різних районів  
м. Дніпропетровська (ммоль Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub>/хв. г сирової речовини)

Назва виду	Фази онтогенезу		
	Активний ріст	Вторинний ріст	Фізіологічний спокій
	Ботанічний сад ДНУ (I точка відбору проб)		
<i>Acer platanoides</i> L.	2,6±0,02	1,7±0,04	1,2±0,02
<i>Acer pseudoplatanus</i> L.	4,2±0,02	6,5±0,04	3,2±0,02
<i>Acer negundo</i> L.	6,6±0,01	9,6±0,01	5,1±0,03
	Пр. Гагаріна (II точка відбору проб)		
<i>Acer platanoides</i> L.	1,6±0,05	1,3±0,04	0,9±0,02
<i>Acer pseudoplatanus</i> L.	5,5±0,04	8,8±0,01	7,3±0,04
<i>Acer negundo</i> L.	9,2±0,04	15,2±0,02	12,7±0,02
	Пр. Кірова (III точка відбору проб)		
<i>Acer platanoides</i> L.	1,5±0,04	1,2±0,08	0,8±0,03
<i>Acer pseudoplatanus</i> L.	5,9±0,03	10,0±0,02	7,7±0,02
<i>Acer negundo</i> L.	9,9±0,02	17,82±0,01	13,7±0,01

Відомо, що більшість рослин володіє зниженою активністю каталази на забруднених ділянках зростання, і чим вища стійкість виду до забруднюючих речовин, тим вища стабільність дії цього ферменту, і, навпаки, більший ступінь інгібування його активності може бути діагностичною ознакою чутливості рослин до антропогенних навантажень [19]. Отже, наші дані підтверджують літературні, згідно з якими *Acer platanoides* L. є чутливим до антропогенного забруднення видом.

Таким чином, проведені дослідження показали, що досліджувані види кленів на всіх етапах онтогенезу мають гнучкий метаболізм, активність ферментів антиоксидантної системи захисту індивідуальна і залежить від виду рослини. Зіставлення отриманих нами результатів з існуючими літературними даними [2] про стійкість кленів до аерополютантів за морфологічними показниками дає можливість стверджувати, що *A. pseudoplatanus* L. і *A. negundo* L. характеризуються високою толерантністю до антропогенних умов існування порівняно з *A. platanoides*. Свідченням цього є високі показники активності фермен-

тів антиоксидантної системи. Відомим фактом також є те, що стійкі рослинні організми мають більш високі рівні або активності ферментів-антиоксидантів, тобто ефективнішу систему захисту [1]. Вживання стійких видів *A. pseudoplatanus* і *A. negundo* відбувається за рахунок посилення активності СОД, каталази та пероксидази. Зареєстроване збільшення активності каталази та пероксидази відображає природну відповідь цих рослин на надлишок АФК в умовах атмосферного забруднення. В умовах антропогенного забруднення у чутливого *A. platanoides* зміни в функціонуванні метаболічних процесів проявляються в незначному стимулюванні СОД і пригніченні ферментів пероксидази та каталази. Можливо, у цього виду кленів у регуляторні та захисні механізми залучені низькомолекулярні антиоксиданти і ферменти глутатіонового циклу.

Для отримання більш повної інформації про фізіолого-біохімічну реакцію деревних рослин на дію аерополутантів плануємо провести дослідження активності неферментативних (глутатіон, аскорбінова кислота та ін.) компонентів антиоксидантної системи захисту.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Бараненко В. В. Активність супероксиддисмутази в рослинах гороху за кліностагування // Наук. записки Терноп. пед. ун-ту. Сер. біол. 2002. № 1 (16). С. 38–42.
2. Бессонова В. П. Влияние тяжелых металлов на фотосинтез растений: монография. Д.: ДГАУ, 2006. 208 с.
3. Бухарина И. Л., Поварнищина Т. М., Ведерников К. Е. Эколого-биологические особенности древесных растений в урбанизированной среде: монография. Ижевск: ФГОУ ВПО Ижевская ГСХА, 2007. 216 с.
4. Гирс Г. И. Физиология ослабленного дерева. Новосибирск: Наука, 1989. 256 с.
5. Грицай З. В. Вплив промислового забруднення на анатомічні показники однорічного пагона деревних інтродуцентів // Інтродукція та захист рослин у ботанічних садах та дендропарках: мат-ли міжнар. наук. конф. Донецьк, 2006. С. 197–201.
6. Долгова Л. Г., Чернодуб Л. В. Вплив промислового забруднення на систему аскорбінова кислота - глутатіон в листках деревних рослин // Питання біоіндикації та екології. 2002. Т. 7. № 1. С. 32–39.
7. Духовский П., Юкнис Р., Бразайтите А., Жукаускайте И. Реакция растений на комплексное воздействие природных и антропогенных стрессов // Физиология растений. 2003. Т. 50. № 2. С. 165–170.
8. Калашиников Ю. Е., Закржевский Д. А., Балахнина Т. И. и др. Действие почвенной засухи и переувлажнения на активацию кислорода и систему защиты от окислительной деструкции в корнях и листьях ячменя // Физиология растений. 1992. Т. 39. № 2. С. 259–263.
9. Кордюм Е. Л., Сытник К. М., Бараненко В. В. и др. Клеточные механизмы адаптации растений к неблагоприятным воздействиям экологических факторов в естественных условиях. К.: Наук. думка, 2003. 270 с.
10. Коршиков И. И., Котов В. С., Михеенко И. П. и др. Взаимодействие растений с техногенно-загрязненной средой. К.: Наук. думка, 1995. 190 с.
11. Кулинский В. И. Активированные формы кислорода и оксидативная модификация макромолекул: польза, вред, защита // Сорос. образов. журн. 1999. № 1. С. 2–7.
12. Майдебура И. С. Влияние загрязнения воздушного бассейна города Калининграда на анатомо-морфологические и биохимические показатели древесных растений: автореф. дис. .... канд. биол. наук. Калининград, 2006. 23 с.

13. *Майснер А. Д.* Жизнь растений в неблагоприятных условиях. Минск: Вышэйшая школа, 1981. 98 с.
14. Методы биохимического исследования растений / под ред. А.И. Ермакова, 3-е изд. Л.: Агропромиздат, 1987. 430 с.
15. *Николаевский В. С.* Эколого-физиологические основы газоустойчивости растений. М.: Наука, 1998. 64 с.
16. *Перслегина И. А.* Активность антиоксидантных ферментов слюны здоровых детей // Лабораторное дело. 1989. № 11. С. 20–23.
17. *Плешков Б. П.* Практикум по биохимии растений. М.: Колос, 1968. 183 с.
18. *Полесская О. Г.* Растительная клетка и активные формы кислорода. М.: Наука, 2007. С. 11–19, 55–69.
19. *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.
20. *Прайор У.* Свободные радикалы в биологии. М.: Мир. Т. 2, 1979. 240 с.
21. *Радюк М. С., Доманская И. Н., Щербаков Р. А.* и др. Влияние низкой положительной температуры на содержание низкомолекулярных антиоксидантов и активность антиоксидантных ферментов в зеленых листьях ячменя // Физиология растений. 2009. Т. 56. № 2. С. 193–199.
22. *Сарбаева Е. В., Воскресенская О. Л.* Некоторые аспекты устойчивости туи западной в городских экосистемах [электронный ресурс] // <http://new.marsu.ru/GeneralInformation/structur/HelpUnits/libr/resours/thuja/index.html>, 2008.
23. *Сергейчик С. А.* Древесные растения и оптимизация промышленной среды. Минск: Наука и техника, 1984. 168 с.
24. *Сергейчик С. А.* Устойчивость древесных растений в техногенной среде. Минск: Наука и техника, 1994. 279 с.
25. *Ситар О. В.* Регулювання адаптивних реакцій проростків сої сіркою за умов свинцевого забруднення // Физиология и биохимия культ. растений. 2010. Т. 42. № 5. С. 443–449.
26. *Хромих Н.* Стан глутатіон-залежної системи насіння *Aesculus hippocastanum* L. за умов антропогенного забруднення // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2012. Вип. 58. С. 265–270.
27. *Ху Ю. Ф., Лю Ж. П.* Ферменты антиоксидантной защиты и физиологические характеристики двух сортов топинамбура при солевом стрессе // Физиология растений. 2008. Т. 55. № 6. С. 863–868.
28. *Шевякова Н. И., Стеценко Л. А., Мецзяков А. Б.* и др. Изменение активности пероксидазной системы в процессе стресс-индуцированного формирования САМ // Физиология растений. 2002. Т. 49. № 5. С. 670–677.
29. *Casano L. M., Martin M., Sabater B.* Sensitivity to superoxide dismutase transcript levels and activities to oxidative stress is lower in mature-senescent than in young barley leaves // Plant Physiol. 1994. Vol. 106. P. 1033–1039.
30. *Gille G., Singer K.* Oxidative stress in living cells // Folia Microbiol. 1995. Vol. 2. P. 131–152.
31. *Pastori G. M., Rio L.A. del.* Natural renaissance of pea leaves. An activated oxygen-mediated function for peroxisomes // Plant Physiol. 1997. Vol. 113. P. 411–418.
32. *Sacamoto A., Okumura T., Kaminaka H.* et al. Structure and differential response to abscisic acid of two promoters for cytosolic copper/zinc-superoxid dismutase genes, SOD Cc 1 and SOD Cc 2, in rice protoplasts // Febs Lett. 1995. Vol. 258. P. 62–66.

Стаття: надійшла до редакції 31.08.12

доопрацьована 09.10.12

прийнята до друку 10.10.12

## THE ROLE OF ANTIOXIDANT ENZYMES IN THE STABILITY OF ACER L. GENUS PLANTS UNDER ANTHROPOGENIC CONTAMINATION

G. Rossihina-Galicha

*Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Scientifically Investigation  
Institute of Biology  
72, Gagarin Ave., Dnipropetrovsk 49010, Ukraine  
e-mail: anna-rossihina@rambler.ru*

The investigation of the antioxidant enzymes role in the stability of *Acer* L. plants in ontogenesis to the conditions of anthropogenic polluted Dnipropetrovsk environment was carried out. It is established, that the functionings of antioxygenic protection system run differently in the observed soecies under the influence of aeropollutants complex. The obtained results show, that the superoxide dismutase, catalase and peroxidase activity is reliably increased in 1,4–2,1 times in *A. negundo* L. and *A. pseudoplatanus* L. The inhibition of hydrogen peroxide enzymes-scavenging is typical for *A. platanoides* L.

*Keywords: Acer platanoides* L., *Acer pseudoplatanus* L., *A. negundo* L., aeropollutants, superoxide dismutase (SOD), catalase, peroxidase.

## РОЛЬ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ В УСТОЙЧИВОСТИ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА ACER L. В УСЛОВИЯХ АНТРОПОГЕННОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ

Г. Россихина-Галычая

*Научно-исследовательский институт Днепропетровского национального  
университета  
имени Олеса Гончара, НИИ биологии  
пр. Гагарина, 72, Днепропетровск 49010, Украина  
e-mail: anna-rossihina@rambler.ru*

Проведено исследование роли антиоксидантных ферментов в формировании устойчивости представителей рода *Acer* L. к условиям техногенно загрязненной среды г. Днепропетровска. Установлено, что при действии комплекса аэрополлютантов изменения функционирования системы антиокислительной защиты происходят в неодинаковой степени у исследуемых видов. Полученные результаты показали, что у *A. negundo* L. и *A. pseudoplatanus* L. активность супероксиддисмутазы, каталазы и пероксидазы увеличивалась в 1,4–2,1 раза. Для *A. platanoides* L. характерно угнетение ферментов-нейтрализаторов пероксида водорода.

*Ключевые слова: Acer platanoides* L., *Acer pseudoplatanus* L., *A. negundo* L., аэрополлютанты, супероксиддисмутаза (СОД), каталаза, пероксидаза.

**ЗМІНИ ВМІСТУ НИЗЬКОМОЛЕКУЛЯРНИХ АНТИОКСИДАНТІВ У ЛИСТКАХ  
*AESCVLUS HIPPOCASTANUM L.* ЗА УМОВ МІСТА ДНІПРОПЕТРОВСЬКА**

**Г. Россихіна-Галича, Ю. Лихолат**

*Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара, НДІ  
біології*

*пр. Гагаріна, 72, Дніпропетровськ, 49010, Україна  
e-mail: anna-rossihina@rambler.ru*

Досліджено морфологічний стан каштана кінського звичайного (*Aesculus hippocastanum L.*) в антропогенних умовах міста. Автотранспортне навантаження основних магістралей м. Дніпропетровська викликає зменшення асиміляційної поверхні гіркого каштана, що обумовлено зменшенням площі листків на 30–39% та їх кількості на річному пагоні – на 43–61%. Для збереження нормальних реакцій у клітинах за цих умов існування рослини витрачають велику кількість аскорбінової кислоти і відновленої форми глутатіону, що може свідчити про адаптивні зміни каштанів до умов існування.

*Ключові слова:* *Aesculus hippocastanum L.*, аерополютанти, аскорбінова кислота, глутатіон, площа листків, антиоксиданти.

Основною екологічною проблемою Степового Придніпров'я сьогодні є забруднення середовища аерогенними викидами автотранспорту. Важливим біологічним фільтром, здатним поглинати аерозольні частинки, пил і акумулювати частину токсичних сполук з оточуючого середовища, є зелені рослини [13]. За впливу полютантів у клітинах живих організмів посилюється утворення метаболічно-активних вільних радикалів, що викликають порушення метаболізму і розвиток окисного стресу. Зростання внутрішньоклітинної концентрації активних форм кисню (АФК) веде до пошкодження компонентів клітин і їх передчасного старіння, ушкодження молекул ліпідів, нуклеїнових кислот і білків [12].

У відповідь на збільшення АФК активуються антиоксидантні ферментативні та неферментативні компоненти системи захисту [12]. Дослідження дії стресових чинників оточуючого середовища на процеси метаболізму в рослинному організмі, його ферментних, низькомолекулярних і пігментних системах дає змогу показати їх роль у формуванні стійкості рослин до екзогенного стресу [1, 2, 7, 8 та ін.]. При цьому великий інтерес викликають низькомолекулярні антиоксиданти – аскорбінова кислота і глутатіон, які беруть безпосередню участь у забезпеченні стійкості рослин до пошкоджувальних факторів.

На цей час існує значна кількість досліджень із проблем адаптації рослин до різних видів стресорів, які висвітлюють структурні та метаболічні зміни, що відбуваються на різних рівнях фізіологічних процесів у рослинних організмах [6, 9–11], але з'ясування їх механізмів у деревних порід потребує подальшого поглибленого вивчення. Саме деревні рослини формують зелений покрив промислових міст і саме їм належить значна частка у складі урбоекосистем. Однією з головних складових деревних насаджень у містах і селищах є каштан кінський (*Aesculus hippocastanum L.*). Поліпшуючи мікроклімат, ці дерева уловлюють дим, кіптяву, різноманітні шкідливі гази, знижують швидкість вітру, міські шуми, послаблюють зимовий холод і літню спеку, тобто зменшують шкідливий вплив антропогенного навантаження міста. У зв'язку з вищевикладеним мета роботи –

на основі аналізу змін низки морфофізіологічних показників каштана кінського (*Aesculus hippocastanum* L.) охарактеризувати метаболічні адаптаційні перебудови за антропогенних умов м. Дніпропетровська.

#### Матеріали та методи

Як тест об'єкта було обрано каштан кінський звичайний (*Aesculus hippocastanum* L.). Відбір листків здійснювали в 2011 р. у фази активного, вторинного росту та настання фази спокою на основних автомагістралях м. Дніпропетровська. Реакцію рослин на дію аерополітантів оцінювали за змінами показників асиміляційного апарату (кількість листків, їх площа) та вмісту низькомолекулярних компонентів (аскорбінової кислоти і глутатіону відновленого) [14]. Математичну обробку отриманих даних проводили за допомогою статистичного пакету Microsoft Excel 2000. Розбіжності між вибірками вважали достовірними при  $p < 0,05$ .

#### Результати і їхнє обговорення

Роль асиміляційної поверхні у процесі росту і життєдіяльності рослини загальновідома. Приріст органічної маси рослин значною мірою визначається динамікою росту фотосинтетичного апарату – площі листків, а також тривалістю активної роботи асимілюючої поверхні. Численні експериментальні дослідження екологічного та агрофізіологічного планів показують, що визначну роль у формуванні продуктивності рослин відіграє не стільки активність фотосинтетичного апарату, окремих хлоропластів або одиниці площі листка, скільки загальна площа асиміляційної поверхні рослини чи рослинного ценозу як популяції рослин [3]. Листок відігравав головну роль в адаптації рослин у процесі еволюції [17] і продовжує залишатися ведучим органом пристосування до умов середовища, в тому числі техногенних [5, 15, 16].

Техногенні умови існування викликали значне зменшення асиміляційної поверхні гіркогокаштанів. Кількість листків на річних пагонах дерев, які росли на пр. Кірова в умовах забруднення середовища вихлопами автотранспорту зменшувалася порівняно з контрольними рослинами на 30%, а на пр. К. Маркса та пр. Гагаріна відповідно – на 37 і 39% (табл. 1). При цьому розміри листових пластинок знижені щодо контролю до 43–58%.

Отримані нами дані узгоджуються з літературними. В.П. Бессоною встановлено, що на кожен саме з цих показників забруднення середовища аерополітантами справляє негативний вплив. Зниження асиміляційної поверхні модельної гілки деревних рослин обумовлено саме зниженням площі листків і їх кількості [3].

Таблиця 1

Кількість листків і їхня площа на річному пагоні гіркогокаштанів з різних районів м. Дніпропетровська

Район досліджень	Кількість листків на річному пагоні, шт		Площа листків, см <sup>2</sup>	
	$\bar{X} \pm m$	$p < 0,05$	$\bar{X} \pm m$	$p < 0,05$
с. Першотравенка	10,90±0,40	–	687,20±6,60	0,0002
проспект Кірова	7,77±0,37	0,0002	392,50±7,17	0,0001
проспект К. Маркса	6,90±0,48	0,0001	266,90±5,48	0,0001
проспект Гагаріна	6,62±0,32	0,0001	290,45±5,32	0,0002

Виходячи з отриманих даних, можна припустити, що дерева каштана кінського на досліджуваних моніторингових ділянках піддавалися суттєвому антропогенному впливу. Підтримка організму в стресових умовах відбувається, зокрема, за рахунок низькомолекулярних антиоксидантів.

Експериментально показано (рис. 1), що в фази активного росту в листках гіркогокаштанів, які росли в с. Першотравенка, концентрація аскорбінової кислоти

становила 44,9 мкг/г маси сирової речовини. У фотосинтезуючій тканині дерев із проспектів міста в цей період виявлено активне накопичення аскорбату щодо рослини з чистої зони на 30–35%. Оскільки аскорбінова кислота є інгібітором вільного радикального окислення, то відзначена у фазу вторинного (прихованого) росту тенденція зниження концентрації цього антиоксиданта на 22–29%, ймовірно, свідчить про підвищену витрату аскорбату рослинами на інактивацію надлишкової кількості вільних радикалів. Для періоду настання фізіологічного спокою характерні аналогічні зміни. Порівняння вмісту аскорбінової кислоти в листках гіркого каштанів із різних районів м. Дніпропетровська показало, що рослини зазнавали стресу одного рівня. Відзначене поступове зниження вмісту аскорбінової кислоти в листках каштанів протягом вегетації (липень-серпень) згідно з [4] пов'язане зі зниженням активності окисно-відновних процесів.

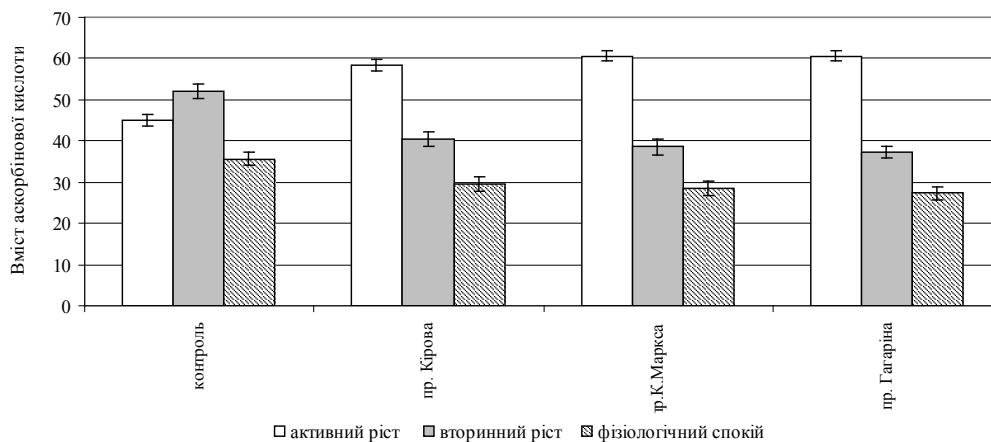


Рис. 1. Вміст аскорбінової кислоти у листках гіркого каштанів за умов дії аерополутантів, мкг/г маси сирової речовини.

Установлено, що в метаболічних процесах і реакціях, пов'язаних із захистом та стійкістю клітин до дії полутантів бере участь також глутатіон і продукти його окислення. Вміст трипептиду в листках гіркого каштанів, які ростуть на головних проспектах промислового м. Дніпропетровська та екологічно чистій території, представлені на рис. 2. Найбільший вміст глутатіону (40–50%) характерний для листків у першій половині вегетації (у травні). Виявлене зниження даного показника на етапі вторинного росту на 35–45% відбувалося включно до фази фізіологічного спокою – на 45–60%. Зареєстрований факт вказує на пристосувальну витрату глутатіону рослинами з метою збереження нормальних реакцій у клітинах і свідчить про адаптивні перебудови в метаболізмі каштана кінського до умов автотранспортного навантаження м. Дніпропетровська.

Проведені дослідження показали, що в умовах хронічної дії викидів автотранспорту протягом вегетації відбуваються певні зміни у функціонуванні метаболічних процесів організму каштана кінського, які можна характеризувати як стрес-індуковані. Універсальною реакцією досліджуваних дерев є пригнічення морфометричних параметрів і посилення витрати глутатіону й аскорбінової кислоти.

Кількість листків на річному пагоні та площа листків каштана кінського, які зазнають впливу аерогенних викидів, знижується до 30–39% та 43–58% щодо контролю.

Упродовж вегетаційного сезону за хронічного аеротехногенного забруднення середовища в асиміляційних органах каштанів відбувалося захисне зниження вмісту аскорбінової кислоти і відновленого глутатіону.



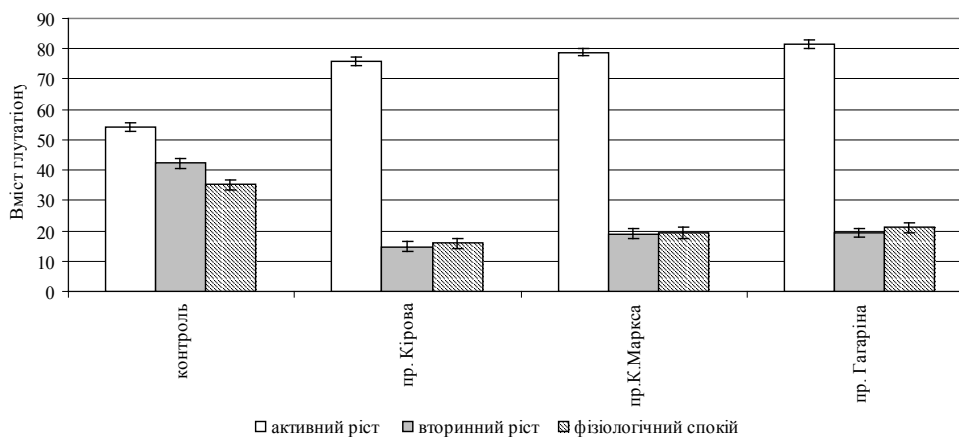


Рис. 2. Вміст глутатіону в фотосинтезуючих органах рослин гіркокаштана з різних районів м. Дніпропетровська, мг/100 г маси сирової речовини.

Для експрес-аналізу стану окремих дерев і насаджень можна використовувати показники площі, кількості листків і вмісту низькомолекулярних неферментативних антиоксидантів (глутатіон, аскорбінова кислота).

У подальшому нами буде досліджено динаміку активності ферментів-детоксикаторів АФК каштана кінського упродовж різних фаз вегетації.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Антонова Г. Ф., Стасова В. В., Вараксина Т. Н. Аскорбиновая кислота и развитие клеток ксилемы и флоэмы в стволе сосны сибирской // Физиология растений. 2009. Т. 56. № 2. С. 210–219.
2. Бацманова Л. М., Грудіна Н. С., Стороженко В. О. та ін. Адаптивні реакції рослин озимої пшениці різних екотипів за дії перексиду водню // Физиология и биохимия культ. растений. 2010. Т. 42. № 2. С. 163–168.
3. Бессонова В. П. Влияние тяжелых металлов на фотосинтез растений. Д.: ДГАУ, 2006. 208 с.
4. Бухарина И. Л., Поварнищина Т. М., Ведерников К. Е. Эколого-биологические особенности древесных растений в урбанизированной среде. Ижевск: ФГОУ ВПО Ижевская ГСХА, 2007. 216 с.
5. Гетко Н. В. Растения в техногенной среде. Минск: Наука и техника, 1989. 209 с.
6. Грицай З. В. Вплив промислового забруднення на анатомічні показники однорічного пагона деревних інтродуцентів // Інтродукція та захист рослин у ботанічних садах та дендропарках: Матеріали міжнар. наук. конф. Донецьк, 2006. С. 197–201.
7. Гришко В. М., Демура Т. А. Вплив регуляторів росту на стійкість проростків кукурудзи, розвиток процесів пероксидного окислення ліпідів і вміст аскорбінової кислоти за сумісної дії кадмію і нікелю // Физиология и биохимия культ. растений. 2009. Т. 41. № 4. С. 335–343.
8. Демура Т. А., Гришко В. Н. Зміни про-/антиоксидантної рівноваги у проростків кукурудзи за різного рівня накопичення кадмію та нікелю // Вісн. Харків. нац. аграрного ун-ту. 2008. Вип. 1 (13). С. 22–29.

9. Джура Н., Цвілинюк О., Терек О. Реакція осоки шершавої на нафтове забруднення // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2006. Вип. 42. С. 142–146.
10. Долгова Л. Г., Самойлова М. В. Вміст глутатіону відновленого як показник стійкості рослин-інтродуцентів роду *Rosaceae* // Вісн. Дніпропетр. ун-ту. Сер. біол. екол. 2009. Т. 2. Вип. 17. С. 41–45.
11. Долгова Л. Г., Чернодуб Л. В. Вплив промислового забруднення на систему аскорбінової кислоти – глутатіон у листках деревних рослин // Питання біоіндикації та екології. 2002. Т. 7. №. 1. С. 32–39.
12. Кулинский В. И. Активированные формы кислорода и окислительная модификация макромолекул: польза, вред, защита // Соросов. образов. журн. 1999. № 1. С. 2–7.
13. Майдебуря И. С. Влияние загрязнения воздушного бассейна города Калининграда на анатомо-морфологические и биохимические показатели древесных растений: автореф. дис. .... канд. биол. наук. Калининград, 2006. 23 с.
14. Плешков Б. П. Практикум по биохимии растений. М.: Колос, 1968. 183 с.
15. Сергейчик С. А. Растения и экология. Минск: Ураджай, 1997. 224 с.
16. Сергейчик С. А. Устойчивость древесных растений в техногенной среде. Минск: Наука и техника, 1994. 279 с.
17. Сытник К. М., Мусатенко Л. И., Богданова Т. Л. Физиология листа. К.: Наукова думка, 1978. 392 с.

Стаття: надійшла до редакції 22.06.12

прийнята до друку 07.09.12

## CHANGES OF LOW-MOLECULAR ANTIOXIDANTS LEVEL IN LEAVES OF *AESCULUS HIPPOCASTANUM* L. IN DNIEROPETROVSK' CONDITIONS

A. Rossikhina-Galycha, Yu. Lykholat

Oles Honchar Dnipropetrovsk National University,  
Scientific Investigation Institute of Biology  
72, Gagarin Ave., Dnipropetrovsk 49010, Ukraine  
e-mail: anna-rossikhina@rambler.ru

Morphological-physiological state of the ordinary horse chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.) in anthropogenic conditions of the city was investigated. Motor transport loading of Dnipropetrovsk' basic highways is caused by diminishing of assimilatory surface of the chestnut, that is contingent by decreasing of leaf area on 30–39% and its amounts on annual escape on 43–61%. At these conditions for the maintenance of normal reactions in the cells the plant outlay plenty of ascorbic acid and picked up thread form of glutathione that can testify to adaptive changes of chestnuts to the conditions of existence.

*Keywords:* *Aesculus hippocastanum* L., pollutants, ascorbic acid, glutathione, leaf area, antioxidants.

**ИЗМЕНЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ АНТИОКСИДАНТОВ  
В ЛИСТЬЯХ *AESCULUS HIPPOCASTANUM* L. В УСЛОВИЯХ ГОРОДА  
ДНЕПРОПЕТРОВСКА****А. Россихина-Галыча, Ю. Лихолат**

*Днепропетровский национальный университет имени Олеся Гончара,  
НИИ биологии  
пр. Гагарина, 72, Днепропетровск 49010, Украина  
e-mail: anna-rossihina@rambler.ru*

Исследовано морфофизиологическое состояние каштана конского обыкновенного (*Aesculus hippocastanum* L.) в антропогенных условиях города. Автотранспортная нагрузка основных магистралей г. Днепропетровска вызывает уменьшение ассимиляционной поверхности каштана конского, что обусловлено уменьшением площади листьев на 30–39% и их количества на годовом побеге – на 43–61%. Для сохранения нормальных реакций в клетках при этих условиях существования растения теряют большое количество аскорбиновой кислоты и восстановленной формы глутатиона, что может свидетельствовать об адаптивных изменениях каштана к условиям существования.

*Ключевые слова:* *Aesculus hippocastanum* L., аэрополлютанты, аскорбиновая кислота, глутатион, площадь листьев, антиоксиданты.

## ЗМІНА ХАРАКТЕРИСТИК ЛЕКТИНОПОДІБНИХ БІЛКІВ ЛЬОНУ ОЛІЙНОГО В ОНТОГЕНЕЗІ

Г. Левчук, О. Войтович, В. Лях

Запорізький національний університет  
вул. Жуковського, 66, Запоріжжя 69063, Україна  
e-mail: genetika@znu.edu.ua

Досліджена динаміка кількісних і якісних характеристик лектиноподібних білків вегетативних органів льону олійного різних генотипів упродовж вегетації. Встановлено, що обидва показники залежать як від стадії розвитку, так і від органної належності, однак зв'язок з першим фактором є значно сильнішим. Спостерігається також залежність рівня лектинової активності від органної належності: на початкових етапах найактивнішими є білки коренів, а починаючи зі стадії бутонізації – білки листків.

*Ключові слова:* *Linum humile* L., лектини, органна належність, лектинова активність, вуглеводнева специфічність.

Лектинами називають білки або глікопротеїни, які здатні розпізнавати і зворотно зв'язувати вуглеводи, розташовані на клітинних поверхнях. У зв'язку з цим вони є універсальними молекулами та містяться у всіх організмах, де беруть безпосередню участь у процесах внутрі- та міжклітинного розпізнавання. Так, за дії різноманітних чинників вуглеводи клітинних поверхонь постійно змінюються, і на цю зміну миттєво реагують лектини, зв'язуючись із новими вуглеводами. Конформація лектинів при цьому змінюється, інформація про неї надходить у геном і рослина таким чином реагує на зміни та пристосовується до них. Тому лектини можуть координувати фізіологічні процеси у динамічних умовах оточуючого середовища [3, 9].

Однак існуючі дані щодо фізіологічної ролі лектинів у рослинному організмі стосуються переважно родин злакових і бобових як модельних об'єктів одно- та дводольних рослин. Крім того, досліджена фізіологічна роль лектинів лише в окремих процесах. Так, у бобових вивчають участь лектинів у процесах утворення та функціонування симбіотичних комплексів [11, 13], а у злакових – участь лектинів у формуванні стійкості до абіотичних і біотичних стресових факторів [14]. Комплексних досліджень, які б стосувалися ролі лектинів у різноманітних фізіологічних процесах у межах одного таксону, немає.

Льон олійний (*Linum humile* Mill.) є важливою промисловою, лікарською та олійною культурою, яка екологічно доволі пластична – добре себе почуває у різних кліматичних зонах і дає досить високий врожай [10]. Зважаючи на широке застосування цієї культури і цінну олію, яка активно використовується у харчуванні, медицині та промисловості, важливим є її дослідження у фізіолого-біохімічному аспекті, зокрема виявлення й вивчення лектиноподібних властивостей цієї культури. Крім того, дослідження особливостей лектинів льону олійного впродовж онтогенезу розширить уявлення про фізіологічну роль лектинів у рослин в цілому.

### Матеріали та методи

Об'єктом дослідження слугували такі генотипи льону олійного: К-7811, СІ-1655, Байкал, К-6776, К-7099, К-6080, К-1176, К-6686, К-7354, Південна ніч, К-7276, К-8085 та

К-7481. Рослинний матеріал відбирали в польових умовах упродовж онтогенезу, а саме відповідно до таких стадій розвитку: проростки, «ялинка», бутонізація та цвітіння.

У лабораторних умовах від рослин відокремлювали органи (корені, стебла та листя), з яких за стандартними методиками з модифікаціями (змінений склад екстракційного буферного розчину) екстрагували лектиноподібні білки [1, 4, 8].

Біологічну активність екстрактів лектинів характеризували за двома параметрами: **кількісним** (коефіцієнт лектинової активності) і **якісним** (вуглеводнева специфічність).

*Активність лектинів* визначали за допомогою реакції гемаглютинації з 2% суспензією трипсинизованих еритроцитів кроля [1, 2] з урахуванням концентрації білка. Концентрацію білка визначали спектрофотометрично за методом Варбурга-Крістіана [15]. Лектинову активність (ЛА) (мкг/мл) виражали як обернену величину – коефіцієнт лектинової активності (1/ЛА) (мкг/мл)<sup>-1</sup>. На графіках дані 1E+09 означають 1×10<sup>9</sup> (мкг/мл)<sup>-1</sup>.

*Вуглеводневу специфічність* визначали за допомогою обліку пригнічення розчинами вуглеводів реакції гемаглютинації. Використовували 0,6 М розчини таких вуглеводів: глюкоза, галактоза, маноза, ксилоза, арабіноза, мальтоза, сахароза, лактоза, фруктоза та глюкозамін [9]. Вуглеводневу специфічність фіксували як позитивну у лектинів, виділених з окремого органа рослини льону на конкретній стадії розвитку, якщо вона спостерігалася у 80% зразків.

### Результати і їхнє обговорення

Лектини були виділені з вегетативної маси льону олійного різних генотипів. При цьому видно (рис. 1), що у всіх досліджених генотипів максимальна лектинова активність спостерігалася на стадії «ялинки», а мінімальна – на стадії бутонізації. Так, залежно від генотипу, коефіцієнт лектинової активності на стадії проростків коливався від 3,68×10<sup>4</sup> до 3,87×10<sup>6</sup> (мкг/мл)<sup>-1</sup>, на стадії «ялинки» – від 4,23×10<sup>6</sup> до 3,53×10<sup>9</sup> (мкг/мл)<sup>-1</sup>. При переході до стадії бутонізації цей показник значно знижувався та становив близько 0,0057 до 0,31 (мкг/мл)<sup>-1</sup>, а на стадії цвітіння знову підвищувався та становив від 12,46 до 128,99 (мкг/мл)<sup>-1</sup>.

Характер змін лектинової активності протягом онтогенезу в різних генотипів є дуже схожим, однак за абсолютними показниками можна розрізнити групи. Так, високолектиновими виявилися генотипи К-6686, К-1176, К-8085 та К-7354, низьколектиновими – К-6776, К-7099, К-6080 та К-7481. Інші 5 генотипів (К-7811, СІ-1655, Байкал, Південна ніч та К-7276) ми віднесли до середньолектинових.

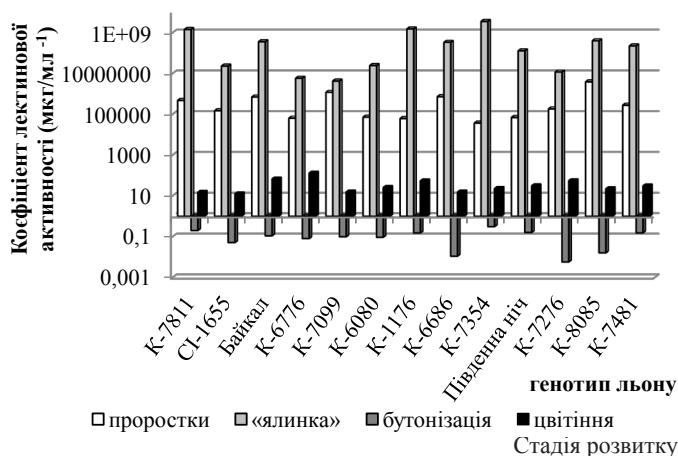


Рис. 1. Динаміка лектинової активності льону олійного протягом вегетації залежно від генотипу.

Для з'ясування загальної картини змін було визначено середню лектинову активність усіх генотипів (рис. 2). На початковому етапі онтогенезу (стадія проростків) коефіцієнт лектинової активності становив у середньому  $1,83 \times 10^5$  (мкг/мл)<sup>-1</sup>, на стадії «ялинки» він збільшився до  $5,22 \times 10^8$  (мкг/мл)<sup>-1</sup>. При переході до генеративного етапу онтогенезу (стадія бутонізації) коефіцієнт лектинової активності різко знижувався і становив  $1,11 \times 10^{-1}$  (мкг/мл)<sup>-1</sup>, а на стадії цвітіння дещо збільшувався та сягав рівня  $3,80 \times 10^1$  (мкг/мл)<sup>-1</sup>.

Зміни лектинової активності відповідають змінам пріоритетних фізіологічних процесів. Так, максимальний коефіцієнт лектинової активності спостерігається на початкових етапах розвитку (стадіях проростків і «ялинки»), в період так званого «повільного росту» [7], коли в рослин льону відбувається поділ клітин і їх диференціація, а саме в цих процесах лектини беруть активну участь [5].

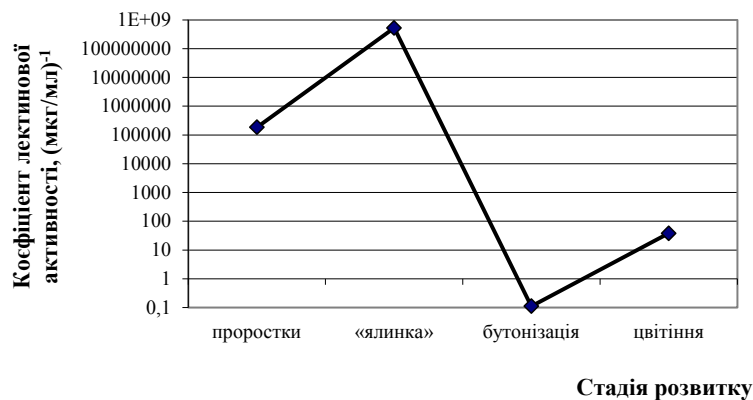


Рис. 2. Зміна середнього коефіцієнту лектинової активності протягом вегетації.

Зі стадії бутонізації у рослин льону починається період «швидкого росту», коли поділ і диференціювання клітин практично припиняються, а уже існуючі тільки збільшуються в розмірах. Основна кількість лектиноподібних білків на стадії бутонізації сконцентрована в зачатках бутонів, а не у вегетативних органах, загальна лектинова активність останніх є найменшою. Збільшення активності лектинів при переході у стадію цвітіння можна пояснити їх безпосередньою участю у процесах розпізнавання маточкою пилку і запліднення [11, 13].

Враховуючи наявне функціональне диференціювання рослин на органи, було визначено рівень лектинової активності окремо коренів, листя та стебла.

На початкових етапах онтогенезу (стадії проростків та «ялинки») домінантним за розмірами, швидкістю росту й фізіологічною роллю з усіх органів є коренева система, а надземна частина у цей період росте дуже повільно. На подальших стадіях онтогенезу (період «швидкого росту») починає активно рости і розвиватися надземна частина, особливо збільшується кількість листків, а коренева система при цьому гальмується у рості й основним за функціонуванням органом у цей період (стадії бутонізації та цвітіння) є листки, розмір яких збільшується у декілька разів. Стебло у льону олійного є органом, який росте і розвивається найповільніше. Так, на стадії проростків сходів його ще немає, на стадії «ялинки» він з'являється, але росте дуже повільно, що зберігається і на стадії бутонізації, коли проходить остаточна диференціація провідної системи стебла. Зі стадії цвітіння фізіологічна роль стебла збільшується та його ріст значно пришвидшується. Але

вирішальну роль стебло має на стадії дозрівання, коли листя починає відмирати і стебло, окрім провідної, виконує асиміляційну функцію [7, 10, 12].

У зв'язку з цим нами був проаналізований коефіцієнт активності виділених лектиноподібних білків різної органної належності (рис. 3). Дані представлені у формі частки лектинової активності певного органа від загальної для всієї рослини.

Виявлена певна залежність лектинової активності від органа виділення. Так, на початкових стадіях вегетації (проростки та «ялинка») домінують корінь, рівень лектинової активності якого становить приблизно 80% від лектинової активності усєї рослини. Ще можна пояснити фізіологічним домінуванням у цей період саме цього органа. У цей період у кореневій системі переважають процеси поділу клітин і диференціації, а загальновідомим є той факт, що лектини безпосередньо берть участь у цих процесах [5].

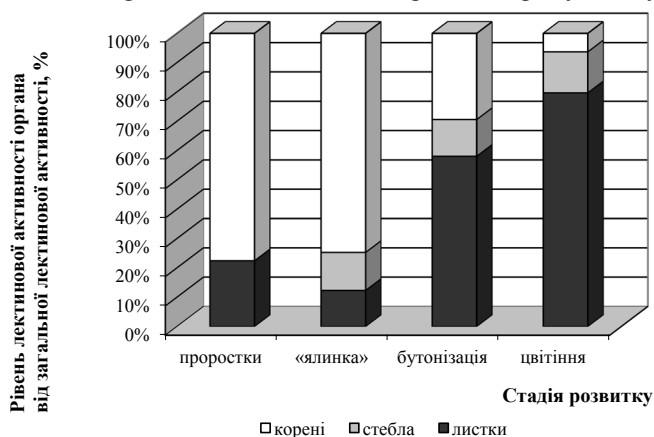


Рис. 3. Коефіцієнт активності лектинів різної органної належності, %.

При переході до етапу «швидкого росту» (стадії бутонізації та цвітіння) за рівнем лектинової активності домінують листки, де вона становить 50 і 80% від загальної лектинової активності рослини відповідно. У цей період основним фізіологічним процесом у рослині є фотосинтез, а відповідно до цього домінують листя. Алексидзе зі співавторами [2] була доведена участь лектинів у цьому найважливішому для рослин фізіологічному процесі. Висунуто гіпотезу, що лектини тилакоїдної мембрани разом із пігментами утворюють пігмент-лектиновий комплекс, роль лектинів якого полягає у зв'язуванні розчинних у стромі ферментів темної стадії фотосинтезу.

Вклад стебла у рівень лектинової активності є мінімальним і майже не змінюється протягом онтогенезу. Так, на стадіях «ялинка» та бутонізації відбуваються диференціація стебла й утворення провідної системи, у той же час рівень лектинової активності на цих етапах онтогенезу становить приблизно 10%. При переході на стадію цвітіння його вклад у загальний рівень лектинової активності збільшується до 15%. Це може бути пов'язано із закінченням диференціації провідної системи та переважання у стеблі на цьому етапі функції проведення води та поживних речовин. Крім того, у зв'язку зі збільшенням фотосинтетичної активності листя збільшується і кількість утворених органічних речовин, які потрібно транспортувати до місць потреби, тому і збільшується навантаження на флоему. Відомо, що лектини завдяки їх вуглеводозв'язуючим властивостям беруть безпосередню участь у транспорті поживних речовин по флоемі [6, 11, 13].

У зв'язку з тим, що впродовж розвитку змінюється набір вуглеводів на клітинних поверхнях, суттєве значення для розвитку рослин льону має не лише кількісний показник

лектинів – їх активність, а й якісний – здатність розпізнавати певні вуглеводи – вуглеводнева специфічність.

Упродовж вегетації фіксували зміни вуглеводневої специфічності, які були залежними від стадії онтогенезу, органа виділення та генотипу. Так, на стадії проростків лектини переважної більшості сортотразків незалежно від органної належності, були здатні розпізнавати манозу та глюкозамін, однак у лектинів листя на цій стадії спостерігалася наявність специфічності і до мальтози (див. таблицю).

На стадії «ялинка» спектр вуглеводневої специфічності лектинів дещо змінювався – незалежно від генотипу й органної належності вони були здатні розпізнавати манозу. Однак залежно від органа виділення спостерігалася додаткова специфічність: у лектинів листя – до галактози та мальтози, у лектинів коренів – до глюкозаміну, а у лектинів стебла – до галактози (див. таблицю).

На стадії бутонізації спектр вуглеводневої специфічності суттєво змінюється: лектини здатні розпізнавати галактозу, глюкозу, арабінозу та фруктозу, однак лектини листя здатні ще додатково розпізнавати мальтозу, а лектини коренів – глюкозамін.

При переході на стадію цвітіння – спектр вуглеводневої специфічності дещо змінюється – усі лектини здатні розпізнавати і зв'язувати арабінозу та глюкозамін. На цій стадії лектини стебла здатні також розпізнавати ще й галактозу, а листя – мальтозу (див. таблицю).

Вуглеводнева специфічність лектиноподібних білків вегетативних органів  
льону олійного впродовж вегетації

Органна належність	Стадії розвитку			
	проростки	«ялинка»	бутонізація	цвітіння
корені	маноза, глюкозамін	маноза, глюкозамін	галактоза, глюкоза, арабіноза, фруктоза, глюкозамін	арабіноза, глюкозамін
стебла	–	маноза, галактоза	галактоза, глюкоза, арабіноза, фруктоза	арабіноза, глюкозамін, галактоза
листя	маноза, глюкозамін, мальтоза	маноза, галактоза, мальтоза	галактоза, глюкоза, арабіноза, фруктоза, мальтоза	арабіноза, глюкозамін, мальтоза

Отже, зміни вуглеводневої специфічності протягом онтогенезу є залежними від стадії розвитку: на стадії сходів спостерігається специфічність до манози та глюкозаміну, на стадії «ялинка» – до манози, на стадії бутонізації – до галактози, глюкози, арабінози та фруктози, а на стадії цвітіння – до арабінози та глюкозаміну. Крім того, спостерігається залежність спектра вуглеводневої специфічності від органа виділення. Так, окрім вуглеводневої специфічності, притаманної окремій стадії розвитку, було виявлено, що усі лектини листя проявляють специфічність до мальтози, лектини стебла – до галактози, а коренів – до глюкозаміну (див. таблицю).

Наявність вуглеводневої специфічності до манози на початкових етапах розвитку (стадії сходів і «ялинка») та зміну її на арабінозу в подальшому (стадії бутонізації та цвітіння) можна пояснити фізіологічними процесами, які відбуваються у цей час. Так, на початкових етапах розвитку переважно відбуваються процеси поділу клітин і їх диференціювання, що виражається у повільному рості, тому цей період називають періодом «повільного росту» [7]. При переході до стадії бутонізації процеси проліферації та диференціації майже завершуються і починається процес росту за рахунок розтягування клітин. Крім того, у цей період починає формуватися луб і накопичуватися слиз, до складу яких переважно входить арабіноза. Різку зміну вуглеводної специфічності при переході до стадії



бутонізації порівняно з попередньою стадією можна пояснити тим, що у цей період, окрім ростових процесів, починається формування генеративних органів і остаточне формування провідної системи. Саме для формування провідної системи, на нашу думку, лектини у цей період набувають здатності розпізнавати різноманітні моносахариди (фруктозу, глюкозу, арабінозу та галактозу).

Наявність тієї чи іншої вуглеводневої специфічності у лектиноподібних білках різних органів можна пояснити переважанням у них тих чи інших фізіологічних процесів. Так, основною функцією листка є фотосинтез, основний продукт якого – глюкоза. Лектини цього органа незалежно від стадії розвитку здатні розпізнавати її димер – мальтозу. Лектини коренів завжди розпізнають глюкозамін. Це можна пояснити тим, що однією із основних подій, які відбуваються у цьому органі, є утворення та функціонування комплексів із різноманітними мікроорганізмами (бактеріями та міксоміцетами), до складу оболонки яких входить аміносахарид глюкозамін. Здатність лектинів стебла розпізнавати галактозу можна пояснити тим, що цей моносахарид входить до складу провідної системи (ксилеми та флоєми), а також може бути транспортною формою вуглеводів.

Отже, максимальна лектинова активність спостерігається на початкових етапах розвитку, а вуглеводнева специфічність у цей час обмежується здатністю розпізнавати манозу. Зі стадії бутонізації рослин льону починається період «швидкого росту», коли рівень лектинової активності є мінімальним, а спектр вуглеводної специфічності змінюється – з манози на арабінозу. Крім цього, спостерігається зміна як активності, так і вуглеводневої специфічності залежно від органа виділення. Так, на початкових етапах розвитку за активністю лектинів переважає коріння, а на стадіях бутонізації та цвітіння – листя. Активність лектинів стебла є досить низькою протягом усього онтогенезу. У лектинів листя спостерігається наявність специфічності до мальтози, стебла – до галактози, а коренів – до глюкозаміну.

Відомо, що на різних етапах розвитку рослин різних таксонів змінюється і лектинова активність певних органів [3]. Так, упродовж онтогенезу встановлена зміна активності лектинів у квасолі (*Phaseolus* L.) [5], картоплі (*Solanum* L.) [3], яблуні (*Malus* Mill.) [13], м'яті (*Mentha* L.) [11], пшениці (*Triticum* L.) [8] та рослинах багатьох інших родів. Лектинову активність виявляють екстракти стебла, листя, коренів, бульб, цибулин, кореневищ, а також генеративних органів [3]. Визначені такі загальні закономірності зміни активності лектинів у річному циклі розвитку рослин: у насіння активність збільшується при дозріванні; стебла не мають постійного рівня лектинової активності – він збільшується навесні (при пробудженні) та досягає максимуму при дозріванні насіння; у листках активність лектинів збільшується з початком їх повноцінного функціонування та знижується наприкінці вегетації [3]. Нами отримані аналогічні дані стосовно лектинової активності білків різних органів льону олійного.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Алексидзе Г. Я., Королёв Н. П., Семёнов И. Л., Выхребенцева Э. И. Выделение лектинов и их возможных рецепторов из корнеплода сахарной свеклы // Физиология растений. 1983. Т. 30. № 6. С. 1069–1076.
2. Алексидзе Г. Я., Литвинов А. И., Выхребенцева Э. И. Модель организации на мембране тилакоидов комплекса ферментов цикла Кальвина с участием лектина фотосистемы I // Физиология растений. 2002. Т. 49. № 1. С. 155–159.
3. Антонюк В. О. Лектини та їх сировинні джерела. Львів: Вид-во ПП «Кварт», 2005. 554 с.

4. *Бабюша А. В.* Действие  $\alpha$ -интерферона человека и вирусной инфекции на активность фитогемагглютининов и другие показатели в листьях растений табака и картофеля // Физиология растений. 1995. Т. 42. № 6. С. 891–898.
5. *Безрукова М. В., Лубянова А. Р., Фатхутдинова Р. А.* Участие лектинов пшеницы и фасоли в регуляции деления клеток апикальной меристемы корней разных растений // Физиология растений. 2011. Т. 58. № 1. С. 144–151.
6. *Даскалюк Ю. А., Артеміє В. Г., Кириченко О. В.* Лектинова активність білків пасоки *Vitis vinifera* L. // Укр. ботан. журн. 2002. Т. 59. № 4. С. 460–463.
7. *Дьяков А. Б.* Физиология и экология льна. Краснодар: ВНИИМК «МС–Центр», 2006. 214 с.
8. *Комарова Э. М., Выскребенцева Э. И., Трунова Т. И.* Активность лектиноподобных белков клеточных стенок и внешних мембран органелл и их связь с эндогенными лигандами в проростках озимой пшеницы при холодовой адаптации // Физиология растений. 2003. Т. 50. № 4. С. 511–516.
9. *Луцик М. Д., Панасюк В. М., Луцик А. Д.* Лектины. Львов: Вища школа, 1981. 156 с.
10. *Лях В. А., Сорока А. И.* Ботанические и цитогенетические особенности видов рода *Linum* и биотехнологическте пути работы с ними: монография. Запорожье: ЗНУ, 2008. 182 с.
11. *Марков Е. Ю., Хавкин Э. Е.* Лектины растений: предполагаемые функции // Физиология растений. 1983. Т. 30. № 5. С. 852–867.
12. *Сизов И. А.* Закономерности развития и роста льна под влиянием внешних факторов // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. 1970. Т. 42. № 1. С. 217–256.
13. *Сытников Д. М., Коць С. Я.* Участие лектинов в физиологических процессах растений // Физиология и биохимия культ. растений. 2009. Т. 41. № 4. С. 279–296.
14. *Шакирова Ф. М.* Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и её регуляция. Уфа: Гилем, 2001. 160 с.
15. *Dawson R., Elliott D., Elliott U., Jones K.* Data for Biochemical Research. 2nd edn. Oxford: Clarendon Press; 1986. 464 p.

Стаття: надійшла до редакції 27.06.12

доопрацьована 18.09.12

прийнята до друку 25.09.12

**THE CHANGE OF LECTINLIKE PROTEINS OF OIL FLAX IN ONTOGENESIS****G. Levchuck, H. Voitovich, V. Lyakh**

*Zaporizhzhya National University  
66, Zhukovskiy St., Zaporizhzhya 69063, Ukraine  
e-mail: genetika@znu.edu.ua*

The dynamics of quantitative and qualitative characteristics of lectinlike proteins of vegetative organs in **different genotypes of oil flax during the growing season was studied**. It was established that the both indicators depend on the stage of development and organ of origin, but their relationship with the first factor is much stronger. There is also the dependence of lectin activity level on organ association: at the initial stages the most active organs are the roots and starting with budding stage – the leaves.

*Keywords: Linum humile L., lectins, organ identity, lectin activity and carbohydrate specificity.*

**ИЗМЕНЕНИЕ ХАРАКТЕРИСТИК ЛЕКТИНОПОДОБНЫХ БЕЛКОВ ЛЬНА МАСЛИЧНОГО В ОНТОГЕНЕЗЕ****А. Левчук, Е. Войтович, В. Лях**

*Запорожский национальный университет  
ул. Жуковского, 66, Запорожье 69063, Украина  
e-mail: genetika@znu.edu.ua*

Исследована динамика количественных и качественных характеристик лектиноподобных белков вегетативных органов льна масличного разных генотипов на протяжении вегетации. Установлено, что оба показателя зависят как от стадии развития, так и от органной принадлежности, однако связь с первым фактором значительно сильнее. Наблюдается также зависимость уровня лектиновой активности от органной принадлежности: на начальных этапах активными являются корни, а начиная со стадии бутонизации – листья.

*Ключевые слова: Linum humile L., лектины, органная принадлежность, лектиновая активность, углеводная специфичность.*

## ВПЛИВ НІТРАТУ НІКЕЛЮ НА ПОЛІПЕПТИДНИЙ СКЛАД БІЛКІВ У ПРОРОСТАЮЧОМУ НАСІННІ КУКУРУДЗИ

**В. Лашко, О. Вінниченко**

*Науково-дослідний інститут біології Дніпропетровського національного  
університету імені Олеся Гончара  
пр. Гагаріна, 72, Дніпропетровськ 49010, Україна  
e-mail: vitalashik@rambler.ru*

Досліджено особливості змін у поліпептидному складі білків *Zea mays* L. за дії нітрату нікелю різної концентрації на стадії проростання насіння. Встановлено суттєві зміни електрофоретичного спектра білків за дії важкого металу.

*Ключові слова:* *Zea mays* L., нітрат нікелю, електрофоретичний спектр, білки.

Вивчення механізмів дії важких металів на рослини, які базуються на морфофізіологічних властивостях рослин і фізико-хімічних властивостях металів, є одним із актуальних завдань у зв'язку з можливістю використання рослин для фіторе mediaції ґрунтів, забруднених важкими металами, а також для запобігання потраплянню важких металів в організм людини і тварин [3]. Відомо, що стійкість рослин до дії важких металів забезпечується молекулярними та фізіологічними механізмами, які можуть бути специфічними як для конкретного виду рослин, так і для цілої таксономічної групи того чи іншого рівня [5]. Дія важких металів, зокрема нікелю, на проростання насіння на сьогодні вивчена недостатньо [4, 6, 9].

Ефект важких металів на проростання залежить від їх здатності проникати крізь покриви насіння та від їх впливу на фізіологічні процеси, що пов'язані з проростанням. У зв'язку з недостатньою вивченістю впливу нікелю на білковий обмін проростаючого насіння метою нашої роботи було вивчення вмісту та складу білків насіння *Zea mays* L. на стадії проростання за впливу нітрату нікелю різної концентрації.

### Матеріали та методи

Об'єктом дослідження було проростаюче насіння кукурудзи (*Zea mays* L.) середньораннього гібриду Оржиця 237 МВ за 24-, 96-годинної експозиції на розчинах нітрату нікелю у концентраціях 0,05; 0,5; 1 та 5 мМ та через 120 год після припинення дії хімічного стресора. Сумарні білки насіння кукурудзи екстрагували 0,0125 М натрій-боратним буфером (рН 10) з додаванням 1% додецилсульфату натрію та 2% β-меркаптоетанолу і розділяли методом денатуруючого електрофорезу у градієнтному (10–20%) поліакриламідному гелі [8], використовуючи як маркери яєчний альбумін ( $M_r$  45 кД), рибонуклеазу ( $M_r$  14 кД), бичачий сироватковий альбумін ( $M_r$  67 кД). Денситометрію проводили за допомогою програми Електрофор-менеджер, 2004 р. Вміст білка у зерні визначали за методом Бредфорд [7]. Статистичну обробку даних, отриманих у трьох аналітичних повторностях, проведено за допомогою програми Microsoft Statistica 6.0, різницю між вибірками вважали достовірною при  $p < 0,05$ .

### Результати і їхнє обговорення

Результати досліджень показали, що за 24-годинної експозиції насіння кукурудзи Оржиця 237 МВ на нітраті нікелю різної концентрації визначено наявність восьми середньо- та низькомолекулярних компонентів з  $M_r$  від 11 до 60 кД (див. таблицю). Під впливом

$\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$  у концентрації 0,05 мМ зникає білок із молекулярною масою 54 кД. Вміст компонентів 60 і 14 кД зменшується щодо контролю, а вміст компонентів 37 і 22 кД – збільшується. За концентрації 0,5 мМ нітрату нікелю кількість поліпептидів не змінювалася щодо контролю, але зафіксовано суттєве накопичення білків з  $M_r$  60, 29, 22 та 14 кД. Також спостерігалось значне зниження вмісту компонента з  $M_r$  37 кД. За дії нітрату нікелю у концентрації 1 мМ кількість компонентів зменшилася до шести. Повністю зникали білки з  $M_r$  60 і 54 кД. Відбувалося підвищення вмісту низькомолекулярних білків з  $M_r$  29, 22, 19 та 14 кД. У той же час спостерігалось значне зменшення вмісту поліпептидів з  $M_r$  37 кД. За дії  $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$  у концентрації 5 мМ виявлено сім поліпептидів. Поряд із відсутністю білка з  $M_r$  60 кД спостерігалось зменшення вмісту компонентів з  $M_r$  37, 19 та 11 кД. Слід зазначити суттєве збільшення вмісту поліпептидів з  $M_r$  29, 22 та 14 кД. Таким чином, короткотривалий стрес (24-годинна експозиція) викликав збільшення вмісту поліпептидів з  $M_r$  29, 22 та 14 кД (за винятком концентрації 0,05 мМ). З підвищенням концентрації нітрату нікелю в проростаючому насінні кукурудзи відбувалося поступове зменшення вмісту поліпептиду з  $M_r$  11 кД. Активний синтез низькомолекулярних компонентів за дії нітрату нікелю можна розглядати як специфічну реакцію на стрес [2].

З продовженням стресового навантаження (96 год експозиції на нітраті нікелю) електрофоретичний аналіз виявив відмінності у білкових спектрах проростаючого насіння кукурудзи (див. таблицю). Так, виявлено п'ять компонентів з  $M_r$  11–37 кД. У всіх варіантах повністю зникали білки з  $M_r$  54 та 60 кД. За дії 0,05 мМ  $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$  збільшувався вміст білків 14 та 11 кД. Вплив 0,5 мМ нітрату нікелю характеризувався появою низькомолекулярного поліпептиду 29 кД, значним підвищенням вмісту компонентів 27 та 11 кД. Вміст інших поліпептидів даного зразка знижувався щодо контролю. Найбільш виразною була реакція проростків кукурудзи на вплив  $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$  у концентрації 1 мМ, для яких встановлено сім поліпептидних компонентів із молекулярною масою від 11 до 37 кД. Зареєстровано появу білків з  $M_r$  29 та 19 кД і значне підвищення вмісту низькомолекулярних компонентів 27 та 11 кД. Встановлено інгібування накопичення поліпептидів з  $M_r$  37, 22 і 14 кД. Вплив  $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$  у концентрації 5 мМ полягав у накопиченні низькомолекулярних білків 27 та 11 кД поряд зі зменшенням частки білків з  $M_r$  37, 22 та 14 кД. Отримані дані можуть свідчити, що крім зменшення загальної інтенсивності білкового синтезу, відбувається активація новоутворення стресових білків. Диференційна зміна активності генетичного апарату є основним механізмом, який забезпечує реалізацію захисних і адаптаційних реакцій. Адаптаційний синдром включає в себе значне зниження інтенсивності загального білкового синтезу. Це явище може бути не стільки результатом пошкоджень клітини, скільки типовим проявом захисної реакції, а часткове гальмування синтезу білка зменшує інтенсивність деструктивних процесів [1].

В умовах припинення дії хімічного чинника реакція досліджуваних рослин мала стабілізаційний характер, крім варіанта з концентрацією 5 мМ (див. таблицю). У контролі виявлено вісім поліпептидів від 11 до 54 кД. У варіанті з концентрацією нітрату нікелю 0,05 мМ визначено сім поліпептидів. Зареєстровано синтез білків з  $M_r$  54 та 24 кД (цей компонент був відсутній в електрофоретичному спектрі за 96-годинної дії нітрату нікелю). Вміст поліпептидів з  $M_r$  27 та 19 кД мав тенденцію до зростання, а вміст компонентів 54, 37 та 22 кД зменшувався щодо контролю. Вміст поліпептидів з  $M_r$  14 та 11 кД залишався на рівні контролю. Відомо, що у випадках помірного стресу відновлення інтенсивності білкового синтезу спостерігається через деякий час [1]. Можна припустити, що така реакція рослин є відповіддю на помірний стрес, викликаний впливом 0,05 мМ нітрату нікелю.

Кількість електрофоретичних спектрів у варіанті з концентрацією 0,5 мМ  $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$  зменшилася до шести (див. таблицю). Вміст поліпептиду з  $M_r$  54 кД знижувався як у цьому варіанті, так і в усіх подальших дослідних варіантах. Його синтез після припинення дії іонів нікелю у концентраціях 0,5; 1; 5 мМ не відновлювався. Крім того, встановлено інгібування накопичення поліпептидів з  $M_r$  27 та 24 кД. У той же час вміст компонентів з  $M_r$  22, 14, 11 кД суттєво збільшувався порівняно з контролем. За дії  $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$  у концентрації 1 мМ електрофоретичні спектри аналогічні попередньому зразку. Зареєстровано підвищення вмісту поліпептидів з  $M_r$  24, 22, 14, 11 кД. У той же час вміст у компонентів з  $M_r$  27 та 24 кДа суттєво зменшувався.

Зміни вмісту білкових компонентів проростаючого насіння кукурудзи  
Оржиця 237 МВ за дії нітрату нікелю

Rf	$M_r$ , кД	Вміст білка, %				
		Концентрація $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ , мМ				
		Контроль	0,05	0,5	1	5
24 год експозиції						
0,06	60	1,46±0,01	1,17±0,01	2,22±0,01	–	–
0,10	54	1,77±0,01	–	1,92±0,01	–	1,95±0,01
0,25	37	32,58±0,27	36,86±0,31	17,53±0,21	8,9±0,04	5,92±0,04
0,34	29	12,52±0,12	12,79±0,11	18,20±0,12	16,15±0,13	18,02±0,15
0,46	22	8,44±0,08	9,90±0,07	12,93±0,13	18,49±0,41	12,45±0,08
0,51	19	28,32±0,21	28,72±0,33	26,18±0,21	39,78±0,32	26,36±0,23
0,66	14	12,15±0,06	7,83±0,04	18,29±0,11	14,23±0,13	33,15±0,38
0,74	11	2,76±0,03	2,73±0,01	2,73±0,02	2,44±0,01	2,15±0,02
96 год експозиції						
Rf	$M_r$ , кД					
0,25	37	51,36±0,61	25,26±0,31	39,74±0,33	26,13±0,24	50,03±0,48
0,34	29	–	–	3,36±0,04	3,33±0,05	–
0,39	27	4,76±0,04	4,62±0,05	9,30±0,08	11,20±0,09	8,29±0,07
0,46	22	3,81±0,03	2,18±0,01	–	2,99±0,03	3,19±0,02
0,51	19	–	–	–	20,76±0,21	–
0,66	14	34,54±0,23	50,86±0,46	24,06±0,21	17,23±0,18	30,40±0,21
0,74	11	5,53±0,04	17,08±0,11	23,54±0,17	18,36±0,15	8,09±0,07
120 год після припинення дії нітрату нікелю						
Rf	$M_r$ , кД					
0,10	54	1,79±0,02	1,27±0,01	–	–	–
0,25	37	51,72±0,46	37,08±0,31	55,21±0,51	32,13±0,28	15,83±0,12
0,39	27	10,08±0,05	22,07±0,11	1,79±0,01	1,43±0,01	–
0,42	24	2,07±0,01	–	1,10±0,01	2,27±0,01	–
0,46	22	3,24±0,01	1,48±0,01	4,53±0,02	6,36±0,03	–
0,51	19	3,85±0,02	10,95±0,08	–	–	–
0,66	14	19,17±0,17	19,08±0,14	23,11±0,18	27,91±0,21	–
0,74	11	8,08±0,04	8,07±0,03	14,26±0,09	29,90±0,25	84,17±1,82

Найбільш негативний вплив важкого металу на поліпептидний склад білків зафіксовано за дії  $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$  у концентрації 5 мМ. Через 120 год після припинення дії нітрату нікелю кількість білкових компонентів знизилася до двох проти восьми у контролі з  $M_r$  37 та 11 кД.

Відомо, що реакція рослин на екстремальні умови супроводжується синтезом низькомолекулярних стресових білків (10–39 кД) [2]. У наших дослідженнях у проростаючому

насінні впродовж усього періоду спостереження були наявними низькомолекулярні поліпептиди з  $M_r$  37, 22, 14, та 11 кД, вміст яких суттєво варіював залежно від концентрації нітрату нікелю і терміну проростання. Синтез низькомолекулярних стресових білків асоціюється з розвитком стійкості до дії стресу [2]. Проте можна припустити, що функції цих білків пов'язані не лише з участю у стресових реакціях, оскільки у досліджуваних нами рослинах низькомолекулярні білки були присутні в електрофоретичному спектрі як за дії стресу, так і в контролі.

Показано, що дві білкові зони, а саме, 19 та 22 кД, які належать до запасних білків насіння проламінового типу, за 24-годинної експозиції не тільки не гідролізувались, а навпаки, виявили тенденцію до ресинтезу за дії важкого металу, особливо за його концентрації 1 мМ. Ці компоненти зареєстровано у рослин і на 96-ту год експозиції. Після припинення стресової дії наявність обох поліпептидів відзначали у варіанті з концентрацією нітрату нікелю 0,05 мМ.

Таким чином, встановлено, що за дії нітрату нікелю відбувалися суттєві зміни в якісному та кількісному складі білків кукурудзи на етапі проростання насіння. Найбільш негативний вплив спричинив нітрат нікелю у концентрації 5 мМ. Зміна вмісту низькомолекулярних компонентів з  $M_r$  37, 22, 14 та 11 кД у поліпептидному складі білків упродовж дослідження свідчить про реакцію білкової системи на дію важкого металу, яка має адаптивний характер.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Колупаєв Ю. Є. Стресові реакції рослин: молекулярно-клітинний рівень. Харків: Харків. держ. аграр. ун-т, 2001. 173 с.
2. Косаківська І. В., Голов'яко І. В. Вплив температурних стресів на вміст та електрофоретичний спектр білків різних органів *Phaseolus vulgaris* L. і *Zea mays* L. на ранніх етапах вегетативного розвитку // Вісн. Харків. нац. аграр. ун-ту. Сер. біол. 2007. № 2 (11). С. 58–63.
3. Серегин І. В., Кожевникова А. Д. Физиологическая роль никеля и его токсическое действие на высшие растения // Физиология растений. 2006. Т. 53. № 2. С. 285–308.
4. Серегин І. В., Кожевникова А. Д. Распределение кадмия, свинца, никеля и стронция в набухших зерновках кукурузы // Физиология растений. 2005. Т. 52. № 4. С. 635–640.
5. Феник С. И., Трофимьяк Т. Б., Блюм Я. Б. Механизмы формирования устойчивости растений к тяжелым металлам // Успехи современной биологии. 1995. Т. 115. № 3. С. 261–275.
6. Al-Yemeni M. N. Effect of Cadmium, Mercury and Lead on Seed Germination and Early Seedling Growth of *Vigna ambabensis* L. // Indian J. Plant Physiol. 2001. Vol. 6. P. 147–151.
7. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding // Anal. Biochem. 1976. P. 248–254.
8. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Natura. 1970. Vol. 227. N 52–59. P. 680.
9. Obroucheva N. V., Bystrova E. I., Ivanov V. B. et al. Root Growth Responses to Lead in Young Maize Seedlings // Plant Soil. 1998. Vol. 200. P. 55–61.

Стаття: надійшла до редакції 30.03.12

доопрацьована 26.06.12

прийнята до друку 27.06.12

**THE INFLUENCE OF NICKEL NITRATE ON POLYPEPTIDE  
PROTEIN COMPOSITION OF MAIZE GERMINATING SEEDS**

**V. Lashko, A. Vinnichenko**

*Biology Research Institute of Oles Honchar Dnipropetrovsk National University  
72, Gagarin Ave., Dnipropetrovsk 49010, Ukraine  
e-mail: vitalashik@rambler.ru*

The features of changes in the polypeptide mixture of the proteins of *Zea mays* L. seeds under the influence of different nickel nitrate concentrations during the germination. It was established that the effect of heavy metal caused significant changes in the electrophoretic spectrum of the total proteins.

*Keywords:* *Zea mays* L., nickel nitrate, electrophoretic spectrum, proteins.

**ВЛИЯНИЕ НИТРАТА НИКЕЛЯ НА ПОЛИПЕПТИДНЫЙ СОСТАВ  
БЕЛКОВ ПРОРАСТАЮЩЕГО ЗЕРНА КУКУРУЗЫ**

**В. Лашко, А. Винниченко**

*Научно-исследовательский институт биологии Днепрпетровского  
национального университета имени Олеса Гончара  
пр. Гагарина, 72, Днепрпетровск 49010, Украина  
e-mail: vitalashik@rambler.ru*

Исследованы особенности изменений полипептидного состава белков зерна *Zea mays* L. под действием нитрата никеля различной концентрации на стадии прорастания семян. Установлено, что действие тяжелого металла вызывает существенные изменения в электрофоретическом спектре суммарных белков.

*Ключевые слова:* *Zea mays* L., нитрат никеля, электрофоретический спектр, белки.



## МІКОРИЗА У *CAREX HIRTA* L. ЯК ОДНА ІЗ УМОВ ВИЖИВАННЯ В НАФТОЗАБРУДНеноМУ ҐРУНТІ

О. Цвілінюк, Л. Буньо, О. Карпин, О. Терек

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

Родина Сурегасеае (осокові) – велика група рослин, представники якої займають різноманітні екологічні ніші. У виду *Carex hirta* L., стійкого до нафтового забруднення ґрунту, виявлена арбускулярна мікориза на коренях і на кореневищах. Очевидно, це важливий чинник, який дає змогу рослинам осоки шорстковолосистої виживати в складних умовах росту на нафтозабруднених ґрунтах.

*Ключові слова:* мікориза, *Carex hirta*, корінь, кореневище, нафтове забруднення.

Осока шорстковолосиста (*Carex hirta* L.) належить до довгокореневищних багаторічних трав'яників. Це одна з піонерних рослин, яка заселяє забруднені ґрунти, що з'являються внаслідок видобутку нафти у м. Борислав [5]. Відомо, що при розливах нафти у ґрунті збільшується кількість фітопатогенних грибів, які, поряд зі зміною фізико-хімічних властивостей ґрунтів, погіршують умови росту і розвитку рослин. Однак рослини, які утворюють мікоризу, мають більший шанс вижити при інфікуванні хвороботворними мікроорганізмами порівняно з безмікоризними рослинами [3, 19]. Можливо, однією із адаптаційних складових *C. hirta* до життя у складних екологічних умовах є здатність до утворення арбускулярної мікоризи АМ.

Багатьма дослідниками тривалий час вивчалася мікориза у рослин із родини Сурегасеае. Деякими авторами виявлено, що частина досліджуваних видів осок колонізована ендоефітними грибами *Glomeromycota* (GFC), проте арбускули не були знайдені [12, 18]. Колонізація коренів рослин грибами GFC сезонно змінювалась [10, 14, 17].

Зустрічаються публікації з описом арбускулярної мікоризи в окремих вивчених видів осок, корені яких були колонізовані GFC грибами. Так, Miller et al. [13] повідомили про присутність GFC-грибів у 16 із 23 видів осок і тільки 9 із них мали мікоризу арбускулярного типу. Muthukumar et al. [15] розглянули 221 вид осок, із яких у 40% виявили АМ, і відзначили низьку здатність осокових до мікоризи. Weishanpel and Bedford [22] у 17 видів осок знайшли GFC і невеликі ділянки з арбускулярною мікоризою.

Вивчення рослин, які ростуть у природних критичних умовах, показує, що із 28 видів осокових лише 2 види не утворювали мікоризи упродовж року [6]. Gai et al. [11] виявили, що у 9 видів осок із Тибету була GFC і у 10 із 22 зразків були арбускули.

Метою нашої роботи було з'ясувати, чи є мікориза і якого вона типу в рослин довгокореневищного виду *C. hirta*, які утворюють первинне заростання нафтозабруднених ґрунтів у м. Борислав.

### Матеріали та методи

Рослини осоки шорстковолосистої, що 30 діб росли на чистому ґрунті (контроль) та ґрунті, забрудненому нафтою (50 г/кг) в модельних польових дослідах, викопували та промивали під проточною водою.

Корені розділяли на сегменти, що містили зону кореневих волосків, зону утворення бічних корінців, кореневища – на сегменти довжиною 1 см, вирізані з апікальної, серединної та базальної їхніх частин. Ці сегменти в нативному стані та фарбованому за допомогою метиленового синього розглядали в 15 полях зору й у 7 повторностях за допомогою бінокулярного мікроскопа, світлового мікроскопа «Jenaval» і скануючого електронного мікроскопа JEOL JSM-T220A.

Для аналізу мікоризи з коренів знімали первинну кору і з внутрішнього боку розглядали її за допомогою світлового мікроскопа «Jenaval» у наведених вище повторностях.

Анатомічну будову кореневищ вивчали під мікроскопом «Jenaval» на живих поперечних зрізах, зроблених від руки безпечною бритвою.

### Результати і їхнє обговорення

У природних умовах *Carex hirta* заселяє нафтозабруднені ґрунти шляхом вегетативного розмноження материнських рослин, що ростуть на чистій території. Материнська рослина утворює довгий симподіальний пагін, який росте під землею плагіотропно. Наявність у підземному пагоні (кореневищі) добре розвиненої аеренхіми (рис. 1) дає змогу вижити в токсичному середовищі, бо постійна внутрішня аерація клітин запобігає пошкодженню рослини [5, 20].

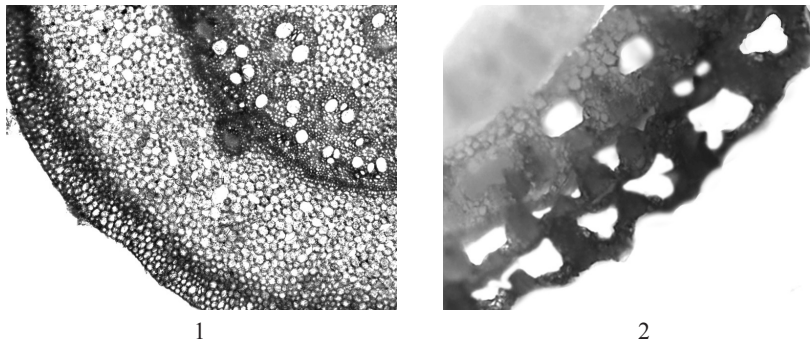


Рис. 1. Аеренхіма у кореневищі рослин *C. hirta* (світлова мікроскопія, збільшення 1 –  $\times 200$ ; 2 –  $\times 400$ ).

Потім пагін поступово набуває ортотропного положення, пробиває стійку гідрофобну кірку з нафтових вуглеводнів на поверхні ґрунту (рис. 2) і виходить із землі, утворюючи дочірню особину, у якій формується головний і декілька додаткових коренів [5, 8].



Рис. 2. Дочірні особини клону рослин *C. hirta*, що пробилися крізь кірку нафтозабрудненого ґрунту.

Оптичне вивчення поверхні коренів осоки шорстковолосистої в зоні корневих волосків за допомогою бінокюляра виявило міцелій грибів на тих коренях, що росли на нафтозабрудненому ґрунті (рис. 3).

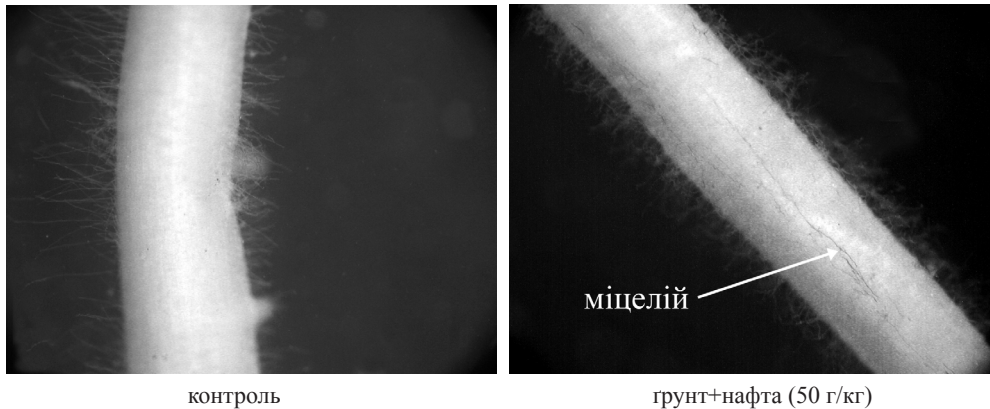


Рис. 3. Корінь *C. hirta* в зоні корневих волосків (світлова мікроскопія –  $\times 400$ ).

У наступній за розташуванням зоні навколо кореня і бічних корінців формується сітка з міцелію гриба як у контрольному, так і в дослідному варіантах (рис. 4).

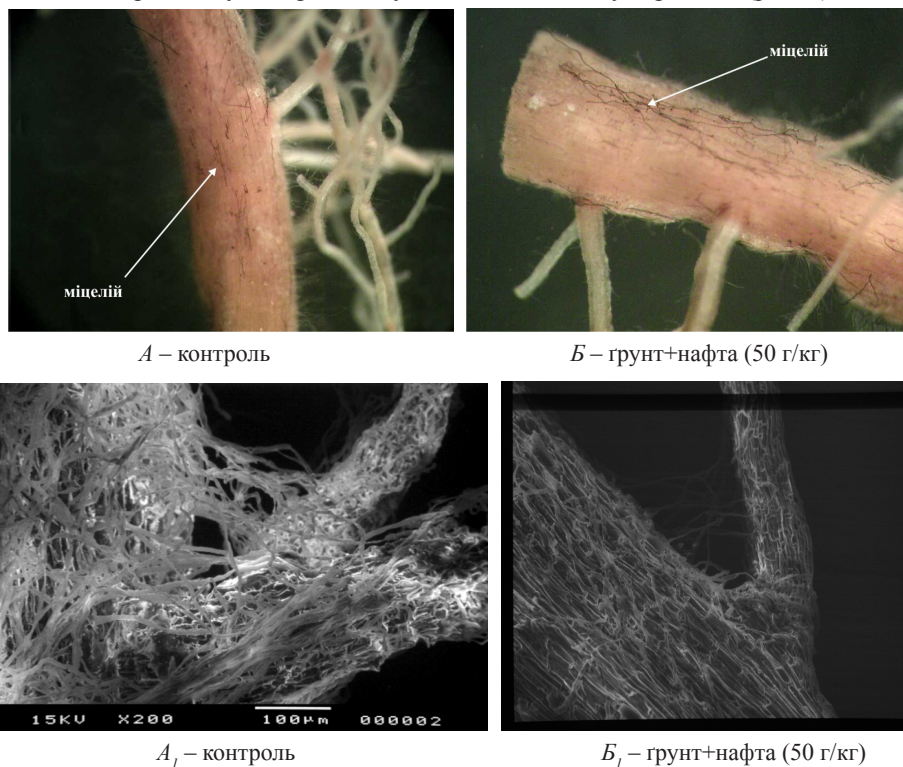


Рис. 4. Мікоризні корені *Carex hirta* в зоні росту бічних корінців. *A, B* – бінокюлярний мікроскоп –  $\times 300$ ; *A<sub>1</sub>, B<sub>1</sub>* – електронна скануюча мікроскопія –  $\times 500$ .

Отже, нафтове забруднення ґрунту пришвидшує колонізацію коренів рослин *C. hirta* мікоризними грибами у зоні корневих волосків.

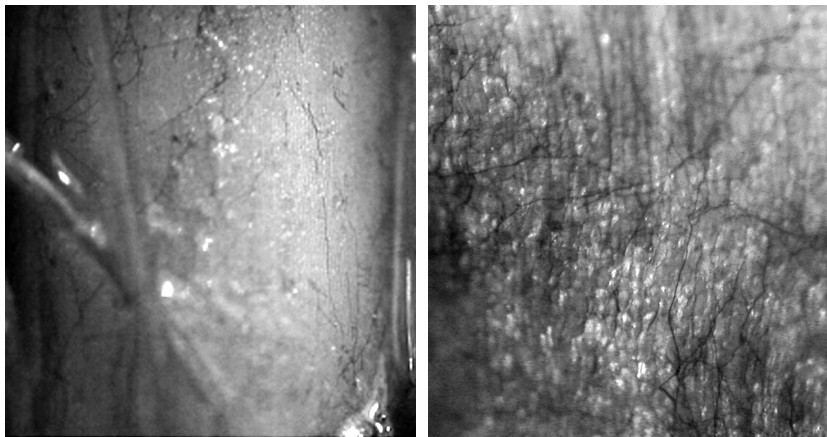
Більший відсоток підземної частини осоки шорстковолосистої припадає на кореневище. Як вже було зазначено, саме кореневище першим востає у нафтозабруднений ґрунт.

Морфометричні показники свідчать про сильніший розвиток підземної частини у рослин осоки шорстковолосистої за впливу нафти порівняно із контролем [7]. Очевидно, це пов'язано з їхньою потребою, бо відомо, що рослини утворюють підземну частину такого об'єму і будови, яка здатна забезпечити їх елементами живлення [4].

Дослідження кореневищ осоки показало, що дана рослина має мікоризу і на підземному пагоні (рис. 5). Причому на нафтозабруднених ґрунтах сітка екстраматричного міцелію навколо кореневища є значно густішою порівняно з контролем, формуючи поглинальний «пристрій» для підземного органа, який не має кореневих волосків.

Щільна сітка міцелію може поширюватися з колонізованого кореня чи кореневища у ґрунт, збільшуючи адсорбційну поверхню і, відповідно, рівень кореневого живлення рослин.

Особливо це важливо для рослин, які ростуть на нафтозабруднених ґрунтах із порушеним балансом поживних речовин [1].



Контроль

Ґрунт + нафта (50 г/кг)

Рис. 5. Мікориза кореневища *C. hirta* (бінокулярний мікроскоп –  $\times 300$ ).

Незважаючи на важливе значення мікоризного симбіозу для функціонування екосистем і біосфери в цілому, на сьогодні немає загальноприйнятої класифікації мікориз. Аналіз джерел літератури показав, що мікоризи підрозділяють на найрізноманітніші групи [2, 16, 21]. Насамперед розрізняють справжні мікоризи і псевдомікоризи.

Мікроскопування внутрішнього боку кори коренів осоки шорстковолосистої свідчить про те, що гіфи гриба проникають у кортекс, формуючи міжклітинний міцелій як у контролі, так і за дії нафти (рис. 6).

Проте при псевдоендомікоризах теж інфікується кора кореня. Псевдоендомікоризи описані у представників осокових і є прикладом помірному паразитизму гриба на вищій рослині [2].

На фотографії, зробленій за допомогою електронного скануючого мікроскопа, добре видно апресорії – місця закріплення гіфів гриба на поверхні епідермальних клітин кореневища, які є попередніми етапами формування арбускули (рис. 7, B<sub>1</sub>). Це опосередкований доказ того, що біотична взаємодія між грибом і підземною частиною рослини осоки шорстковолосистої належить до типу арбускулярної мікоризи [6].

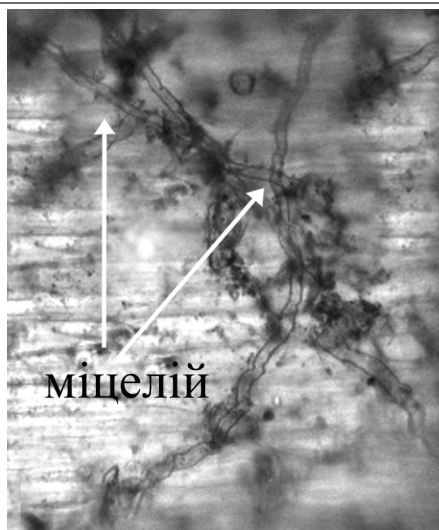


Рис. 6. Міцелій гриба на внутрішньому боці первинної кори кореня *C. hirta*, вирощеної на нафтозабрудненому ґрунті (світлова мікроскопія –  $\times 400$ ).

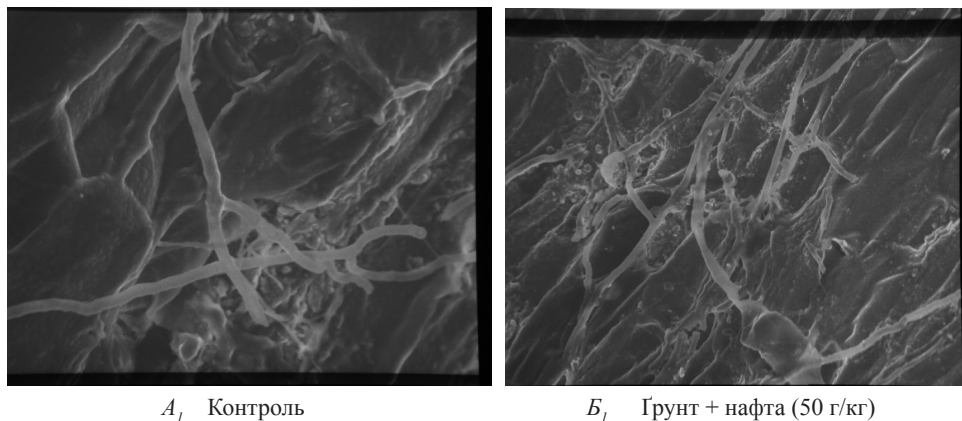


Рис. 7. Міцелій на поверхні епідермальних клітин кореневища *C. hirta* (скануюча електронна мікроскопія,  $\times 500$ , зони апресорій позначено).

При арбускулярній мікоризі гіфи гриба формують у кортексі рослини-хозяїна арбускули і везикули [16]. Саме в арбускулах відбувається найбільш інтенсивний обмін метаболітами між компонентами мікоризи, хоч вони існують лише кілька днів, а потім атрофуються. Крім того, відомо, що у багатьох видів осок, які здатні утворювати арбускулярну мікоризу, спостерігається невелика кількість арбускул [9, 15]. Очевидно, мікориза – це важливий чинник, який допомагає рослинам осочи шорстковолосистої виживати у складних умовах росту на нафтозабруднених ґрунтах.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Казенов С. М., Арбузов А. И., Ковалевский Ю. В. Воздействие объектов нефтепродуктообеспечения на геоэкологическую среду // Геоэкология. 1998. № 4. С. 54–74.

2. Селиванов И. А. Микосимбиотрофизм как форма консортивных связей в растительном покрове Советского Союза. М.: Наука, 1981. 231 с.
3. Соколова Н. А. Использование ВАМ-грибов в агроценозе для регулирования фосфорного питания растений на обычных и эродированных черноземах: автореф. дисс. ... канд. биол. наук: 06.01.09. М., 1995. 15 с.
4. Узбек И. Х. Розвиток корневих систем рослин як показник внутрішньотканинної транслокації речовини й енергії // Вісн. аграрної науки. 2004. № 9. С. 45–47.
5. Цайтлер М. Й. Відновлення рослинного покриву і зміни структури ценопопуляцій трав'яних рослин на нафтозабруднених територіях Бориславського нафтового родовища: автореф. дис. ... канд. біол. наук: 03.00.16. Дніпропетровськ, 2001. 16 с.
6. Brundrett M. C. & Kendrick B. The mycorrhizal status, root anatomy, and phenology of plants in a sugar maple forest // Canadian J. Bot. 1988. Vol. 66. P. 1153–1173.
7. Buno L., Tsvilinjuk O., Terek O. Some aspects of morphogenesis under soil spear *Carex hirta* L. in various conditions of growth (oil pollution) // Młodzi naukowcy – practice rolniczej: Jubileuszowej V Ogólnopolskiej Młodzieżowej Konferencji Naukowej. Rzeszów, 21–23 kwietnia. 2009. С. 102–105.
8. Campbell M. H., Nicol H. I. Germination, emergence, growth, ecotypes and control of *Carex appressa* R. Br. (tussock sedge) // Aust. J. Experimental Agriculture. 2002. Vol. 42. P. 27–36.
9. Cooke J. C., Lefor M. W. The mycorrhizal status of selected plant species from Connecticut wetlands and transition zones // Restoration Ecology. 1998. Vol. 6. P. 213–222.
10. Fuchs B., Hasehwandter K. Red list plants: colonisation by arbuscular mycorrhizal fungi and dark septate endophytes // Mycorrhiza. 2004. Vol. 14. P. 277–281.
11. Gai J. P., Cai X. B., Feng G. et al. Arbuscular mycorrhizal fungi associated with sedges on the Tibetan plateau // Mycorrhiza. 2006. Vol. 16. P. 151–157.
12. Meney K. A., Dixon K. W., Scheltema M., Pate J. S. Occurrence of vesicular mycorrhizal fungi in dryland species of Restionaceae and Cyperaceae from south-west Western Australia // Aust. J. Bot. 1993. Vol. 41. P. 733–737.
13. Miller R. M., Smith C. R., Jastrow J. D., Bever J. D. Mycorrhizal status of the genus *Carex* (Cyperaceae) // Am. J. Bot. 1999. Vol. 86. P. 547–553.
14. Muthukumar T., Udaiyan K. Seasonality of vesicular-arbuscular mycorrhizae in sedges in a semi-arid tropical grassland // Acta Oecol. 2002. Vol. 23. P. 337–347.
15. Muthukumar T., Udaiyan K., Shanmughavel P. Mycorrhiza in sedges – an overview // Mycorrhiza. 2004. Vol. 14. P. 65–77.
16. Peterson R. Larry, Hughes B. Massicotte and Lewis H. Melville. *Mycorrhizas: Anatomy and Cell Biology*. NRC Research Press. 2004. 181 p.
17. Perriell N. Amier, Colin F. Occurrence of mycorrhizal symbioses in the metal-rich lateritic soils of the Koniambo Massif, New Caledonia // Mycorrhiza. 2006. Vol. 16. P. 449–458.
18. Powell C. L. Rushes and sedges are non-mycotrophic // Plant Soil. 1975. Vol. 42. P. 481–484.
19. Sieverding E. Vesicular-Arbuscular Mycorrhiza Management in Tropical Agrosystems. GTZ, Eschborn. and Hartmut Bremer Verlag. Friedland. 1991. 365 p.
20. Visser E. J. W., Bögemann J. M., Van De Steeg H. M. et al. Flooding tolerance of *Carex* species in relation to field distribution and aerenchyma formation // New Phytologist. 2000. Vol. 148. P. 93–103.
21. Vohnik M., Albrechtová J., Vosátka M. **The application of inocula based on ericoid mycorrhizal, DSE and saprotrophic fungi in conventional, semi-conventional, semi-organic and organic cultivation of highbush blueberries.** In: Mycorrhiza Works. 1. Braunschweig: Deutsche Phytomedizinische Gesellschaft. 2008. P. 100–111.

22. Weishampel P. A., Bedford B. L. Wetland dicots and monocots differ in colonization by arbuscular mycorrhizal fungi and dark septate endophytes // Mycorrhiza. 2006. Vol.16. P. 495–502.

Стаття: надійшла до редакції 20.06.12

доопрацьована 09.11.12

прийнята до друку 09.11.12

### MYCORRHIZAE AS PART OF THE SURVIVAL STRATEGY OF *CAREX HIRTA* L. ON A CRUDE OIL CONTAMINATED SOIL

**O. Tsvilynyuk, L. Bunio, A. Karpyn, O. Terek**

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

Family Cyperaceae (*Carex*) - a large group of plants which occupy diverse environments. In *Carex hirta* L. species, resistant to oil pollution of soil, arbuskular mycorrhiza on the roots and rhizomes was detected. Obviously, this is an important factor that allows *C. hirta* plants to survive in adverse growth conditions on the oil contaminated soils.

*Keywords:* mycorrhizae, *Carex hirta*, root, rhizome, crude oil contamination.

### МИКОРИЗА В *CAREX HIRTA* L. КАК ОДНО ИЗ УСЛОВИЙ ВЫЖИВАНИЯ В НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННОЙ ПОЧВЕ

**О. Цвилынюк, Л. Буньо, О. Карпин, О. Терек**

*Львовский национальный университет имени Ивана Франко  
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина  
e-mail: tsvilya@gmail.com*

Семейство Сурегасеae (осоковые) – очень большая группа растений, которая занимает разнообразнейшие среды жизни. У стойкого к нефтяному загрязнению вида *Carex hirta* L. выявлена арбускулярная микориза на корнях и корневищах. Вероятно, этот фактор помогает растениям осоки шершавой выживать в сложных условиях роста на нефтезагрязненной почве.

*Ключевые слова:* микориза, *Carex hirta*, корень, корневище, нефтяное загрязнение.

## АМІНОКИСЛОТНИЙ СКЛАД БІЛКІВ МЕРИСТЕМНИХ КЛІТИН КОРЕНІВ КУКУРУДЗИ ЗА ДІЇ ІОНІВ СВИНЦЮ

Л. Богуславська

*Науково-дослідний інститут біології  
Дніпропетровського національного університету імені Олеся Гончара  
пр. Гагаріна, 72, Дніпропетровськ 49010, Україна  
e-mail: milbo@rambler.ru*

Показано зміни амінокислотного складу водорозчинних білків меристемних клітин коренів кукурудзи за дії іонів свинцю. Загальною закономірністю впливу іонів свинцю є підвищений вміст проліну, валіну та цистеїну, що можна вважати специфічною реакцією клітин меристеми до впливу ксенобіотиків, а підвищення включення цих амінокислот разом із серином до гідрофільних білків за умов стресу свідчить про їхнє важливе значення у пристосувальних процесах клітин тврної тканини коренів кукурудзи.

*Ключові слова:* корені, іони свинцю, амінокислоти, меристеми.

Плюмбум [9] надходить до навколишнього середовища в особливо великих кількостях [8]. Акумуляція цього металу в рослинах призводить до порушень усіх фізіологічних процесів, причому ще до візуальних ознак пошкодження [1, 4]. Відомо, що плюмбум має високу спорідненість до сіркоутримувальних лігандів і утворює з ними міцні зв'язки [5–7]. Тому, потрапляючи у клітини, він взаємодіє з SH-групами білків, що викликає різноманітні порушення метаболізму клітин. Зміни у білкових молекулах відбиваються на змінах пулу амінокислот, які забезпечують біохімічну адаптацію організмів до змін навколишнього середовища. Раніше ми досліджували вплив іонів кадмію та нікелю на амінокислотний склад меристемних клітин коренів кукурудзи [2, 3].

### Матеріали та методи

Об'єктом дослідження був амінокислотний склад водорозчинних білків тврних тканин коренів гібрида кукурудзи (*Zea mays* L.) Дніпровський-310 на 5, 7 та 9 доби проростання на середовищі з іонами свинцю різної концентрації ( $2 \times 10^{-3}$  моль/л,  $2 \times 10^{-4}$  моль/л,  $2 \times 10^{-5}$  моль/л) та на воді (контроль). Білки виділяли дистильованою водою. Для визначення амінокислотного складу зразки гідролізували протягом 24 год у 5,7 н HCl при 110°C в вакуумі. Амінокислотний склад меристемних білків проводили на автоматичному аналізаторі амінокислот Т-399 (ЧССР).

### Результати і їхнє обговорення

Серед діамінокарбонових кислот аспартат має більший діапазон коливань вмісту за дії іонів свинцю (табл. 1), порівняно з глутаматом. На 5-ту добу проростання рівень вмісту аспартату вищий за контроль при середній і найвищій його концентрації, на 7-му добу – при всіх досліджених концентраціях плюмбуму, а на 9-ту добу відзначалося різке зниження вмісту цієї амінокислоти при найменшій і середній концентрації (на 30 і 23% відповідно). При концентрації іонів свинцю  $2 \times 10^{-3}$  моль/л спостерігали підйом вмісту аспартату на 48%. Як видно з таблиці, вміст глутамату протягом усього періоду проростання практично при всіх концентраціях токсиканта був вищий за контроль на 9–15%.



Серед основних амінокислот (лізину, аргініну, гістидину) найбільший рівень коливань вмісту виявив аргінін (табл. 1). При концентрації іонів свинцю  $2 \times 10^{-4}$  моль/л і  $2 \times 10^{-5}$  моль/л на 5-ту добу проростання спостерігалось суттєве зниження вмісту аргініну в середньому на 40%, а  $2 \times 10^{-3}$  моль/л – на 12%. На 7-му добу спостереження при середній і високій концентраціях ксенобіотика продовжувалося зниження вмісту аргініну, а при найменшій його концентрації – підвищення на 16%. На 9-ту добу при низькій і середній концентраціях іонів свинцю вміст аргініну підвищувався на 30 і 22% відповідно, а при високій знижувався на 56,6%. За дії високої концентрації іонів свинцю зареєстровано зниження вмісту лізину протягом усього періоду проростання порівняно з контролем. При низькій концентрації рівень лізину зменшується при проростанні, але залишається вищим за контроль.

Неоднакова дія іонів свинцю протягом проростання встановлена і для вмісту гістидину. Особливий інтерес становить вивчення вмісту таких амінокислот як серин, цистеїн, тирозин, які містять додаткові групи -ОН і -SH, що збільшує кількість реакцій, до яких здатні ці амінокислоти, зокрема, взаємодії білку, до складу яких вони входять, з іншими речовинами. Як показали результати наших досліджень, при всіх концентраціях іонів свинцю і виключно на 5-ту добу його дії підвищувався вміст сірковмісних амінокислот цистеїну і метіоніну.

Найбільший вміст зареєстровано для цистеїну (у 2,5 разу порівняно з контролем). На подальших стадіях проростання спостерігали зниження його вмісту. При низькій і середній концентраціях іонів свинцю вміст метіоніну знижувався, у той час як для концентрації  $2 \times 10^{-3}$  моль/л, навпаки, спостерігали його поступове підвищення протягом проростання (від 31 до 49%).

Для серину також притаманне підвищення вмісту протягом проростання (від 22 до 39%) і тільки за дії високої концентрації. Вплив іонів свинцю на вміст тирозину, в основному, виявився гальмуючим, за винятком низької та високої концентрацій токсиканта, за яких вміст тирозину підвищувався і тільки на 9-ту добу (12 і 36% відповідно).

Вивчення динаміки зміни вмісту проліну (табл. 1) при всіх концентраціях іонів свинцю показало, що на першій стадії спостереження (5-та доба) його вміст був практично на рівні контролю, але у подальшому його вміст різко підвищувався і досягав найбільшого рівня на 9-ту добу при концентрації ксенобіотика  $2 \times 10^{-5}$  моль/л (187%).

Практично при всіх концентраціях плюмбуму і на всіх стадіях спостереження відзначається зниження вмісту лейцину, аланіну, ізолейцину, треоніну, гліцину (табл. 1). Виняток становить ізолейцин, вміст якого значно підвищено (на 64%) порівняно з контролем тільки на 5-ту добу дії токсиканта. Вміст валіну залежав від тривалості дії нітрату свинцю та його концентрації: зниження вмісту цієї амінокислоти за дії невисокої концентрації іонів свинцю на першій і другій стадіях спостереження було на рівні контролю, різке підвищення відбувалося на останній (на 22%). Крива динаміки вмісту валіну при середній і високій концентраціях плюмбуму мали подібний характер: підвищення на першій і другій стадіях відбору та зниження на 9-ту добу.

Залежність вмісту від концентрації іонів свинцю виявили на 5-ту добу проростання такі амінокислоти, як глютамін, аланін, валін, ізолейцин, лейцин; на 7-му добу – треонін, серин, пролін, аланін, валін, метіонін, тирозин, гістидин; на 9-ту добу – аспарат, серин, гліцин, метіонін, лізин, аргінін.

Таким чином, загальною закономірністю впливу іонів свинцю є підвищення вмісту проліну, валіну та цистеїну, що можна вважати специфічною реакцією клітин меристеми до впливу ксенобіотиків. Загальним проявом токсичної дії було підвищення вмісту проліну,

Таблиця 1

Амінокислотний склад водорозчинних білків твірних тканин коренів рослин кукурудзи за дії іонів свинцю

Концентрації важкого металу, моль/л	Амінокислоти, %																
	Асп	Тре	Сер	Глу	Про	Глі	Ала	½ Цис	Вал	Мет	Іле	Лей	Тир	Фен	Гіс	Ліз	Арг
Контроль	9,36	4,23	5,60	15,60	5,66	5,27	6,57	0,69	5,42	2,03	4,09	7,70	5,85	5,02	4,29	6,64	5,97
Pb <sup>2+</sup> ·2×10 <sup>-3</sup>	13,36	3,84	6,82	17,09	5,65	4,62	4,25	1,74	6,72	2,65	6,72	4,94	5,19	4,56	4,14	6,75	5,23
Pb <sup>2+</sup> ·2×10 <sup>-4</sup>	13,47	3,64	5,52	17,53	5,30	5,15	5,12	0,88	6,40	2,50	4,33	5,14	5,58	4,69	4,48	6,73	3,56
Pb <sup>2+</sup> ·2×10 <sup>-5</sup>	8,56	4,29	5,61	17,88	5,52	5,03	6,97	0,93	5,57	2,80	3,67	5,49	6,06	6,46	4,24	7,26	3,66
Контроль	10,41	4,53	5,47	16,47	4,35	5,06	5,99	0,63	5,30	1,98	4,06	6,88	6,20	4,13	4,06	8,71	5,51
Pb <sup>2+</sup> ·2×10 <sup>-3</sup>	12,49	4,05	7,73	18,89	6,80	4,84	4,95	сліди	6,78	2,62	3,93	4,78	1,87	4,84	4,87	7,65	2,93
Pb <sup>2+</sup> ·2×10 <sup>-4</sup>	15,17	4,46	6,44	19,59	5,87	4,57	5,07	0,62	5,95	1,93	3,32	4,55	5,21	3,37	4,69	6,29	2,90
Pb <sup>2+</sup> ·2×10 <sup>-5</sup>	11,47	4,61	5,87	16,84	4,76	4,62	6,06	0,49	5,28	0,70	4,07	7,38	5,80	3,42	2,79	9,44	6,41
Контроль	8,60	4,67	5,36	15,17	3,90	6,10	7,23	0,54	5,92	2,26	4,30	6,95	5,16	4,70	5,51	9,61	4,08
Pb <sup>2+</sup> ·2×10 <sup>-3</sup>	12,69	3,81	7,47	16,47	5,95	6,68	6,50	сліди	6,42	3,37	3,76	4,09	7,02	4,35	4,51	5,15	1,77
Pb <sup>2+</sup> ·2×10 <sup>-4</sup>	6,58	4,98	6,13	15,23	5,46	6,04	6,55	0,37	5,88	1,69	3,97	6,07	3,84	6,23	6,42	9,59	4,96
Pb <sup>2+</sup> ·2×10 <sup>-5</sup>	6,03	4,49	5,19	16,58	7,30	5,76	7,01	сліди	7,20	0,62	3,75	5,71	5,79	4,32	4,93	10,04	5,31

валіну, цистеїну та серину. Підвищене включення цих амінокислот до гідрофільних білків за умов стресу свідчить про їхнє важливе значення у пристосувальних процесах клітин твірної тканини коренів кукурудзи. Неспецифічною реакцією на хімічний стрес клітин меристеми можна вважати також зниження вмісту лейцину, що було характерним для всіх без винятку варіантів досліджу.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Алексеева-Попова Н. В.* Токсическое действие свинца на высшие растения // Устойчивость к тяжелым металлам дикорастущих видов. Л.: Ленуприздат, 1991. С. 92–100.
2. *Богуславська Л. В.* Зміни амінокислотного складу меристемних клітин кореня кукурудзи за дії іонів кадмію // Матеріали XI конф. молодих вчених. (Київ, 2010). К., 2010. С. 22–24.
3. *Богуславська Л. В.* Зміни амінокислотного складу меристемних клітин кореня кукурудзи за дії іонів нікелю // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2011. Вип. 56. С. 250–254.
4. *Мусієнко М. М., Таран Н. Ю.* Стратегія вивчення адаптивного потенціалу рослинного організму і проблема стійкості // Актуальні проблеми фізіології водного режиму та посухостійкості рослин. К.: ТОВ “Міжнародна фінансова агенція”, 1997. С. 21–25.
5. *Серегин И. В., Иванов В. Б.* Гистохимические методы изучения распределения кадмия и свинца в растениях // Физиология растений. 1997. Т. 44. №6. С. 915–921.
6. *Серегин И. В., Иванов В. Б.* Является ли барьерная функция эндодермы единственной причиной устойчивости ветвления корней к солям тяжелых металлов? // Физиология растений. 1997. Т. 44. №6. С. 922–925.
7. *Серегин И. В., Иванов В. Б.* Физиологические аспекты токсического действия кадмия и свинца на высшие растения // Физиология растений. 2001. Т. 48. №4. С. 606–630.
8. *Скопечья О. В., Косик О. І., Мусієнко М. М.* Комплексний еколого-фізіологічний аналіз міграції та нагромадження свинцю в агроєкосистемах // Физиология и биохимия культ. растений. 2004. Т. 36. №1. С. 27–33.
9. *Kauabova P., Natr L.* Effect of lead on growth characteristics and chlorophyll content in barley seedlings // Photosynthetica. 1986. Vol. 26. P. 411–417.

Стаття: надійшла до редакції 27.08.12

доопрацьована 17.09.12

прийнята до друку 19.09.12

#### AMINO ACID STRUCTURE OF PROTEINS IN MERISTEMATIC CELLS OF MAIZE ROOTS UNDER THE INFLUENCE OF LEAD IONS

L. Boguslavska

*Biology Research Institute of Oles Honchar Dnipropetrovsk National University*

*72, Gagarin Ave., Dnipropetrovsk 49010, Ukraine*

*e-mail: milbo@rambler.ru*

Changes in amino acid structure of soluble proteins in meristem cells of maize roots under the influence of lead ions are shown. General pattern of influence of lead ions is the high content of proline, valine and cysteine, which can be considered a specific response to meristem cells to the effects of xenobiotics, and increase the inclusion of these amino acids

together with serine to hydrophilic proteins under stress indicates their importance in the adaptive processes of cell generators root tissues of maize.

*Keywords:* roots, lead ions, amino acid, meristem.

## **АМИНОКИЛОТНЫЙ СОСТАВ БЕЛКОВ МЕРИСТЕМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК КОРНЕЙ КУКУРУЗЫ ПРИ ДЕЙСТВИИ ИОНОВ СВИНЦА**

**Л. Богуславская**

*Научно-исследовательский институт биологии Днепрпетровского  
национального университета имени Олеса Гончара  
пр. Гагарина, 72, Днепрпетровск 49010, Украина  
e-mail: milbo@rambler.ru*

Показаны изменения аминокислотного состава водорастворимых белков меристемных клеток корней кукурузы при действии ионов свинца. Общей закономерностью влияния ионов свинца является повышенное содержание пролина, валина и цистеина, что можно считать специфической реакцией клеток меристемы на воздействие ксенобиотиков, а повышение включения этих аминокислот вместе с серином в гидрофильные белки в условиях стресса свидетельствует об их важном значении в приспособительных процессах клеток образующей ткани корней кукурузы.

*Ключевые слова:* корни, ионы свинца, аминокислоты, меристемы.

## ВМІСТ АСКОРБІНОВОЇ КИСЛОТИ Й АКТИВНІСТЬ ФЕРМЕНТІВ ЇЇ МЕТАБОЛІЗМУ ЗА ДІЇ ІОНІВ НІКЕЛЮ У ПРОРОСТКАХ КУКУРУДЗИ

**В. Більчук, Г. Россихіна-Галича**

*Дніпропетровський національний університет  
імені Олеся Гончара, НДІ біології  
пр. Гагаріна, 72, Дніпропетровськ 49010, Україна  
e-mail: anna-rossihina@rambler.ru*

Досліджено вплив іонів нікелю на вміст аскорбінової кислоти, активність аскорбатоксидази і аскорбатпероксидази у клітинах фотосинтезуючих органів проростків кукурудзи гібрида Оржиця 237МВ. За короткочасної експозиції (24 год) рослин на розчинах металу спостерігали підвищення вмісту аскорбату й активності ферментів у листках проростків. Більш тривала експозиція (96 год) викликала подальше збільшення активності ферментів. У період післядії в усіх варіантах реєстрували зміни, що свідчили про здатність проростків відновити нормальне функціонування.

*Ключові слова:* кукурудза, аскорбатоксидаза, аскорбатпероксидаза, іони нікелю, післядія.

У теперішній час особливу увагу приділяють проблемі забруднення середовища важкими металами (ВМ), які, проникаючи крізь плазматичну мембрану живих клітин, викликають активізацію процесів перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) у рослинних організмах з утворенням активних форм кисню (АФК) [1, 2]. Для переривання каскадів неконтрольованого окиснення в усіх компартментах рослин функціонують антиоксиданти й антиоксидантні системи. Важливу роль в адаптації рослин до токсичної дії сполук важких металів відіграє аскорбінова кислота і ферменти її перетворення для підтримання про-/антиоксидантної рівноваги [5, 8]. Аскорбінова кислота (АК) є важливим низькомолекулярним антиоксидантом, однією з головних функцій якої є відновлення вільних радикалів і мінімізація порушення окисного стресу. Накопичення та перетворення АК відбувається за участі ферментів циклу аскорбату: аскорбатоксидази (КФ 1.10.3.3) і аскорбатпероксидази (КФ 1.11.1.11). Аскорбатоксидаза каталізує процес перетворення та відновлення аскорбінової кислоти, за участі аскорбатпероксидази відбувається нейтралізація пероксиду водню та інших активних форм кисню [6]. Відомості щодо впливу сполук ВМ на активність цих ферментів і накопичення аскорбінової кислоти неоднозначні. Так, дані Т. А. Демури показали, що сполуки кадмію викликали підвищення активності аскорбатпероксидази в коренях при короткочасній дії стресу й інгібування за його довготривалого впливу [1, 11]. В умовах аноксії, дефіциту азоту, холодного стресу, комплексної дії кадмію та нікелю в листках гороху, пшениці, кукурудзи активність ферменту значно підвищувалась [1, 4, 9]. У роботах показано варіювання вмісту кількості АК за умов окиснювального стресу різного походження [6].

Наскільки порушується функціонування всієї аскорбатзалежної системи за умов дії сполук нікелю, відомо недостатньо. Разом із цим, також не досліджені залежності змін у накопиченні АК й активності ферментів її циклу від концентрації металу і тривалості дії стрес-фактора на початковому (ювенільному) етапі розвитку. У зв'язку з цим метою роботи було дослідження функціонування елементів аскорбатзалежної системи за умов дії нітрату нікелю різної концентрації у вегетативних органах проростків кукурудзи.

### Матеріали та методи

Тест-об'єктом були проростки кукурудзи середньораннього простого модифікованого гібрида Оржиця 237МВ, який внесено в Державний реєстр сортів рослин України з 2010 р. Насіння кукурудзи вирощували протягом 3 діб у рулонах фільтрувального паперу на дистильованій воді. На четверту добу проростки висаджували на розчини нітрату нікелю в концентраціях 0,05; 0,5; 1,0 та 5,0 мМ і витримували на них упродовж 96 год. Контролем слугували проростки, які вирощувались на дистильованій воді. Усі виміри та спостереження проводили у листках рослин через 7, 12, 24 та 96 год після початку дії іонів металу і через 120 год після перенесення проростків на дистильовану воду.

Вміст аскорбінової кислоти оцінювали за [3]. Активність аскорбатоксидази оцінювали за швидкістю окиснення аскорбінової кислоти при дії ферментативного препарату методом йодометричного титрування згідно з [3]. Активність аскорбатпероксидази визначали за реакцією відновлення пероксиду водню аскорбатом Na згідно з [7, 10]. Статистичну обробку одержаних цифрових даних здійснювали за допомогою пакета Statistica 6,0; розбіжності між вибірками вважали достовірними при  $p < 0,05$ .

### Результати і їхнє обговорення

Аскорбінова кислота, володіючи окислювально-відновними властивостями, відіграє важливу роль у процесі росту й розвитку рослин. Дослідження вмісту аскорбінової кислоти в листках проростків кукурудзи при вирощуванні за дії нітрату нікелю показали достовірні зміни цього показника тільки через 24 год стресового впливу. Так, за дії низьких концентрацій металу (0,05–0,5 ммоль) накопичення АК у тканинах листків перевищувала контрольні значення в середньому на 16% (рис. 1). Використання в середовищі концентрацій нікелю 1 мг/л, що становить 15 ГДК, зумовлює збільшення накопичення антиоксиданта в 1,25 разу порівняно з контрольними зразками.

Одержані експериментальні дані дали підстави констатувати, що в умовах збільшення тривалості стресового впливу до 96 год спостерігали варіювання в накопиченні аскорбінової кислоти в листках проростків. Так, за хронічної дії нікелю в низьких концентраціях (0,05–0,5 ммоль) вміст АК перевищував контрольні значення в 1,2–1,5 разу, тоді як за концентрації 1 мг/л – в 1,6 разу. Разом із цим, при максимальній концентрації іонів нікелю 5 мг/л, що становила 73 ГДК, виявлено інгібування накопичення даного антиоксиданта з подовженням тривалості інтоксикації.

Припинення стресового впливу токсиканта і перенесення рослин на дистильовану воду показало, що після 5-ти діб у вегетативних органах спостерігали зниження рівня АК на 30–40% за попередньої дії нікелю в концентрації 0,5 і 1,0 ммоль, тоді як за низьких концентрацій – на 15%. У той же час в листках проростків, що зазнали дії токсиканта в концентрації 5,0 ммоль, вміст аскорбінової кислоти практично не змінювався і залишався на тому ж рівні, що і після 96-годинного стресу. Наведені вище факти дають змогу стверджувати, що нікель у концентрації 0,5–1,0 ммоль викликає незначні зміни в активізації ПОЛ, а це призводить до збільшення накопичення аскорбінової кислоти для забезпечення про-/антиоксидантної рівноваги, а процес відновлення метаболізму проходить за короткий термін. На відміну від цього, високі концентрації сполук нікелю призводять до значних змін в антиоксидантній системі, тому процес відновлення гальмується.

Відомо, що активація ПОЛ, викликана стресовими факторами різної природи, призводить до запуску механізмів захисту клітин, передусім до змін активності ферментів антиоксидантної системи, зокрема аскорбатоксидази й аскорбатпероксидази. Проведені дослідження активності аскорбатоксидази в листках проростків кукурудзи дали змогу встановити, що іони нікелю, починаючи з концентрації 0,05 ммоль, призводять до

зростання активності цього ферменту. Так, 24-годинна експозиція проростків на розчинах нітрату нікелю в концентрації від 0,5 до 1,0 ммоль зумовлювала підвищення активності аскорбатоксидази в 1,6–2,7 разу. За максимальної концентрації нікелю активність ферменту підвищувала контроль в 3,4 разу. За довготривалого (до 96 год) впливу ксенобіотика спостерігали підвищення активності ензиму в 1,7–2,3 разу щодо контролю (рис. 2).

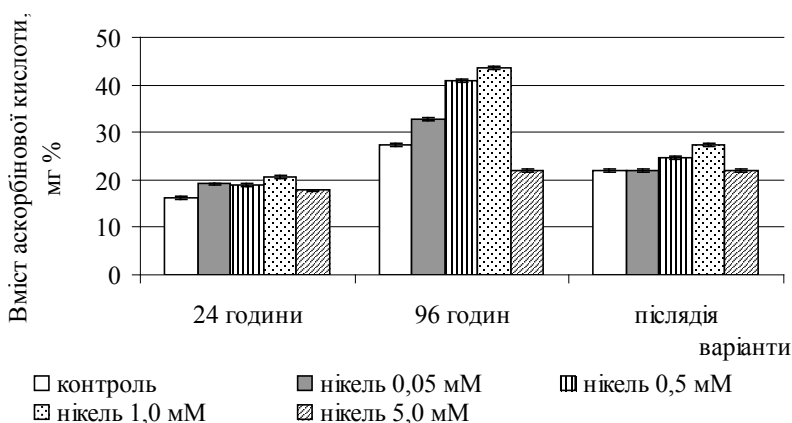


Рис. 1. Вміст аскорбінової кислоти в листках проростків кукурудзи за дії різних концентрацій іонів нікелю.

Аналіз даних модельних експериментів при переміщенні проростків кукурудзи в дистильовану воду, за 96-годинної дії сполук нікелю різної концентрації, показав загальну тенденцію зниження активності аскорбатоксидази у фотосинтезуючих органах контрольних і дослідних зразків. Слід зазначити, що у варіанті післядії високої концентрації токсиканта, зниження активності ферменту становило 30–38% щодо рівня на 96 год експозиції. Це узгоджується зі змінами вмісту аскорбінової кислоти у вегетативних органах при відновленні після зняття стрес-фактора.

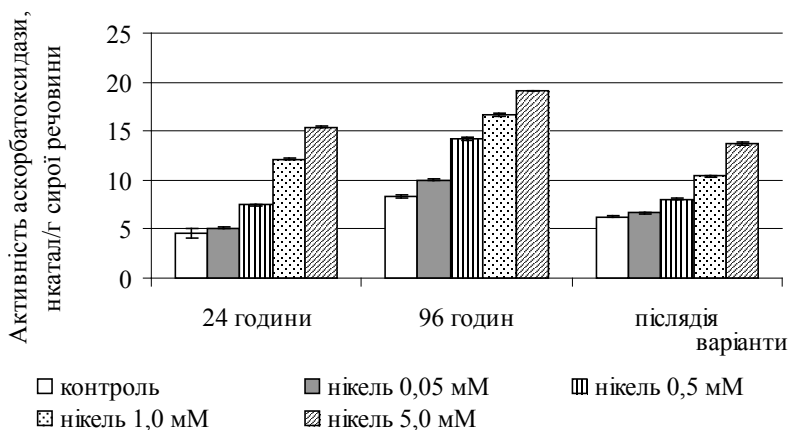


Рис. 2. Активність аскорбатоксидази в листках проростків кукурудзи за дії різних концентрацій іонів нікелю.

Оскільки в результаті реакції, яку каталізує аскорбатоксидаза, утворюється пероксид водню, то нейтралізація токсичної сполуки відбувається в реакціях за участю ензиму аскорбатпероксидази. Аскорбатпероксидазна реакція – це центральний процес

цілого циклу реакцій, спрямованого на видалення основної активної форми кисню ( $H_2O_2$ ) у хлоропластах.

Аналіз даних модельних дослідів показав, що в листках кукурудзи через 24 год після початку дії сполук нікелю активність аскорбатпероксидази перевищувала контрольні значення в 1,2–1,4 разу залежно від концентрації іонів металу (рис. 3). Дані, представлені на рис. 3, дають підстави стверджувати, що після 96-годинної інтоксикації сполуками нікелю у варіантах за низької концентрації (0,05 мМ) в листках кукурудзи активність аскорбатпероксидази перевищувала контрольні показники на 23%. Поряд із цим, при підвищенні концентрації іонів нікелю в середовищі вирощування спостерігали інтенсифікацію активності зазначеного ферменту – майже в 1,3–1,5 разу щодо аналогічних варіантів на 24 год експозиції.

У листках проростків кукурудзи в період вивчення післядії нікелю активність аскорбатпероксидази наближалася до рівня значень при 24-годинній експозиції, що, можливо, обумовлене зниженням інтенсивності процесів пероксидного окислення.

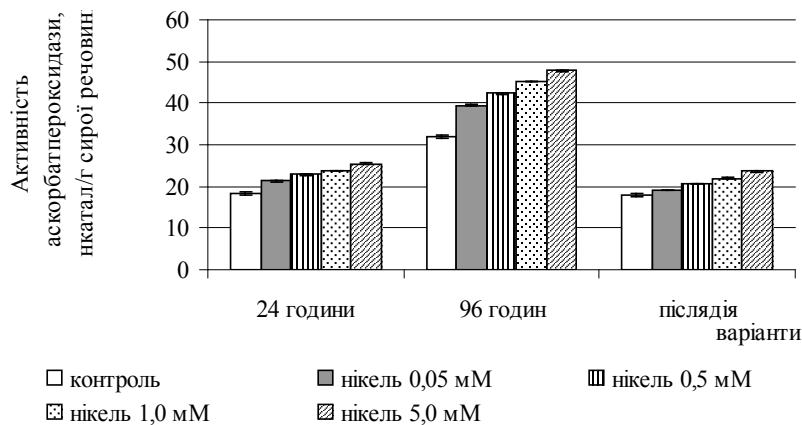


Рис. 3. Активність аскорбатпероксидази в листках проростків кукурудзи за дії різних концентрацій іонів нікелю.

Таким чином, сполуки нікелю на ранніх етапах онтогенезу призводять до порушення про-/антиоксидантної рівноваги у фотосинтезуючих органах, що проявляється в підвищенні вмісту аскорбінової кислоти й активності аскорбатоксидази і аскорбатпероксидази. У період післядії стресора в усіх варіантах реєстрували зниження накопичення АК й активності досліджуваних ферментів, що, ймовірно, пов'язано зі зменшенням вмісту активних форм кисню.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Демура Т. А., Гришко В. М. Зміни про-/антиоксидантної рівноваги у проростків кукурудзи за різного рівня накопичення кадмію та нікелю // Вісн. Харків. аграр. ун-ту. Сер. біол. 2008. Вип. 1 (13). С. 22–29.
2. Колупаєв Ю. С. Стресові реакції рослин. Харків: Харк. держ. аграрн. ун-т, 2001. 173 с.
3. Плешков Б. П. Практикум по биохимии растений. М.: Колос, 1968. 183 с.
4. Полесская О. Г., Каширская Е. И., Алехина Н. Д. Изменение активности антиоксидантных ферментов в листьях и корнях пшеницы в зависимости от формы и дозы азота в среде // Физиология растений. 2004. Т. 51. № 5. С. 686–691.



5. Сауди-Сар С., Хавари-Неджад Р. А., Фахми Х. и др. Совместное влияние гибберелловой и аскорбиновой кислот на перекисное окисление липидов и активность антиокислительных ферментов в проростках сои при обработке никелем // Физиология растений. 2007. Т. 54. № 1. С. 85–91.
6. Чупахина Г. Н. Система аскорбиновой кислоты растений: монография. Калининград: Калинингр. гос. ун-т, 1997. 120 с.
7. Aono M., Saji H., Fujiyama K. Decrease in Activity of Glutathione Reductase Enhances Paraquat Sensitivity in Transgenic *Nicotiana tabacum* // Plant Physiol. 1995. Vol. 107. P. 645–648.
8. Horemans N., Foyer C. H., Potters G. et al. Ascorbate function and associated transport systems in plants // Plant Physiol. Biochem. 2000. Vol. 38. P. 531–540.
9. Mittova V. O., Igamberdiev A. U. Operation of ascorbate-glutathione cycle in higher plants under the conditions of anoxia: Abstr. 11<sup>th</sup> Congress of the Federation of European Societies of Plant Physiology, Varna, 7–11 Sept., 1998 // Bulg. J. Plant Physiol. 1998. Spec. Issue. P. 288.
10. Nakano Y., Asada K. Hydrogen Peroxide Is Scavenged by Ascorbate-Specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts // Plant Cell Physiol. 1981. Vol. 22. P. 867–880.
11. Schutzendubel A., Schwanz P., Teichman T. et al. Cadmium-induced changes in antioxidant systems, hydrogen peroxide content, and differentiation in scotch pine roots // Plant Physiol. 2001. Vol. 127. P. 887–898.

Стаття: надійшла до редакції 31.08.12

доопрацьована 31.10.12

прийнята до друку 05.11.12

## THE CONTENT OF ASCORBIC ACID AND ACTIVITY OF ENZYMES OF ITS METABOLISM AT ACTION OF NICKEL IONS IN MAIZE SEEDLINGS

V. Bilchuk, A. Rossihina-Galicha

*Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Research Institute of Biology  
72, Gagarin Ave., Dnipropetrovsk 49010, Ukraine  
e-mail: anna-rossihina@rambler.ru*

The influence of nickel ions on the content of ascorbic acid, ascorbatperoxidase and ascorbatoxidase activity in cells of photosynthesizing organs of maize seedlings of hybrid Orjitz 237 MV is studied. The increase of ascorbic acid and enzymes activity in leaves of seedlings was observed at short-term exposition (24 hour) of plants in solutions of metal. Longer exposition (96 hours) caused the further increase in activity of enzymes. During the period after action of xenobiotic in all variants registered the changes which testified to ability of seedlings to reduction normal functioning.

*Keywords:* maize, ascorbatperoxidase, ascorbatoxidase, nickel ions, after action.

**СОДЕРЖАНИЕ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ  
НА АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ ЕЕ МЕТАБОЛИЗМА  
ПРИ ДЕЙСТВИИ ИОНОВ НИКЕЛЯ В ПРОРОСТКАХ КУКУРУЗЫ**

**В. Більчук, Г. Россихіна-Галича**

*Днепропетровский национальный университет  
имени Олеся Гончара, НИИ биологии  
пр. Гагарина, 72, Днепропетровск 49010, Украина  
e-mail: anna-rossihina@rambler.ru*

Исследовано влияние ионов никеля на содержание аскорбиновой кислоты, активность аскорбатоксидазы и аскорбатпероксидазы в клетках фотосинтезирующих органов проростков кукурузы гибрида Оржиця 237МВ. При кратковременной экспозиции (24 часа) растений на растворах металла наблюдали повышение содержания аскорбата и активности ферментов в листках проростков. Более длительная экспозиция (96 часов) вызвала последующее увеличение активности ферментов. В период последействия во всех вариантах регистрировали изменения, которые свидетельствовали о способности проростков возобновить нормальное функционирование.

*Ключевые слова:* кукуруза, аскорбатоксидаза, аскорбатпероксидаза, ионы никеля, последействие.

---

## ЗМІСТ

Шановні колеги! .....	3
-----------------------	---

## ОГЛЯДИ

*О. Яцків, А. Тарновська*

Причини і форми чоловічого непліддя та методи діагностики еякуляту як основного показника чоловічого здоров'я .....	4
---	---

*А. Зинь*

Прооксидантно-антиоксидантний гомеостаз і мембранний транспорт у живих організмах .....	21
---	----

*О. Бішко*

Гістамін і блокатори гістамінових рецепторів. Структурні та функціональні аспекти .....	40
---	----

## БІОТЕХНОЛОГІЯ

*А. Тевфік, І. Митрофанова*

Індукція морфогенезу канни садової ( <i>Canna × hybrida hort.</i> ) за умови <i>in vitro</i> .....	58
--	----

## БІОХІМІЯ

*А. Р. Гнатуш, В. Р. Дрель, Н. О. Ганай, А. Я. Яланецький, В. І. Мізін, Н. О. Сибірна*

Природні поліфенольні комплекси винограду запобігають розвиткові оксидативного стресу в тканинах периферичної нервової системи щурів зі стрептозотин-індукованим цукровим діабетом .....	64
--	----

*О. Чень, М. Барська, Н. Сибірна, О. Стасик*

Розробка і оцінка ВЕРХ методу для визначення аргініну в біологічних зразках .....	73
---	----

*У. Старанко, Л. Дацюк, М. Сабадашка, Н. Сибірна*

Коригуючий вплив природного поліфенольного комплексу винограду за радіоіндукованого оксидативного стресу у тканині нирки .....	83
--	----

*А. Данилова, А. Запорожченко*

Стан антиоксидантної системи захисту у щурів з експериментальними патологіями при введенні до складу раціону препаратів з пробіотичними мікроорганізмами .....	90
--	----

*Ю. Салига, В. Росаловський, Р. Федяков*

Глутатіонова система еритроцитів щурів, інтоксикованих хлорпірифосом .....	99
--	----

*І. Письменецька*

Деталізація ВЕРХ-спектрів вільних олігосахаридів плазми крові здорових донорів .....	105
--	-----

*Т. Сегеда, Н. Мітряєва, Т. Бакай, Л. Гребіник*

Вплив поєднаної дії іонізуючого випромінювання та хіміопрепаратів на вміст проапоптозного ліпиду кераміду в карциномі герена .....	111
--	-----

*М. Хохла, Г. Клевета, Я. Чайка, М. Скибіцька, Н. Сибірна*

Вплив галеги лікарської на апоптоз лейкоцитів щурів за умов експериментального цукрового діабету 1-го типу .....	117
--	-----

*К. Дудок, Л. Старикович, О. Речицький, А. Шкаволяк, Н. Сибірна*

Роль похідних піролопіримідиндіонів у регуляції фізико-хімічних характеристик гемоглобіну й активності окремих ферментів антиоксидантного захисту крові людей <i>in vitro</i> .....	126
---	-----

<hr/>	
<i>Н. Луковська, А. Шафорост, А. Маленченко, В. Бєляковський, Д. Окунцов, Т. Пригожа, С. Стасєнкова, Н. Крутіліна, Л. Пархоменко</i>	
Клінічне значення використання методів флуоресцентних зондів і клиноподібної дегідратації в оцінці альбумінових показників онкохворих .....	137
<b>БОТАНІКА</b>	
<i>О. Лобачєвська, І. Рабик</i>	
Особливості вегетативного розмноження мохоподібних на відвалах сірчаного видобутку .....	145
<b>ГЕНЕТИКА</b>	
<i>Б. Остаїш, Н. Забуранний, Л. Горбаль, А. Лужецький, С. Шульга, В. Федоренко</i>	
Гомологи плейотропного регуляторного гена <i>adrA</i> в <i>Actinoplanes</i> : аналіз <i>in silico</i> .....	156
<b>ЕКОЛОГІЯ</b>	
<i>Д. Ганжа</i>	
Морфологічна реакція листків тополі в різних умовах урботехногенного навантаження .....	163
<i>В. Самохвалова, А. Фатєєв, Є. Лучникова, О. Ликова</i>	
Еколого-геохімічні дослідження вмісту різних форм Со, Ні, Сг у ґрунтах різного генезису в Україні .....	171
<i>С. Ващук, В. Баранов, А. Баня, З. Фецько, Л. Карпінєць</i>	
Накопичення важких металів у органах рослин гірчака японського ( <i>Polygonum cuspidatum</i> Sieb. et Zucc) та кремені гібридної ( <i>Petasites hybridus</i> L.) за дії витяжок субстратів відвалу вугільних шахт .....	182
<i>М. Онисковець</i>	
Показники імунного статусу риб у біомоніторингу важких металів у навколишньому середовищі .....	190
<i>В. Гіссовський</i>	
Передумови втрати життєздатності популяції трав'яних рослин .....	198
<i>І. Царик</i>	
Оселища деяких представників родини Formicidae у рівнинній частині Заходу України .....	203
<i>В. Савосько</i>	
Вплив комбінацій меліорантів і термінів їхньої дії на фітотоксичність субстратів шахтних хвостосховищ Криворіжжя .....	208
<i>Н. Волошина</i>	
Паразитарна система: її екологічна сутність .....	215
<i>А. Стадниченко</i>	
Вплив трематодної інвазії та різних концентрацій сульфіту на вміст гемоглобіну в гемолімфі <i>Planorbarius corneus</i> (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata, Bulinidae) .....	222
<i>І. Грюк, І. Суходольська</i>	
Вміст сполук нітрогену у воді малих річок як показник рівня антропогенного навантаження територій .....	227

---

## МІКРОБІОЛОГІЯ

*Я. Колісник, Н. Скочиляс*

Визначення та нейтралізація антимікробної активності компонентів лікарського засобу "Інспірон" ..... 239

*О. Васи́лів, С. Гнатуш, О. Білий, В. Гетьман, Я. Ференсович*

Зміни розмірного розподілу та відносного вмісту клітин сірковідновлювальних бактерій *Desulfurotonas acetoxidans* за впливу солей перехідних металів ..... 249

## ФІЗІОЛОГІЯ ЛЮДИНИ І ТВАРИН

*О. Лисенко*

Стійкість реакцій кардіореспіраторної системи за умов досягнення максимального рівня споживання кисню у кваліфікованих спортсменів-бігунів .... 259

*А. Котлярова, В. Манько*

АТФ-азна активність ізольованих клітин зовнішньоорбітальної слъзової залози щура за умов *in situ* ..... 270

*Р. Іскра*

Активність дегідрогеназ вуглеводного обміну в організмі щурів за дії хром цитрату ..... 283

## ФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИН

*О. Рицакова, О. Молодченкова, С. Петров*

Дія водного і теплового стрес-факторів на активність ізоцитратдегідрогенази (НАДФ<sup>+</sup>) та вміст  $\alpha$ -кетокислот у проростках кукурудзи ..... 288

*Г. Россихіна-Галича*

Роль антиоксидантних ферментів у стійкості представників роду *Acer* L. в умовах антропогенного забруднення ..... 294

*Г. Россихіна-Галича, Ю. Лихолат*

Зміни вмісту низькомолекулярних антиоксидантів у листках *Aesculus hippocastanum* L. за умов міста Дніпропетровська ..... 301

*Г. Левчук, О. Войтович, В. Лях*

Зміна характеристик лектиноподібних білків льону олійного в онтогенезі ..... 307

*В. Лашко, О. Вінниченко*

Вплив нітрату нікелю на поліпептидний склад білків у проростаючому насінні кукурудзи ..... 315

*О. Цвілинюк, Л. Буньо, О. Карпин, О. Терек*

Мікориза у *Carex hirta* L. як одна із умов виживання в нафтозабрудненому ґрунті ..... 320

*Л. Богуславська*

Амінокислотний склад білків меристемних клітин коренів кукурудзи за дії іонів свинцю ..... 327

*В. Більчук, Г. Россихіна-Галича*

Вміст аскорбінової кислоти й активність ферментів її метаболізму за дії іонів нікелю у проростках кукурудзи ..... 332

---

## CONTENS

### REVIEW

*O. Yatskiv, A. Tarnovska*

Causes and forms of male infertility and methods of diagnosis ejaculate, as the main indicator of male health ..... 4

*A. Zyn*

Prooxidant-antioxidant homeostasis and membrane transport in living organisms ..... 21

*O. Bishko*

Histamine and histamine receptor blockers. Structural and functional aspects ..... 40

### BIOTECHNOLOGY

*A. Teyfik, I. Mitrofanova*

Induction of canna garden (*Canna × hybrida hort.*) morphogenesis *in vitro* ..... 58

### BIOCHEMISTRY

*A. R. Gnatush, V. R. Drel, N. O. Hanay, A. Ya. Yalaneckyy, V. I. Mizin, N. O. Sybirna*

The antioxidant effect of natural polyphenolic complexes of grape wine in the rat peripheral nervous system under streptozotocin-induced diabetes mellitus ..... 64

*O. Chen, M. Barska, N. Sybirna, O. Stasyk*

Development and evaluation of hplc method for arginine assay in biological samples ... 73

*U. Staranko, L. Datsyuk, M. Sabadashka, N. Sybirna*

Corrective effect of natural grape polyphenol complex under radioinduced oxidative stress in kidney tissue ..... 83

*A. Danilova, A. Zaporozhenko*

The state of the antioxidant system of defence for the rats of experimental pathology when using in the diets probiotic microorganisms, which are immobilized on a high carbohydrate media ..... 90

*Yu. Salyha, V. Rosalovsky, R. Fedyakov*

Glutathione system in erythrocytes of rats intoxicated by chlorpyrifos ..... 99

*I. Pismenetska*

Spectra detalization of blood plasma free oligosaccharides of healthy volunteers ..... 105

*T. Segeda, N. Mitryaeva, T. Bakai, I. Grebenik*

Influence of ionizing radiation and chemotherapeutic drugs on proapoptotic ceramide level in guerin's carcinoma ..... 111

*M. Khokhla, G. Kleveta, Ya. Chajka, M. Skybitska, N. Sybirna*

The influence of galega officinalis on rats leukocytes apoptosis under the experimental diabetes mellitus type 1 ..... 117

*K. Dudok, L. Starykovich, A. Rechytskyi, A. Shkavołyak, N. Sybirna*

Role of pyrrolopyrimidinedions derivatives in the regulation of hemoglobin physical and chemical characteristics and human blood antioxidant enzymes activity *in vitro* ..... 126

*N. Lukouskaya, A. Shaforost, A. Malenchenko, V. Belyakovskiy, D. Okuntsov,*

*T. Prigozhaya, S. Stasenkov, N. Krutilina, L. Parkhomenko*

Clinical significance of using method of fluorescent probes and method of wedge dehydration in assessing albumin parameters in cancer patients ..... 137

---

## BOTANY

- O. Lobachevska, I. Rabyk*  
Peculiarities of bryophytes vegetative reproduction on the dumps of sulphur production ..... 145

## GENETICS

- B. Ostash, N. Zaburannyi, L. Horbal, A. Luzhetskyy, S. Shulga, V. Fedorenko*  
Homologues of pleotropic regulatory gene *adpA* in *Actinoplanes*: analysis *in silico* ..... 156

## ECOLOGY

- D. Ganzha*  
Morphological response of poplar leaves in a variety conditions of anthropogenic load ..... 163
- V. Samokhvalova, A. Fateev, E. Luchnikova, E. Lykova*  
Ecological and geochemical investigations of different forms of Co, Ni, Cr in soils of different genesis in Ukraine ..... 171
- S. Vaschuk, V. Baranov, A. Banya, Z. Fetcko, L. Karpinets*  
Features of heavy metals accumulation in plants organs *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc and *Petasites hybridus* L. .... 182
- M. Onyskovets*  
Parameters of the fish immune status in the biomonitoring of enviromental heavy metals ..... 190
- V. Gissovsyky*  
Preconditions for loss of viability of population development of herbal plants ..... 198
- I. Tsaryk*  
The spatial restriction of some representatives of family Formicidae in the habitats of lowland part of Western Ukraine ..... 203
- B. Savosko*  
The effect of combinations reclamation and their period of incubation on phytotoxicity substrates mine tailing in Kryvyi Rih ore mining region ..... 208
- N. Voloshyna*  
Parasitic system: its ecological essence ..... 215
- A. Stadnychenko*  
Influence of a trematodous infection and various concentration sulginum on the content of haemoglobin at *Planorbarius corneus* haemolymph ..... 222
- I. Gryuk, I. Sukhodolska*  
Contents of nitrogen compounds in the water of small rivers as an indicator of anthropogenic capacity of the areas ..... 227

## MICROBIOLOGY

- Ya. Kolisnyk, N. Skochylyas*  
Determination and neutralization of antimicrobial activity of the components of medicinal product "Inspiron" ..... 239

---

<i>O. Vasylyv, S. Hnatysh, O. Bilyy, V. Hetman, Ya. Ferensovych</i> Changes of size distribution and relative content of sulfur-reducing <i>Desulfuromonas acetoxidans</i> bacterial cells under the influence of transition metal salts .....	249
---	-----

#### HUMAN AND ANIMAL PHYSIOLOGY

<i>O. Lysenko</i> Stability of reactions in cardiorespiratory when the achieving of maximum oxygen consumption in athletes .....	259
<i>A. Kotliarova, V. Manko</i> Atpase activity of isolated cells of the rat exorbital lacrimal gland under <i>in situ</i> condition .....	270
<i>R. Iskra</i> The activity of dehydrogenases of carbohydrate metabolism in rats under the action of chromium citrate .....	283

#### PLANT PHYSIOLOGY

<i>O. Rischakova, O. Molodchencova, S. Petrov</i> Isocitrate dehydrogenase(NADP <sup>+</sup> ) activity and the content of $\alpha$ -keto acids in germination seeds of maize in the conditions of water and heat stress-factors .....	288
<i>G. Rossikhina-Galicha</i> The role of antioxidant enzymes in the stability of <i>Acer</i> L. genus plants under anthropogenic contamination .....	294
<i>A. Rossikhina-Galycha, Yu. Lykholat</i> Changes of low-molecular antioxidants level in leaves of <i>Aesculus hippocastanum</i> L. in Dniepropetrovsk' conditions .....	301
<i>G. Levchuck, H. Voitovich, V. Lyakh</i> The change of lectinlike proteins of oil flax in ontogenesis .....	307
<i>V. Lashko, A. Vinnichenko</i> The influence of nickel nitrate on polypeptide protein composition of maize germinating seeds .....	315
<i>O. Tsvilynyuk, L. Bunio, A. Karpyn, O. Terek</i> Mycorrhizae as part of the survival strategy of <i>Carex hirta</i> L. on a crude oil contaminated soil .....	320
<i>L. Boguslavska</i> Amino acid structure of proteins in meristematic cells of maize roots under the influence of lead ions .....	327
<i>V. Bilchuk, A. Rossikhina-Galicha</i> The content of ascorbic acid and activity of enzymes of its metabolism at action of nickel ions in maize seedlings .....	332